

BIBLIOTECA
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Universidade de São Paulo

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Programa de Pós-Graduação em Fármaco e Medicamentos
Área de Produção e Controle Farmacêuticos

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

Maria Bernadete Riemma Pierre

Tese para a obtenção do grau de
DOUTOR

Orientadora:
Prof^a Dr^a Maria Vitória Lopes Badra Bentley

São Paulo

2004

17852

DEDALUS - Acervo - CQ



30100005876

Ficha catalográfica

Elaborada pela Biblioteca Central da Universidade de São Paulo-
Ribeirão Preto-SP

Pierre, Maria Bernadete Riemma

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. São Paulo 2004.

132 p.: il; 30 cm

Tese de Doutorado, apresentada à Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo. Departamento de Farmácia. São Paulo, 2004.

Orientadora: Bentley, Maria Vitória Lopes Badra

1. Ácido 5-aminolevulínico
2. Terapia Fotodinâmica
3. Ácido oléico
4. Câncer de pele.

Maria Bernadete Riemma Pierre

Otimização da liberação cutânea do ácido 5-aminolevulínico para terapia fotodinâmica do câncer de pele: avaliação *in vitro* e *in vivo* da influência de promotores de absorção cutânea

Comissão julgadora
da Tese para a obtenção do grau de Doutor

Prof^ª. Dr^ª. Maria Vitória Lopes Badra Bentley
Orientadora/Presidente

Prof^ª. Dr^ª. Renata Fonseca Vianna Lopez
1º examinador

Prof^ª. Dr^ª. Erika Rosa Maria Kedor
2º examinador

Prof^ª. Dr^ª. Maria José Vieira Fonseca
3º examinador

Prof^ª. Dr^ª Vladi Olga Consiglieri
4º examinador

São Paulo, 26 de março de 2004

BIBLIOTECA
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Universidade de São Paulo

“Cada dia é um novo começo... mais uma oportunidade para aprendermos mais sobre nós mesmos, para nos importarmos mais com os outros, para rir mais do que temos feito, realizar mais do que pensamos em poder, para ser mais do que éramos antes”.

“O Altíssimo é que produziu da terra todos os medicamentos, e o homem prudente não lhes terá oposição...Ao conhecimento dos homens pertence a virtude daqueles, e o Altíssimo deu aos mencionados homens ciência, para ser por eles honrado nas suas maravilhas. Curando com estes mitigará a dor, e o farmacêutico fará perfumes suaves e comporá unguentos saudáveis, e não terá fim as suas obras”.

(Eclesiástico 38, 4-7)

A Deus,

*agradeço-o por ter me dado
oportunidades e a força necessária
para seguir neste caminho e merecer
este grau; embora eu nunca possa ser
suficientemente grata pela conquista
de meu futuro.*

À minha família,

*para minha mãe Genydes, meu pai
Luiz e minha irmã Vera: a cada
vitória que esta carreira me
proporcionar, estarão vocês por detrás
dela, como estiveram em todos os
momentos de minha vida.*

— BIBLIOTECA
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Universidade de São Paulo

*À Profa. Dra. Maria Vitória Lopes
Badra Bentley,*

*pela oportunidade de realização e
crescimento na carreira científica,
por me acolher com amizade em seu
grupo de trabalho,
pela orientação cuidadosa e dedicada,*

Muito obrigada!

AGRADECIMENTOS

A todos os amigos do LABORATÓRIO DE FARMACOTÉCNICA E TECNOLOGIA FARMACÊUTICA do Departamento de Ciências Farmacêuticas da FCFRP-USP, pela amizade, apoio, colaboração e auxílios prestados.

Ao colega de trabalho e amigo *Eduardo Ricci Júnior*, pela sua participação e auxílio nos experimentos, pelas sugestões e apoio nos momentos mais difíceis.

Ao colega *Glauco Henrique Balthazar Nardotto* pela sua disponibilidade e colaboração em experimentos.

Aos amigos do LABORATÓRIO DE FOTOQUÍMICA E QUÍMICA ORGÂNICA do Departamento de Química da FFCLRP-USP, pela colaboração e auxílios prestados.

Ao Prof. Dr. *Antonio Cláudio Tedesco* do Departamento de Química da FFCLRP- USP, pela colaboração e pelos equipamentos utilizados durante este trabalho.

À Prof^a Dr^a *Dionéia Camilo R. de Oliveira*, do Departamento de Física e Química, da FCFRP – USP, pela colaboração e dicas valiosas.

Aos funcionários da SESSÃO DE PÓS-GRADUAÇÃO em Fármacos e Medicamentos da FCF- USP, *Elizabete Paiva*, *Elaine Midori*, e *Jorge de Lima*, pelo excelente trabalho prestado.

À FAPESP pelo financiamento do projeto e bolsa de Doutorado.

A todos que direta ou indiretamente colaboraram para a realização deste trabalho.

LISTA DE ABREVIATURAS

5-ALA	⇔ ácido 5-aminolevulínico
AAC	área abaixo da curva
AO	⇔ ácido oléico
CCB	⇔ carcinoma de células basais
CCE	⇔ carcinoma de células escamosas
CV	⇔ coeficiente de variação
E	⇔ exatidão
EC	⇔ estrato córneo
K	⇔ coeficiente de partilha
$K_{EC/A}$	⇔ coeficiente de partilha estrato córneo/água
$K_{O/A}$	⇔ coeficiente de partilha óleo/água
$K_{P/A}$	⇔ coeficiente de partilha pele/água
ng/mL	⇔ nanogramas por mililitro
p/p	⇔ peso por peso
p/v	⇔ peso por volume
PG	⇔ propilenoglicol
PpIX	⇔ protoporfirina IX
TFD	⇔ Terapia Fotodinâmica
λ	⇔ Comprimento de onda
$\mu\text{g/mL}$	⇔ microgramas por mililitro
$^1\text{O}_2$	⇔ oxigênio singlete

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Preparo das soluções aquosas de 5-ALA e seus ésteres a 100 µg/mL para a determinação dos comprimentos de onda (λ) de emissão em espectrofluorímetro.....	42
Tabela 2	Valores de Intensidade de fluorescência e desvios padrão dos derivados fluorescentes do 5-ALA, em diferentes concentrações, determinados por espectrofluorimetria.....	60
Tabela 3	Avaliação da precisão e exatidão intra-ensaio para o 5-ALA.....	62
Tabela 4	Avaliação da precisão e exatidão inter-ensaio para o 5-ALA.....	62
Tabela 5	Valores de Intensidade de fluorescência (µg/mL) e desvios padrão dos derivados fluorescentes de ALA n-Hexil e ALA n-octil éster determinados por espectrofluorimetria.....	64
Tabela 6	Resultados referentes aos parâmetros físico-químicos do 5-ALA e de seus ésteres.....	67
Tabela 7	Valores de fluxo J (µg/cm ² /hora) para o 5-ALA.....	77
Tabela 8	Resumo dos dados estatísticos dos estudos <i>in vitro</i> de permeação e retenção cutâneas do 5-ALA (1% p/p) para diferentes concentrações de AO em PG, após 12 horas de experimento com pele de porco.....	79
Tabela 9	Parâmetros analíticos obtidos para a elaboração da curva analítica de PpIX em metanol/ água (9:1) por fluorimetria.....	81
Tabela 10	Avaliação da precisão e exatidão intra-ensaio para a PpIX.....	84
Tabela 11	Avaliação da precisão e exatidão inter-ensaio para a PpIX.....	84
Tabela 12	Valores de PpIX extraída, induzida por 5-ALA e AO em PG, extraída de peles de camundongo sem pêlo, após 4 horas de aplicação tópica <i>in vivo</i> das formulações.....	85
Tabela 13	Valores de intensidade de fluorescência da PpIX <i>in vivo</i> medidos por dispositivo de fibra óptica, após aplicação dos controles e formulações.....	88
Tabela 14	Valores de intensidade de fluorescência da PpIX <i>in vivo</i> medidos por dispositivo de fibra óptica, de 30 minutos a 24 horas após aplicação do controle e formulação.....	91
Tabela 15	Valores das áreas abaixo das curvas de cinética da PpIX <i>in vivo</i> medidos por dispositivo de fibra óptica, de 30 minutos a 24 horas após aplicação do controle e formulação.....	92

LISTA DE FIGURAS

Figura 01	Esquema de tratamento da Terapia Fotodinâmica.....	03
Figura 02	Fórmula molecular do 5-ALA e dos seus derivados esterificados.....	12
Figura 03	Representação esquemática da biossíntese do heme. O 5-ALA aplicado exogenamente supera o controle de feedback negativo do heme na formação intracelular de 5-ALA, levando ao acúmulo de PpIX.....	14
Figura 04	Representação esquemática da aplicação da TFD-5 ALA tópica.....	15
Figura 05	Fórmula molecular do ácido oléico.....	25
Figura 06	Célula de difusão vertical empregada nos estudos <i>in vitro</i> de permeação cutânea.....	47
Figura 07	Esquema da metodologia da extração da PpIX após aplicação dos controles e formulações em modelo animal <i>in vivo</i>	52
Figura 08	Esquema da metodologia para a determinação <i>in vivo</i> da fluorescência da PpIX induzida por 5-ALA em peles sadias de camundongo sem pêlo, utilizando dispositivo de fibra óptica.....	54
Figura 09	Esquema da metodologia para a avaliação da cinética de acúmulo/degradação da PpIX <i>in vivo</i> em peles sadias de camundongo sem pêlo, utilizando dispositivo de fibra óptica.....	57
Figura 10	Espectro de emissão do derivado fluorescente de 5ALA.....	59
Figura 11	Curva analítica do 5-ALA em água destilada, após derivação.....	61
Figura 12	Espectros de emissão dos derivados fluorescentes dos ésteres ALA n-hexil e ALA n-octil.....	63
Figura 13	Curva analítica do ALA- n hexil éster.....	65
Figura 14	Curva analítica do ALA- n octil éster.....	66
Figura 15	Valores de K: $K_{O/A}$, $K_{P/A}$ e $K_{EC/A}$ do 5-ALA e de seus ésteres.....	67
Figura 16	Quantidade de 5-ALA permeado ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$) através de pele de porco, a partir de uma solução em PG e mistura de ceramida (2% p/p) em PG em função do tempo (horas).....	68

Figura 17	Quantidade de 5-ALA ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$) retida no EC e retida na [epiderme + derme] após 16 horas de estudo de permeação <i>in vitro</i>	69
Figura 18	Quantidade de ALA n-hexil éster permeado ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$) através de pele de porco, a partir de uma solução em PG e mistura de ceramida a 2 % p/p em PG em função do tempo (horas).....	70
Figura 19	Quantidade de 5-ALA hexil éster ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$) retida no EC e na [epiderme + derme] após 16 horas de estudo de permeação <i>in vitro</i>	71
Figura 20	Quantidade de ALA n-octil éster permeado ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$) através de pele de porco, a partir de uma solução em propilenoglicol e mistura de ceramida + ALA n-octil éster em função do tempo (horas).....	72
Figura 21	Quantidade de 5-ALA octil éster ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$) retida no EC e na [epiderme + derme] após 16 horas de estudo de permeação <i>in vitro</i>	73
Figura 22	Quantidade de ALA n-hexil permeado ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$) através de pele de porco, a partir de uma solução em PG e formulação contendo AO 5% em função do tempo (horas).....	74
Figura 23	Quantidade de 5-ALA hexil éster ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$) retida no EC e na [epiderme + derme] após 12 horas de estudo de permeação <i>in vitro</i>	75
Figura 24	Quantidade de 5-ALA permeado ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$) através de pele de porco, a partir de uma solução em propilenoglicol e formulações contendo AO 2,5 %, 5% e 10% em propilenoglicol em função do tempo (horas).....	76
Figura 25	Quantidade de 5-ALA (μg) retida no EC e retida na [epiderme + derme] após 12 horas de estudo de permeação <i>in vitro</i>	78
Figura 26	Espectro de emissão de fluorescência da PpIX em metanol/água (v/v=9:1).....	80
Figura 27	Espectros de emissão de fluorescência da PpIX.....	82
Figura 28	Curva analítica para a PpIX em metanol/ água (9:1).....	83

Figura 29	PpIX extraída das peles de camundongo sem pêlo após 4 horas de aplicação tópica <i>in vivo</i> das formulações contendo 5-ALA e AO (2,5%, 5% e 10%) em PG. Controles.....	86
Figura 30	Espectros de emissão de fluorescência da PpIX induzida por 5-ALA a partir dos controles e formulações (5-ALA 1% + AO 5% ou AO 10% em PG) aplicadas em peles sadias de camundongos sem pêlo.	87
Figura 31	Valores de intensidade de fluorescência <i>in vivo</i> da PpIX induzida por 5-ALA a partir dos controles e formulações (5-ALA 1% + AO 5% em PG e 5-ALA 1% + AO 10% em PG) utilizando dispositivo de fibra óptica.....	89
Figura 32	Valores de intensidade de fluorescência <i>in vivo</i> da PpIX induzida por 5-ALA a partir do controle (pele tratada com 5-ALA 1% em PG) e formulação (5-ALA 1% + AO 10% em PG) utilizando dispositivo de fibra óptica. Valores medidos a partir de 30 minutos até 24 horas após a aplicação das formulações controle e teste.....	90
Figura 33	Formação do derivado fluorescente de 5-ALA pela reação de mesmo com acetilacetona e formaldeído.....	94

SUMÁRIO

1. Introdução.....	01
2. Revisão da Literatura.....	08
3. Objetivos.....	35
4. Material e Métodos.....	37
4.1. Material	
4.1.1.Fármacos.....	38
4.1.2.Solventes, reagentes e Matérias-primas.....	38
4.1.3.Equipamentos e Acessórios.....	38
4.1.4.Animais de laboratório.....	39
4.2. Métodos	
4.2.1. Padronização da metodologia analítica para a quantificação do 5-ALA por espectrofluorimetria.....	39
4.2.2.Determinação da linearidade do método para ALA n-hexil éster e ALA n-octil éster.....	42
4.2.3.Caracterização dos parâmetros físico-químicos de 5-ALA e derivados ésteres ALA n- hexil e ALA n-octil.....	43
4.2.4. Estudos de permeação e retenção <i>in vitro</i> para as diferentes formulações contendo 5-ALA, ALA n-hexil e ALA n-octil éster através de pele de porco.....	45
4.2.5. Quantificação <i>in vitro</i> da PpIX induzida por 5-ALA em peles sadias de camundongos sem pêlo.....	49
4.2.6. Avaliação do acúmulo de PpIX <i>in vivo</i> utilizando espectroscopia de fluorescência através de dispositivo de fibra óptica em peles sadias de camundongos sem pêlo.....	53
4.2.7. Estudo da cinética de degradação da PpIX após a aplicação das formulações contendo 5-ALA + ácido oléico (AO).....	55
5. Resultados.....	58
5.1. Padronização da Metodologia para quantificação do 5-ALA por espectrofluorimetria.....	59
5.1.1. Determinação do λ de emissão dos derivados fluorescentes do 5-ALA em espectrofluorímetro.....	59
5.1.2. Determinação da linearidade do método- Obtenção da curva analítica para o 5-ALA.....	60

5.1.3. Determinação da precisão e exatidão intra e inter-ensaios do método de espectrofluorimetria para o 5-ALA.....	62
5.2. Determinação da linearidade do método para os derivados esterificados ALA n-hexil e ALA n-octil éster.....	63
5.2.1 Determinação do λ de emissão dos derivados fluorescentes de ALA n-hexil e ALA n-octil éster em espectrofluorímetro.....	63
5.2.2. Obtenção das curvas analíticas para os fármacos ALA n-hexil e ALA n-octil éster.....	64
5.3. Caracterização dos parâmetros físico-químicos de 5-ALA e de seus ésteres.....	66
5.4. Estudos <i>in vitro</i> de permeação e retenção cutâneas de 5-ALA e de seus ésteres.....	68
5.4.1. Estudos de permeação e retenção cutâneas <i>in vitro</i> para a mistura de 5-ALA + Ceramida.....	68
5.4.2. Estudos de permeação e retenção cutâneas <i>in vitro</i> para a mistura de ceramida + ALA n-hexil éster.....	70
5.4.3. Estudos de permeação e retenção cutâneas <i>in vitro</i> para a mistura ceramida + ALA n-octil éster.....	72
5.4.4. Estudos de permeação e retenção cutâneas <i>in vitro</i> para as formulações de ALA n-hexil éster + ácido oléico (AO) em PG.....	74
5.4.5. Estudos de permeação e retenção cutâneas <i>in vitro</i> para as formulações de 5-ALA + AO em diferentes concentrações (2,5%, 5% e 10% p/p) em PG.....	76
5.5. Metodologia para a quantificação <i>in vitro</i> da PpIX induzida por 5-ALA em peles de camundongo sem pêlo.....	80
5.5.1. Determinação do λ de emissão de fluorescência da PpIX e obtenção das curvas analíticas da PpIX.....	80
5.5.2. Curvas analíticas da PpIX em metanol/água.....	81
5.5.3. Determinação da precisão e exatidão intra e inter-ensaios do método de espectrofluorimetria para a PpIX.....	84
5.5.4. Extração da PpIX dos tecidos após a aplicação das formulações contendo 5-ALA e AO (2,5%, 5% e 10%) em PG.....	85
5.6. Determinação <i>in vivo</i> da PpIX induzida por 5-ALA a partir da formulação contendo 5-ALA (1%) + ácido oléico (AO) a 5% e 10% (p/p) em PG, em peles de camundongos sem pêlo, utilizando dispositivo de fibra óptica.....	87

5.7. Estudo da cinética de acúmulo e degradação da PpIX <i>in vivo</i> , após a aplicação das formulações contendo 5-ALA 1% (p/p)+ AO 10% (p/p) em PG.....	90
6. Discussão.....	93
7. Conclusões.....	111
8. Referências	
Bibliográficas.....	115
9. Resumo.....	129
10. Abstract.....	131

1. INTRODUÇÃO

A radiação solar, especialmente a UVB, é reconhecidamente carcinogênica para o homem, e constitui a principal causa do aparecimento de neoplasmas cutâneos (WOODHEAD et al., 1999; GREEN et al., 1999).

O tipo de neoplasma maligno mais comum é o câncer de pele não-melanoma e recentes evidências indicam que sua incidência está aumentando rapidamente (HANNUKSELA-SVAHN et al., 1999). Vários fatores são conhecidos para este tipo de câncer de pele, podendo-se citar, entre outros: a radiação ultravioleta, a radiação ionizante e a exposição ao arsênico (GOTTLOBER et al., 1999; BARON AND GREENBERG, 2000). Os fatores fenotípicos tais como o tipo de pele, a cor do cabelo e olhos, a tendência a se queimar ou bronzear, a presença de sardas, a história pessoal ou familiar de câncer de pele e a exposição ocupacional ao sol, podem também representar fatores de risco (CUMMINGS et al., 1997).

O câncer de pele tipo não- melanoma (carcinoma de células basais- CCB e carcinoma de células escamosas- CCE) representa a resposta fenotípica mais grave à radiação solar, embora não seja usualmente letal. O processo de fotocarcinogênese representa a soma de eventos bioquímicos simultâneos e seqüenciais, que conduzem à ocorrência do câncer de pele. Estes eventos são iniciados pela radiação UV e dependem da dose de radiação recebida, do tempo de exposição e do comprimento de onda (BLACK et al., 1997). Enquanto a exposição acumulativa ao sol é provavelmente o fator mais importante para o desenvolvimento de câncer de pele, a predisposição genética é igualmente destacada.

Um tratamento seletivo e não-invasivo, a **Terapia Fotodinâmica** (TFD), tem sido introduzido clinicamente, tanto para a visualização do tumor (fotodeteção de fluorescência) ou destruição local de tumores malignos e lesões pré-malignas. A TFD tem sido utilizada em várias doenças envolvendo a pele e órgãos que podem ser alcançados pela luz. A TFD consiste basicamente da administração intratumoral, sistêmica ou tópica de substâncias fotossensibilizantes, as quais se localizam no tecido tumoral. Após a incidência de luz de comprimento de onda e dose apropriados, podem produzir a destruição do tecido. A combinação do fotossensibilizador e luz produzem oxigênio singlete, que por sua vez, causa a apoptose tecidual. A TFD resulta na destruição seletiva

do tumor uma vez que o fotossensibilizador mostra uma predileção para as células tumorais (FRITISCH et al., 1997). A **Figura 1** representa o tratamento clínico da TFD.

BIBLIOTECA
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Universidade de São Paulo

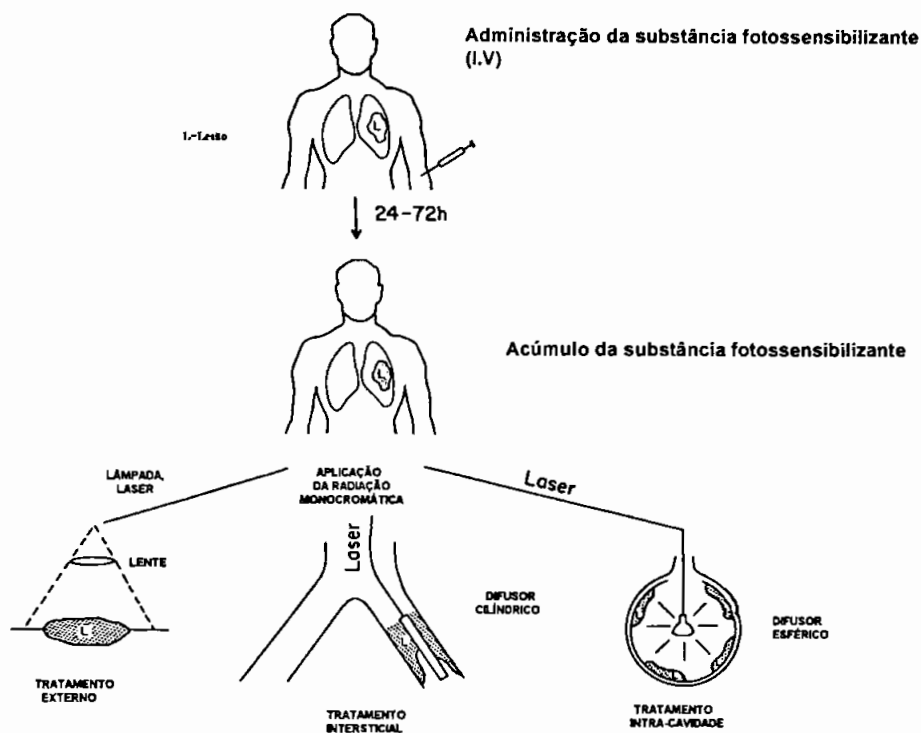


FIGURA 01: Esquema de tratamento da Terapia Fotodinâmica (HENDERSON & DOUGHERTY, 1992).

Inicialmente, foram utilizados corantes como substâncias fotossensibilizadoras (ex: eosina ou acridina). Porém, devido ao fato de apresentarem toxicidade e carcinogenicidade, a pesquisa de novas substâncias se tornou necessária. Nos últimos anos a potencialidade do uso de substâncias fotossensibilizantes como agentes no tratamento fotoquímico de tecidos tumorais vem sendo extensivamente investigada (DOUGHERTY & POTTER, 1991; KODERHOLD et al., 1996; OCHSNER, 1997; FRITISCH et al., 1998). As porfirinas, como a hematoporfirina, têm sido administradas sistemicamente desde 1913, mostrando

uma boa captação em diferentes tumores e promovendo um efeito suficiente para a TFD após a irradiação de luz. A principal desvantagem na aplicação sistêmica destas substâncias é a fotossensibilidade cutânea mais ou menos prolongada (DOUGHERTY et al., 1990). Assim sendo, os pacientes correm os riscos de reações fototóxicas acidentais intensas durante o período de tratamento. Para evitar este sério efeito colateral, atenção especial tem sido dada à *aplicação tópica dos fotossensibilizadores*, especialmente em dermatologia. A aplicação tópica em tumores superficiais oferece, portanto, uma alternativa à injeção intravenosa.

Uma estratégia mais recente envolve a aplicação do ácido 5-aminolevulínico (5-ALA) no tratamento de lesões cutâneas (pré) cancerosas a fim de estimular a formação *in situ* de protoporfirina IX (PpIX), uma substância de conhecida propriedade fotossensibilizante. A aplicação tópica de 5-ALA constitui a via de administração de escolha devido ao fato de ser um método comum de tratamento de tumores de pele e apresenta vantagens sobre a administração i.v, pois evita a sensibilização sistêmica; além disso, altas concentrações sistêmicas podem ser neurotóxicas (SHANLEY et al., 1975; EMANUELLI et al., 2001). A TFD usando 5-ALA, topicamente, tem mostrado ser altamente eficiente no tratamento de tumores cutâneos pela formação de porfirinas endógenas como fotossensibilizadores (KENNEDY & POTTIER, 1992; ABELS et al., 1997; FINK-PUCHES et al., 1998; WANG et al., 1999).

Em contraste com as porfirinas, as quais são moléculas grandes, incapazes de penetrar na pele em quantidades relevantes quando aplicadas topicamente, o 5-ALA, sendo uma molécula pequena, pode penetrar com mais facilidade na camada córnea anormal ou cancerosa, enquanto a pele normal parece relativamente impenetrável (PENG et al., 1997a).

O 5-ALA tem sido considerado um fármaco potencial para uso na TFD tópica, uma vez que é precursor de porfirina endógena. É o primeiro intermediário no caminho biossintético do heme, formado *in vivo* na mitocôndria pela condensação da glicina e succinil Co-A. No citosol, duas moléculas de 5-ALA são combinadas para formar porfobilinogênio (PBG) e quatro moléculas de PBG são então combinadas para formar uroporfirinogênio. Este é então convertido em coproporfirinogênio, que após a sua recaptação pela mitocôndria é transformado

pela enzima *coproporphirinogênio oxidase* a protoporfirina IX (PpIX). Este último é o precursor imediato do grupo heme.

Enquanto anormalidades metabólicas na via biossintética do heme podem causar doenças do grupo das *Porfirias* - onde o acúmulo de certos intermediários como PpIX está associado com severas reações sistêmicas fototóxicas - um acúmulo de PpIX *induzido exogenamente* pode ser usado para propostas terapêuticas. Como já conhecido, as porfirinas apresentam propriedades foto-ópticas, ou seja, quando excitadas pela luz, são capazes de ter ação fotodinâmica. A ativação das porfirinas pela luz causa danos celulares significantes para a mitocôndria, membranas plasmática e lisossomas, bem como a ativação do sistema complemento. A maior parte da PpIX induzida pelo 5-ALA se localiza na mitocôndria e a causa primária de morte celular após TFD é fototoxicidade mitocondrial (IINUMA et al., 1994).

Usualmente, a produção de 5-ALA é controlada por um mecanismo de *Feedback negativo*, no qual a presença de heme livre inibe a síntese de 5-ALA (KAPPAS et al., 1989). Se um excesso de 5-ALA é aplicado topicamente, este atravessa prontamente a epiderme anormal e supera o mecanismo de inibição por feedback, ou seja, é convertido dentro da mitocôndria a PpIX. Como a conversão de PpIX a heme é relativamente lenta, as células tendem a acumular concentrações fotossensibilizadoras de PpIX (KENNEDY AND POTTIER, 1992). Além disso, as células tumorais apresentam uma atividade metabólica alta, e assim, produzem mais PpIX (REIBEZ et al., 1992).

A distribuição do 5-ALA topicamente aplicado na pele é dependente de muitos parâmetros, tais como permeabilidade através do EC, difusão através da derme e epiderme, tempo de eliminação do fármaco e taxa de conversão do 5-ALA em PpIX (SVAASAND et al., 1996b). A profundidade de penetração limitada das moléculas de 5-ALA na pele é a maior desvantagem da aplicação tópica (SZEIMIES et al., 1994; KLOECK et al., 1998).

Assim, esta modalidade parece ser limitada à quantidade de 5-ALA que atinge as células alvo ou pela penetração tecidual e pela distribuição da PpIX resultante no tecido alvo. Quase todas estas possíveis desvantagens em relação ao uso de 5-ALA podem ser atribuídas às propriedades físico-químicas da molécula. Aplicado sob condições fisiológicas, 5-ALA é um *zwitterion*, ou seja,

apresenta carga positiva no grupamento amino e negativa no grupamento carboxílico (Novo et al, 1996).

Devido à bicamada lipídica das membranas biológicas serem relativamente impermeáveis às moléculas carregadas, a captação celular de 5-ALA é superficial. Conseqüentemente, objetivando o seu transporte através das membranas celulares, altas concentrações de 5-ALA e tempos de administração mais prolongados devem ser utilizados. Esta deficiência resulta em uma baixa profundidade de penetração do 5-ALA e em uma distribuição de PpIX não otimizada para a TFD nas *camadas mais profundas de lesões nodulares* após a aplicação tópica de 5-ALA (PENG et al., 1995). Por exemplo, tumores recobertos por uma camada epitelial normal (áreas hiperqueratóticas) inibem a penetração de 5-ALA, causando tumores residuais (THISSEN et al., 2000). Entretanto, a eficácia de 5-ALA-TFD pode ser melhorada pelo desenvolvimento de sistemas de liberação de fármacos adequados e/ou alteradores da permeabilidade cutânea, além da modificação de fatores importantes a serem definidos para a TFD tópica (DE ROSA & BENTLEY, 2000).

Várias tentativas têm sido feitas para aumentar a penetração de 5-ALA na pele utilizando diferentes métodos e alguns têm sido aplicados com sucesso (PENG ET AL., 1997b). A pesquisa de derivados do 5-ALA mais lipofílicos é uma interessante estratégia, pois devem penetrar mais facilmente através da camada queratinizada e em tumores de pele mais profundos em comparação ao 5-ALA. A atividade das esterases nas células e tecidos induz à clivagem dos derivados esterificados à 5-ALA, o qual por sua vez é convertido em PpIX. (KLOECK & VAN HENEGOUWEN, 1996).

A utilização de *sistemas de liberação de fármacos* constitui uma outra técnica a ser explorada para melhorar a eficiência da TFD- 5-ALA tópica, a qual possa proporcionar um aumento na penetração e da concentração de 5-ALA nos tecidos tumorais, uma vez que a atividade do fotossensibilizador ativado é dependente da sua concentração no tecido alvo.

Dentre os métodos para melhorar a penetração de 5-ALA na pele, está a utilização de promotores de penetração (HARTH et al., 1998; SCHOENFELD et al., 1994; DE ROSA et al., 2000), tendo interesse neste trabalho o estudo de formulações de 5-ALA 1% (p/p) contendo ácido oléico (AO).

Uma vez que o sucesso da TFD tópica está relacionado à localização e ao acúmulo de fotossensibilizadores ou precursores destes no tecido tumoral, o desenvolvimento farmacotécnico direcionado à otimização da liberação destes fármacos no tecido alvo, constitui uma interessante estratégia para a otimização da TFD tópica do câncer de pele.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1. Câncer de pele e Terapia Fotodinâmica (TFD)

A luz têm sido utilizada no tratamento de doenças desde a Antigüidade. Muitas civilizações antigas utilizavam a fototerapia, mas somente nas últimas décadas esta forma de terapia reapareceu. Seguida das descobertas científicas dos pioneiros, a combinação da administração de luz e fármacos fez surgir a fotoquimioterapia como instrumento terapêutico. O isolamento das porfirinas e a subsequente descoberta de suas propriedades localizadoras nos tumores e os efeitos fototóxicos no tecido tumoral conduziram ao desenvolvimento da fotodeteção (FD) e da terapia fotodinâmica (TFD) (ACKROYD et al., 2001).

Os lasers têm sido utilizados como fontes de luz para o tratamento de vários tipos de câncer. A cirurgia por laser é um tratamento padrão como por exemplo, para certos estágios de câncer de glote (corda vocal), cervical, pele, pulmão, vaginal e peniano. O termo laser significa "amplificação da luz por emissão estimulada de radiação". A luz comum apresenta comprimentos de onda variados, e espalha a luz em todas as direções. Por outro lado, a luz laser apresenta específico comprimento de onda e é focada em um feixe coerente. Este tipo de luz de alta intensidade contém alta energia, e embora haja diferentes tipos de lasers, somente três tipos têm aplicações na medicina: laser de dióxido de carbono (CO₂), Nd YAG (neodymium yttrium-aluminium-garnet) e laser de argônio, sendo este último utilizado para a TFD (KARRER et al., 2001).

A terapia com laser envolve o uso de luz de alta intensidade para destruir as células cancerosas e pode ser utilizada de dois modos a fim de tratar o câncer: reduzindo ou destruindo o tumor pelo calor, ou pela ativação de um agente químico, conhecido como fotossensibilizador, aplicado anteriormente. Em termos gerais, na TFD, o agente fotossensibilizante é retido nas células cancerosas e então é estimulado pela luz de comprimento de onda de absorção máxima para o fotossensibilizador, desencadeando várias reações que irão causar a destruição do tumor.

A terapia tumoral se tornou uma indicação comum para a utilização dos lasers, e muitos pacientes podem ser beneficiados por este tipo de tratamento para tumores de pele pré-malignos e malignos. Os tumores de pele podem ser

tratados com excisão, coagulação por laser, vaporização por laser, ou pela moderna TFD (ZEITOUNI et al., 2001).

A TFD, portanto, é baseada na fotossensibilização do tecido alvo por fotossensibilizadores sistêmicos ou tópicos e a subsequente irradiação com luz de uma fonte de luz coerente (luz laser) ou uma luz incoerente (lâmpada comum) induzindo a morte celular por meio da produção de espécies de oxigênio reativas (TAYLOR & BROWN, 2002).

Este novo tratamento vem sendo utilizado nos últimos anos nos maiores centros de tratamento de câncer do mundo (GIBSON et al., 1997) em uma grande variedade de doenças neoplásicas e seu uso está direcionado principalmente, para tumores pequenos e superficiais. Consiste na administração intratumoral, sistêmica ou tópica de uma substância fotossensibilizante, seguido por um período de 4 a 72 horas, dependendo da farmacocinética da substância, a fim de permitir seu acúmulo nos tumores e subsequente irradiação de luz visível na lesão. Ocorre então a absorção de fótons pela substância e é iniciada uma reação fotoquímica, produzindo usualmente oxigênio singlete ($^1\text{O}_2$), o qual resulta em citotoxicidade e necrose da lesão (GIBSON et al., 1984).

Após absorção da luz pelo agente fotossensibilizador na presença de oxigênio (usualmente presente no meio), vários processos fotofísicos envolvendo espécies reativas excitadas induzem a produção de espécies reativas de oxigênio ($^1\text{O}_2$, $^{\bullet}\text{O}_2$, $^{\bullet}\text{OH}$ e H_2O_2 , definidas como EROs) que atacam centros específicos dentro dos sistemas celulares, desencadeando a morte dos tecidos ou apoptose celular (GOTTFRIED et al., 1988).

O câncer de pele é uma doença muito comum em seres humanos e a maior parte dos cânceres de pele tipo não-melanoma são representados por duas alterações epiteliais: carcinoma de células basais (CCB) e carcinoma de células escamosas (CCE), sendo que a incidência destes tem aumentado muito nos últimos anos (THISSEN et al., 1999).

O câncer de pele tipo CCB é o mais comum, compreendendo 80% dos casos, e as metástases são raras, ocorrendo mortalidade somente em 0,03% dos casos. O CCB se desenvolve a partir da camada basal da epiderme e apêndices epidérmicos, e o caráter maligno depende do crescimento destrutivo do tumor

primário, em vez de metástase. A maioria dos CCBs desenvolve-se em áreas faciais e ocorrem principalmente em pessoas jovens e aquelas com síndrome de imunodeficiência (THISSEN et al., 1999).

O tratamento depende do tamanho, da localização e do padrão histológico do tumor. Para a maioria dos CCBs nodulares pequenos, presentes em áreas onde a conservação dos tecidos não é um problema, a eletrodissecação e a curetagem produzem a cura de aproximadamente 90%. Para tumores grandes, a cirurgia de excisão é o tratamento de escolha. O CCB é radiosensível, portanto a radioterapia é o tratamento de opção para pacientes que recusam cirurgia.

Já o CCE compreende 20% do câncer de pele tipo não-melanoma, apresentando metástase estimada ao redor de 2-3% (EDDY, 2000). Oitenta por cento dos CCE ocorrem na face, cabeça e pescoço, com alguma variação entre os sexos. O nariz e as pernas são mais facilmente afetados nas mulheres e nariz e orelhas no homem. O potencial metastático total é estimado ser 3,6% a 30% com significativa variação, com tumores de lábios, orelhas, pênis e vulva. Tumores grandes têm altas taxas de metástase e, conseqüentemente, menores taxas de sobrevivência. Algumas doenças estão associadas com um aumento no risco de CCE, como por exemplo, queimaduras, osteomielites, úlceras crônicas, lúpus eritematoso, imunossupressão, xeroderma pigmentoso, albinismo, etc. Também alguns fatores de risco para o aparecimento de CCE podem ser considerados: radiação, ciclosporina, psoraleno e fototerapia de ultravioleta A, papiloma vírus humano e exposição ao arsênico. Para o tratamento de CCE, a excisão cirúrgica ainda é o tratamento de escolha (SKIDMORE et al., 1998).

A TFD tem sido aplicada nestes casos, principalmente usando um pró-fármaco, o ácido 5-aminolevulínico (5-ALA), sistemicamente ou principalmente aplicado topicamente na pele tumoral, mostrando bons resultados para a queratose actínica, carcinoma superficial das células basais (CCB), carcinoma de células escamosas (CCE) e doença de Bowen (KARRER et al., 2001).

2.1.1. TFD tópica e ácido 5-aminolevulínico

Entre os vários fotossensibilizadores e precursores da biossíntese do grupo heme que podem ser empregados na TFD tópica, os mais promissores para a dermatologia, são 5-ALA ou seus derivados ésteres (**Figura 2**). O 5-ALA tem apresentado bons resultados clínicos em condições pré-cancerosas e em câncer de pele e, até mesmo, em aplicações não tumorais como psoríase, doenças induzidas por vírus ou acne vulgar (LANG et al., 2001).

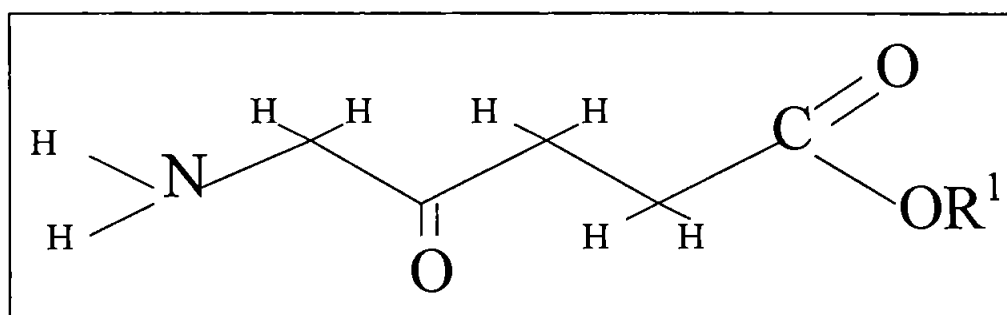


FIGURA 2: Fórmula molecular do 5-ALA e dos seus derivados esterificados: $R_1 = H$ (5-ALA), $R_1 = CH_3$ (ALA n-metil éster), $R_1 = (CH_2)_3CH_3$ (ALA n- butil éster), $R_1 = (CH_2)_5CH_3$ (ALA n- hexil éster), $R_1 = (CH_2)_7CH_3$ (ALA n-octil éster).

A TFD-5-ALA tópica nestes casos, oferece as vantagens de ser não-invasiva, bem tolerada e poupando os tecidos ao redor do tumor, permanecendo estes intactos e funcionais. Esta modalidade terapêutica tem sido particularmente útil para tumores grandes superficiais e para lesões em áreas anatômicas onde o desfiguramento causado pelas terapias convencionais pode apresentar sérios inconvenientes ao paciente. Assim sendo, o desenvolvimento de potentes fontes de lasers juntamente com a aplicação tópica do fotossensibilizador, faz da TFD-5-ALA tópica uma alternativa mais facilmente acessível (MORTON, 2001).

O uso de 5-ALA como precursor na biossíntese da PpIX e sua utilização na TFD tem tido especial atenção para o *tratamento tópico de câncer de pele*, devido às principais vantagens: (i) proporciona o acúmulo seletivo de PpIX, ou

seja, cerca de 95% do conteúdo de porfirina do tecido após aplicação de 5-ALA tem se mostrado ser de PpIX; (ii) o risco de toxicidade é limitado a um período de 24 horas, evitando, assim, o efeito de fotossensibilização da pele, pois a PpIX e outros intermediários são rapidamente eliminados do organismo (WEBBER et al., 1997a); (iii) topicamente aplicado, 5-ALA é captado preferencialmente pelo tecido neoplásico, que apresenta estrato córneo (EC) anormal, porém sua penetração é dificultada através da epiderme normal ao redor, permitindo a fotossensibilização seletiva de tumores da pele (STENDER et al., 1997).

A aplicação exógena de 5-ALA seguido por irradiação usando luz laser não-ionizante na região de comprimento de onda visível, leva a um aumento da produção de porfirina endógena, particularmente a Protoporfirina IX (PpIX), o fotossensibilizador que levará à apoptose celular e conseqüentemente, à morte das células cancerosas. A PpIX é altamente fluorescente e fotodinamicamente ativa e precursora imediata do heme (KENEDY & POTTIER, 1992).

A **Figura 3** representa a biossíntese do grupo heme, a qual ocorre em todas as células nucleadas do organismo.

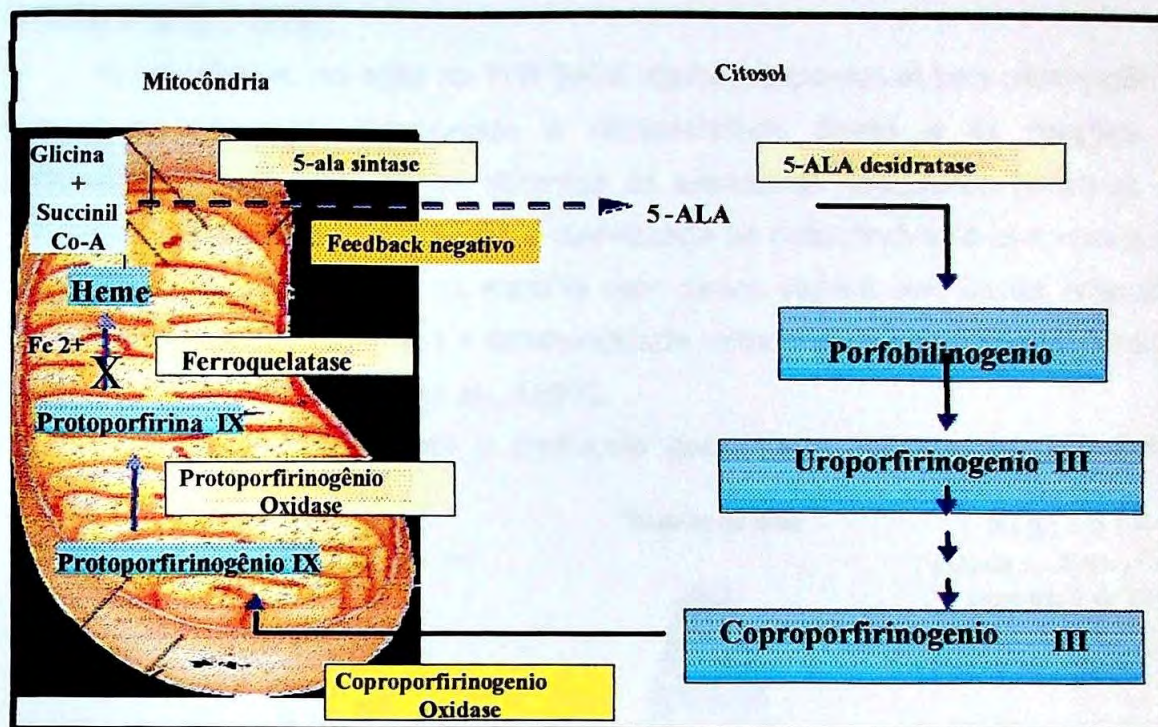


FIGURA 3: Representação esquemática da biossíntese do heme. O 5-ALA aplicado exogenamente supera o controle de *feedback* negativo do heme na formação intracelular de 5-ALA, levando ao acúmulo de PpIX.

O 5-ALA é o primeiro intermediário no ciclo. É formado na mitocôndria e não apresenta fluorescência. Já a PpIX, é uma molécula fotolábil que absorve luz na região do espectro ultravioleta (200-400 nm) e visível (400-700nm) (VAN DER VEEN et al., 1997). No tratamento de tumores, o pico de absorção ($\lambda \sim 635$ nm) é normalmente utilizado para excitação, devido à boa penetração da luz no tecido (TREPTE et al., 1994). Após a excitação, as moléculas de PpIX são transferidas do estado singleto para o tripleto por cruzamento intersistema (*intersystem crossing*). O oxigênio singleto (1O_2) é então formado, pela transferência de energia do estado tripleto da PpIX para uma molécula de oxigênio próxima, que está no seu estado tripleto fundamental (TREPTE et al., 1994). O 1O_2 assim formado parece ser o principal agente fototóxico na TFD-5-ALA. Porém, os danos biológicos podem também serem causados por outras espécies reativas de

oxigênio, como o ânion superóxido e o radical hidroxila, formadas pelo 1O_2 (FRITISCH et al., 1996).

O mecanismo de ação da TFD-5ALA tópica, responsável pela destruição do tumor, parece estar relacionado à citotoxicidade direta e às reações de inflamação aguda, com danos mínimos às estruturas vasculares (PENG et al., 1997a). A PpIX induzida por 5-ALA é sintetizada na mitocôndria, o que leva a um dano prematuro irreversível na mesma sem danos visíveis em outras organelas após a TFD, sugerindo, assim a fototoxicidade mitocondrial como causa primária da morte celular (GEDERAAS et al., 1999).

A **Figura 4** representa o protocolo geralmente aplicado na TFD-5-ALA tópica.

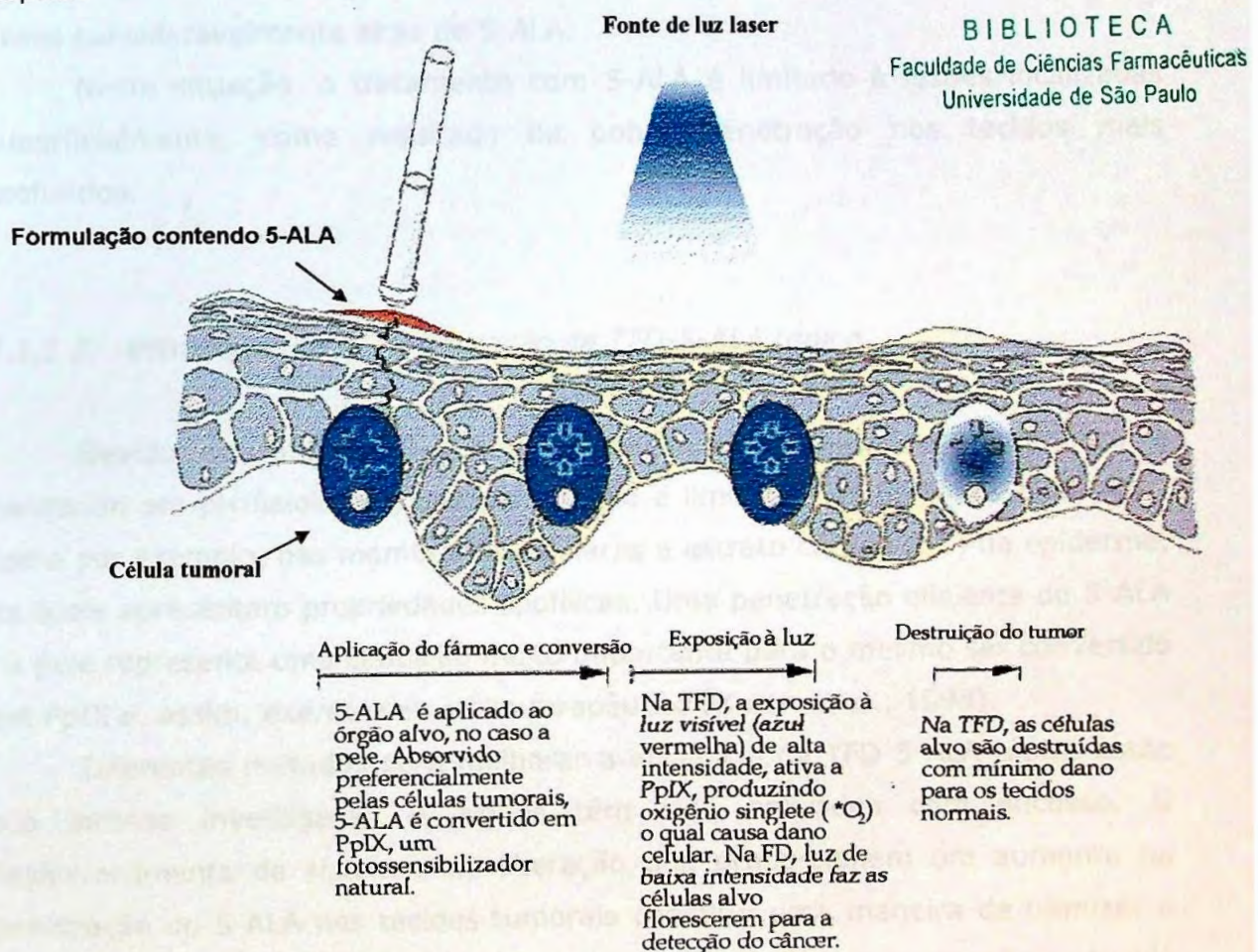


FIGURA 4: Representação esquemática da aplicação da TFD-5ALA tópica. 5-ALA: ácido 5-aminolevulínico; PpIX: protoporfirina IX; TFD: terapia fotodinâmica; FD: fotodeteção.

Apesar da seletividade do 5-ALA para o tecido neoplásico, alguns tipos de tumores de pele têm mostrado reincidências a longo prazo devido a: (i) alta hidrofília e características de carga do 5-ALA, pois devido a sua característica *zwitterion* em pH fisiológico tem-se uma baixa solubilidade em lipídeos, o que limita sua penetração na pele; (ii) penetração insuficiente e não homogênea de 5-ALA, principalmente em tumores que são cobertos por uma camada epitelial normal; (iii) tumores de pele espessos (mais de 2 mm) se mostram refratários à terapia, pois 5-ALA não penetra nesta profundidade (PENG et al., 1997). Assim, para atingir níveis clinicamente relevantes de PpIX, é necessário administrar doses consideravelmente altas de 5-ALA.

Nesta situação, o tratamento com 5-ALA é limitado à lesões localizadas superficialmente, como resultado da pobre penetração nos tecidos mais profundos.

2.1.1.2. Estratégias para a otimização da TFD-5-ALA tópica

Devido ao fato do 5-ALA ser uma molécula altamente hidrofílica e *zwitterion* em pH fisiológico, sua penetração é limitada nas barreiras biológicas, como por exemplo, nas membranas celulares e estrato córneo (EC) da epiderme, as quais apresentam propriedades lipofílicas. Uma penetração eficiente de 5-ALA na pele representa uma condição muito importante para o mesmo ser convertido em PpIX e, assim, exercer seu efeito terapêutico (KLOEK et al., 1998).

Diferentes métodos para melhorar a eficiência da TFD 5-ALA tópica estão sob intensa investigação e alguns têm sido aplicados com sucesso. O desenvolvimento de sistemas de liberação que proporcionem um aumento na penetração do 5-ALA nos tecidos tumorais constitui uma maneira de otimizar a TFD, uma vez que atividade da PpIX é dependente de sua concentração no tecido alvo (DE ROSA & BENTLEY, 2000). O aumento na penetração de fármacos pode ser alcançado variando a composição do veículo ou alterando a permeabilidade da pele. Várias estratégias vêm sendo utilizadas objetivando aumentar as

características de permeação do 5-ALA na pele, como por exemplo, modificações químicas na estrutura do fármaco, derivados éster (KLOEK et al., 1996; GAULLIER et al., 1997), uso de promotores de absorção cutânea (DEGIM et al.; 1999; DE ROSA et al., 2000; STELUTI et al., 2001), nanocolóides (HÜRLIMANN et al., 1998), emulsões (CASAS et al., 2001b), lipossomos (FUKUDA et al., 1989; PIERRE et al., 2001; YAROSHI, 2001) métodos físicos como iontoforese (RHODES et al., 1997; LOPEZ et al. 2001, 2003a,b) e sonoforese (MA et al 1998).

Também outros métodos como a redução da conversão da PpIX a heme pela utilização de quelantes do ferro como hidroxipiridinonas e desferrioxaminas, resultou em maior acúmulo de PpIX (KRIEGMAIR et al., 1994; CURNOW et al., 1998; BECH et al., 1997; BERG et al., 1996).

2.1.1.2.1. Derivados ésteres de 5-ALA

A limitada habilidade do 5-ALA para atravessar as membranas celulares, em especial o EC humano, devido a sua característica hidrofílica, pode ser superada pelo uso de ésteres lipofílicos de 5-ALA, os quais devem aumentar a captação celular de 5-ALA, resultando na síntese aumentada de PpIX. Vários derivados lipofílicos de 5-ALA tem sido sintetizados: metil-, etil-, n-propil-, n-butil-, pentil-, hexil-, octil-éster, bem como ALA-2- (hidroximetil) tetra hidrofuranil éster, N-acetil-ALA-etil-éster, etc (KLOECK et al., 1996, GAULLIER et al., 1997; WASHBROOK & RILEY, 1997; KLOECK et al., 1998).

Neste sentido, DE ROSA et al. (2003) recentemente verificaram que o ALA hexil éster apresenta melhor permeação e capacidade de induzir o acúmulo de PpIX *in vivo* em peles de camundongo sem pêlo, comparado aos outros ésteres.

Estudos recentes utilizando linhagem de células de hepatoma humano, mostram que o derivado ALA n-hexil éster foi muito mais eficiente na produção de PpIX e, conseqüentemente, na fototoxicidade do que o 5-ALA (REN et al., 2002).

Os efeitos fotodinâmicos induzidos por derivados esterificados de 5-ALA em cultura de células de carcinoma cervical humano foram estudados por XIANG et al. (2001). Os autores avaliaram o efeito dos derivados esterificados na

indução do fotossensibilizador endógeno, protoporfirina (PpIX) e o efeito fototóxico nas células estudadas. Verificou-se que uma maior produção de PpIX foi alcançada com concentrações de 1,3 a 13 vezes mais baixas dos ésteres de 5-ALA comparados ao 5-ALA, sendo que o efeito fototóxico foi mais pronunciado com o ALA n-hexil éster. Estes resultados indicam que uma otimização do efeito fotodinâmico pode ser alcançada utilizando doses muito baixas dos ésteres de 5-ALA. Conclusões semelhantes foram tiradas dos estudos de fotossensibilização e mecanismos de citotoxicidade induzidos pelo uso de derivados de 5-ALA, sugerindo que a TFD-5ALA pode ser otimizada com o uso de derivados de 5-ALA, reduzindo a quantidade de 5-ALA necessária para a induzir fotossensibilização eficiente (CASAS et al., 2001a).

Outros autores (GERSCHER et al., 2001) relataram uma maior citotoxicidade causada pelo ALA-n-pentil éster, sendo esta atribuída a uma localização de PpIX mais favorável no tecido e/ou uma maior toxicidade intrínseca do derivado.

Uma outra vantagem do uso de derivado esterificado de 5-ALA foi sugerida por CASAS et al. (2001b), os quais analisaram a formação de porfirinas em papiloma escamoso induzido quimicamente, após a aplicação tópica de 5-ALA e seu derivado hexil éster. Segundo os autores, a principal vantagem do uso de ALA n-hexil éster é que as porfirinas sintetizadas a partir do derivado éster ficam mais confinadas no sítio de aplicação, induzindo, assim, baixos níveis de porfirinas na pele normal, fígado, sangue e baço, bem como nos papilomas distantes do ponto de aplicação, independente do veículo utilizado.

Assim sendo, os derivados esterificados e mais lipossolúveis de 5-ALA constituem uma maneira promissora de aumentar as propriedades terapêuticas do mesmo e, conseqüentemente, da TFD-5-ALA (LOPEZ et al., 2004).

2.1.1.2.2. Métodos farmacotécnicos e outros

O sucesso da liberação percutânea está relacionado à adequada redução da propriedade barreira do EC. A perturbação temporária da função de barreira da pele a fim de aumentar a permeação de fármacos pode ser realizada por métodos físicos e químicos, conforme descritos a seguir.

2.1.1.2.2.1. Aumento da permeação por métodos físicos

- **Iontoforese:** pode agir como facilitador da liberação de fármacos ionizáveis através da pele por um potencial elétrico aplicado, causando um aumento da penetração na pele pelo uso de uma corrente aplicada através do tecido, geralmente com corrente elétrica baixa (no máximo 0,5 mA/cm²). Envolve primeiramente o transporte de moléculas iônicas pela passagem de uma corrente elétrica através de uma membrana trocadora de íons-neste caso, a pele. Um aumento no transporte percutâneo de fármacos peptídeos ou não peptídeos (incluindo ácidos graxos totalmente ionizados) acima de peso molecular de 6000 Da tem sido relatados. A técnica de iontoforese vem sendo muito explorada para a otimização da liberação cutânea de 5-ALA. LOPEZ et al. (2001, 2003 a, b) realizaram extenso estudo sobre os parâmetros iontoforéticos para a liberação cutânea do 5-ALA e seus derivados ésteres. RHODES et al. (1997) estudaram a liberação iontoforética do 5-ALA na pele humana sadia e subsequente fluorescência da PpIX e fototoxicidade. Eles relataram que com a iontoforese, o 5-ALA é rapidamente liberado através do EC e que o acúmulo de PpIX pode ser aumentado com o aumento da carga. A TFD -5 ALA combinada com iontoforese tem sido utilizada com sucesso no tratamento do carcinoma *in situ* da bexiga (STENZL et al., 1996).
- **Eletroporação:** utiliza pulsos de alta voltagem de curta duração para induzir aumento transitório na permeabilidade da pele através da criação de "poros" nos lipídeos do EC (ZHANG et al., 1997; REGNIER et al., 1999;)
- **Pulsos de luz laser** para a vaporização do EC de modo controlado e preciso, criando "caminhos" através dos quais a transferência percutânea pode ser efetuada (LEE et al; 2001).
- **Sonoforese:** também chamada fonoforese, é uma técnica que utiliza freqüências de ultra-som de KHz a MHz, as quais são capazes de aumentar a permeabilidade da pele. O ultra-som de baixa freqüência aumenta a permeabilidade da pele humana a muitos fármacos, incluindo proteínas de

alto peso molecular (acima de 48000 Daltons) em vários graus de magnitude (MITRAGOTRI & KOST, 2000; BOUCAUD et al., 2001)

2.1.1.2.2.2. Aumento da permeação por métodos químicos

O aumento da permeação da pele por métodos químicos utiliza substâncias químicas -denominadas *promotores da penetração*, - as quais alteram a pele dinamicamente e reversivelmente a fim de promover a penetração de fármacos. Os atributos desejáveis dos promotores de penetração são: (i) competência para modular a barreira da pele de modo reprodutível; (ii) farmacologicamente inerte; (iii) não tóxico, não irritante e não alergênico; (iv) efetivo a uma quantidade relativamente baixa; (v) capaz de deixar a pele completamente recuperada em sua propriedade de barreira após o seu uso; (vi) farmacologicamente compatível com vários fármacos e adjuvantes; (vii) cosmeticamente aceitável, barato e fácil de formular (TANOJO, 1996).

Várias substâncias têm sido relatadas pela capacidade de aumento da permeação da pele, tais como: sulfóxidos (dimetilsulfóxido/DMSO, decimetilsulfóxido) (DE ROSA et al., 2000); álcoois e ácidos graxos (álcool e ácido oléico, ácido láurico) (LOFTSSON et al., 1997); ésteres de ácidos graxos (PEREIRA et al., 2002); glicóis (propilenoglicol) (LOFTSSON et al., 1997); pirrolidonas (2-pirrolidona, n-metil-2-pirrolidona); laurocapranos (1-dodecilazacíclopentano-2-one/Azona) (HADGRAFT et al., 1996); tensoativos aniônicos como lauril sulfato de sódio e laurato de sódio (SHOKRI et al., 2001); tensoativos catiônicos como brometo de cetiltrimetil amônio, cloreto de benzalcônio e tensoativos não iônicos como Brij, Spans e Tweens (SHIN et al., 2001); soluções supersaturadas (HADGRAFT, 1999); terpenos (D-limoneno, 1,8 cineole) (EL-KATTAN et al., 2001); outros solventes (água, acetona, etanol, etc) (KANDIMALLA et al., 1999; LARRUCEA et al., 2001); fosfolipídeos (BENTLEY et al., 1997 b); ciclodextrinas (BENTLEY et al., 1997 a; VIANNA et al., 2000).

Estas substâncias aumentam a fluidez dos lipídeos nas camadas do EC aumentando, assim, a permeabilidade da pele aos fármacos. Concentrações altas de solvente na formulação, como propilenoglicol, 1,3 butilenoglicol, dipropilenoglicol e etanol, podem remover lipídeos do EC reduzindo a sua função de barreira. No geral, a taxa de transporte aumentado através da barreira epidérmica pode levar a efeitos colaterais tóxicos ou irritantes devido a um aumento no nível sistêmico do fármaco, sendo esta a principal desvantagem (POTTS et al., 1991).

Os promotores podem ser aplicados sozinhos, como solventes ou como carreadores, em uma certa concentração como adjuvantes ou na forma de lipossomos (SANTUS & BAKER, 1993; WALKER & SMITH, 1996; FOLDVARI, 2000).

Os ácidos graxos constituem uma classe de promotores químicos bastante explorada, e que apresentam uma característica interessante, sendo também componentes das membranas biológicas, incluindo a pele. Isto faz dos ácidos graxos bons candidatos como promotores da penetração. Os ácidos graxos compreendem um grande número de compostos; porém somente alguns deles mostram-se adequados para o aumento da penetração de fármacos. No entanto, cada ácido graxo possui características próprias, fornecendo inúmeras opções de escolha para ser desenvolvido em várias formulações.

2.2. Promoção da penetração/permeação de fármacos na/atraves da pele.

2.2.1. Ácidos graxos e a barreira da pele

É conhecido que a principal barreira da pele reside no estrato córneo (EC) (SCHEUPLEIN et al., 1971) devido à combinação das propriedades únicas de seus componentes: os corneócitos e a barreira lipídica. Portanto, esforços para modular as propriedades de barreira da pele têm sido focalizados para esta camada epidérmica.

A natureza do EC tem sido objeto de muitos estudos biológicos, físicos e bioquímicos, envolvendo várias técnicas *in vitro* e *in vivo*, por ex., espectroscopia de infravermelho (POTTS & FRANCOEUR, 1993; BENTLEY et al., 1997b), difração de

raios X (GARSON et al., 1991; BOUWSTRA et al., 1992), medidas de perda de água transepidérmica (POTTS, 1986), microscopia eletrônica (VAN HAL et al., 1996; BENTLEY et al., 1997a), análise térmica (KRILL et al., 1992) etc.

O EC é o produto final da diferenciação epidérmica. Na camada de células mais superficiais do EC, os corneócitos anucleados mortos são retirados através da descamação. É estimado que de 6 a 14 mg de material queratinoso seja retirado diariamente da superfície da pele. A degradação proteolítica dos desmossomos nas células superficiais do EC e a diminuição na porção de colesterol sulfato devem conduzir a este processo final (POTTS, 1989).

Já que quase não há atividade metabólica no EC, esta camada é distinguida de outras camadas "vivas". O nome "epiderme viável" se refere ao estrato basal, espinhoso e granuloso da pele. O tempo de renovação das células no estrato basal é de 12-19 dias, no estrato espinhoso e granuloso de 26-42 dias e no EC mais ou menos 14 dias. O tempo total de renovação celular na epiderme é de 52-75 dias (HALPRIN, 1976).

Os lipídeos intercelulares apresentam um importante papel na manutenção da função de barreira do EC. Os lipídeos, 2-10% do EC em peso, formam uma camada hidrofóbica entre as células, inibindo, assim, a difusão de água e substâncias hidrofílicas através do EC. As estruturas dos componentes lipídicos revelam que os ácidos graxos são partes dominantes dos lipídeos do EC. Assim como os aminoácidos são partes constituintes de proteínas, os ácidos graxos são comuns entre os lipídeos, não somente na forma livre, mas também na forma combinada (forma de éster), tais como ceramidas, esfingolipídeos e ésteres de colesterol. Ácidos graxos livres, ceramidas e ésteres de colesterol compreendem em torno de 10%, 40% e 10% dos lipídeos do EC em peso, respectivamente. Os ácidos graxos encontrados no EC apresentam cadeia de comprimento variando entre 14 a 28 carbonos e são predominantemente saturados na forma livre com 16 e 18 carbonos, enquanto os ligados à ceramida geralmente apresentam 22 e 24 carbonos (WERTZ & DOWNING, 1989). Os ácidos graxos de ésteres de colesterila são predominantemente o ácido oléico (68% na forma de monoéster) e o ácido palmítico (63% na forma α -hidroxi e 44% na forma de diéster de esterol não hidroxilado). A formação de ésteres de colesterol pode ser um

mecanismo do EC para isolar ácidos graxos insaturados residuais e prevenir seu efeito fluidizante sobre os domínios intercelulares da membrana (WERTZ, 1996).

A epiderme viável é capaz de sintetizar ácidos graxos e esfingolipídeos, mas para este propósito, alguns ácidos graxos (linoléico, ácido linoléico e aracdônico) precisam ser fornecidos ao organismo, uma vez que estes ácidos não podem ser sintetizados no corpo humano. Assim como os aminoácidos essenciais, eles são chamados ácidos graxos essenciais. A deficiência em ácidos graxos essenciais reduz o número de grânulos lamelares, induz a desordens na composição da barreira lipídica, aumenta a síntese de ácidos graxos com ácidos suplementares (ácido oléico) o qual resulta em uma diminuição do efeito de barreira do EC, causando aumento na perda transepidérmica de água (JACKSON & ELIAS, 1993).

Os ácidos graxos esterificados em triglicerídeos compreendem mais de 50% dos lipídeos do sebo humano. O sebo é continuamente secretado a fim de cobrir a superfície da pele em uma proporção de 10 $\mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}$ pelas glândulas sebáceas, as quais são encontradas em todas as áreas da pele, exceto nas palmas, solas e dorso dos pés. Esta mistura lipídica funciona como um manto ácido para a pele, com os ácidos graxos fornecendo esta acidez (DOWNING et al., 1993b).

Está claro que o tipo e a composição de ácidos graxos na pele possuem um papel importante na determinação da qualidade geral da barreira da pele. Entretanto, pode ser sugerido que uma modulação na quantidade de ácidos graxos nos lipídeos da pele, por exemplo, adição exógena, pode levar a uma perturbação na função de barreira da pele, resultando em aumento da permeabilidade para muitas substâncias. Esta constitui a base de uso dos ácidos graxos como promotores de absorção cutânea. Porém, a biossíntese lipídica na pele é capaz de reparar o dano, mantendo a função de barreira da pele com praticamente nenhum traço de perturbação após um curto período de tempo (TANOJO, 1996).

2.2.1.1. Ceramidas

Como já mencionado, as bicamadas lipídicas do EC consistem-se principalmente de frações livres de ceramidas, ácidos graxos e colesterol, sendo que as ceramidas constituem os lipídeos mais abundantes da bicamada, conferindo a esta substância a função essencial de barreira do EC.

As ceramidas apresentam-se como pelo menos sete espécies diferentes com comprimento de cadeia variando de longa a muito longa. A classificação de ceramidas da pele humana, publicada por ROBSON et al (1994), distingue as classes de ceramidas, representando-as por números arábicos variando de 1 a 7, indicando sua posição na placa de cromatografia. Sendo o componente mais abundante dos lipídeos do EC (~ 50% p/p), a maior fração de ceramidas é representada pela ceramida tipo 2 (18% p/p) (WERTZ, 1996), tanto no EC de humanos, porcos e camundongos (WERTZ & DOWNING, 1983).

Por outro lado, os números romanos indicam os tipos de ceramidas disponíveis comercialmente. A ceramida tipo III corresponde a ceramida 2, enquanto a ceramida IV corresponde a ceramida 5 da pele humana (MOTTA et al., 1994). Muitos estudos utilizam ceramidas isoladas de fonte animal tais como cérebro bovino ou orelha de porco, os quais naturalmente contém uma distribuição de cadeias de ácidos graxos ligadas bem como cadeias com base de esfingosina. A ceramida tipo III corresponde a ácidos graxos não-hidroxilados ligados a uma base de n-acil esfingosina, preparada pela ação da fosfolipase C sobre esfingomielina de cérebro bovino.

Já que a ceramida constitui um componente abundante no EC, a sua adição exógena poderia levar ao efeito de "depósito", aumentando a retenção de fármacos complexados a ela e assim, levando a uma liberação adequada destes na pele. Assim, complexos de *ceramida e fármacos* constituem uma proposta de estudo para a otimização da penetração e retenção cutâneas de fármacos.

2.2.2. Promotores de absorção cutânea.

2.2.2.2. Ácido oléico como promotor de penetração cutânea

O uso de ácidos graxos saturados e insaturados como promotores para a permeação de fármacos é de interesse tanto em liberação tópica como transdérmica de fármacos, porque uma vantagem desta classe de promotores é que eles são componentes endógenos da pele humana incluindo o EC (NICOLAIDS, 1974).

O ácido oléico (AO) ou ácido *cis*-9 octadecenóico é o ácido graxo mais comum na natureza; presente praticamente em todos os óleos e gorduras originados de plantas e animais, contabilizando 40% de todos os ácidos graxos sintetizados na natureza (GUNSTONE, 1958). Este ácido também é encontrado abundantemente nos lipídeos do EC humano (LAMPE et al., 1983).

Assim que a síndrome de deficiência de gorduras, causadora da formação anormal de barreira da pele foi descoberta (BURR & BURR, 1929), tornou-se evidente que o ser humano precisa dos ácidos graxos essenciais, os quais não podem ser sintetizados pelo organismo, e então deve ser fornecido pela dieta nutricional. No início, pensou-se que o AO seria um destes ácidos graxos essenciais, mas posteriores investigações mostraram que o AO foi totalmente ineficiente em prevenir ou curar a deficiência causada pela exclusão de gordura da dieta (ALFIN-SLATER et al., 1954). Desde então, AO foi reconhecido como uma substância sem atividade biológica.

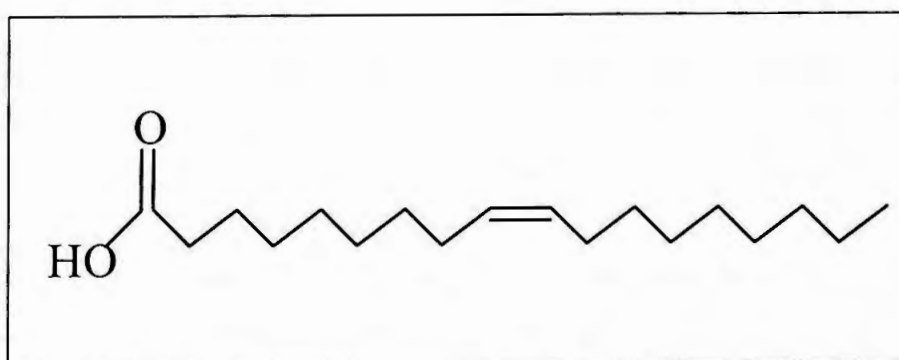


FIGURA 5: Fórmula molecular do ácido oléico

O AO é um ácido graxo com cadeia longa (cadeia de 18 carbonos), mas diferente de muitos ácidos com longa cadeia de carbonos; é líquido à temperatura ambiente devido à dupla ligação (C₉-C₁₀) na cadeia alquílica. Embora seja abundante no corpo e apresente dupla ligação (mono-insaturada) não é essencial para os seres humanos (TANOJO, 1996).

Nos primeiros estudos de permeabilidade da pele usando ácidos graxos, AO aumentou várias vezes a permeação do ácido salicílico (GOLDEN et al., 1987). Estudos subseqüentes relataram que em alguns casos, o AO é mais eficiente comparado a dois outros potentes promotores descobertos antes: DMSO e Azona (BENNETT & BARRY, 1987). Muitos trabalhos têm explorado os efeitos potenciais bem como o entendimento dos mecanismos de ação desta substância lipídica.

O AO tem sido relatado por aumentar a permeação de muitos fármacos, incluindo ácido salicílico (COOPER, 1984), salicilato de sódio, cafeína e nafazolina (GREEN et al., 1988), aciclovir, hidrocortisona, ácido retinóico e trifluorotimidina (LOFTSSON et al., 1989a), naloxona (AUNGST et al., 1986), manitol (BARRY & BENNETT 1987; YAMASHITA et al., 1995), molsidomina (YAMADA et al., 1987), indometacina (NOMURA et al., 1990) progesterona (BENNETT & BARRY, 1987), dihidrotestosterona (CLARYS et al., 1998), nitroglicerina (LOFTSSON et al., 1987), 5-fluorouracil (GOODMAN & BARRY, 1988; YAMANE et al.; 1995), metronidazol (HOELGAARD et al., 1988), estradiol (GOODMAN & BARRY, 1988), triancinolona (LOFTSSON et al., 1989b), propanolol (OGISO & SHINTANI, 1990), piroxicam (FRANCOEUR et al., 1990), cianofenol (MAK et al., 1990), diidroergotamina (NIAZY, 1991), ibuprofen e 6-mercaptopurina (YAMASHITA et al., 1995), tenoxicam (LARRUCEA et al., 2001), melatonina (OH et al., 2001) entre outros.

O AO tem sido descrito como um perturbador da barreira da pele, porque pode facilmente interagir com lipídeos ou membranas celulares, as quais consistem de lipoproteínas. O grupo carboxila também fornece uma certa polaridade e acidez. Isto permite que o composto se adeqüe às condições lipofílicas e pH da pele, as quais permitem que AO interaja com este tecido.

Uma cadeia carbônica linear de 18 átomos faz do AO um composto de comprimento de cadeia média comparado aos outros compostos alifáticos dos lipídeos da pele. Nos humanos, o comprimento das cadeias dos componentes

lipídicos varia de 4 a 32 átomos de carbono (LAMPE et al., 1983). Nesta condição, AO tem uma ótima mobilidade e liberdade nas conformações moleculares.

Substâncias que apresentam alta taxa de penetração na pele, significa que não permanecem muito tempo em certa camada, por exemplo, EC, mas se difundem através das camadas mais profundas. Como o AO apresenta um comprimento de cadeia longo, fica retido mais tempo na pele, fornecendo um tempo de interação mais longo com outros componentes lipídicos da pele. Embora a magnitude dos efeitos em perturbar a barreira da pele dependa dos mecanismos de ação, um tempo de permanência mais longo nas camadas particulares pode fornecer uma duração de ação mais longa (TANOJO, 1996).

A conformação *cis-trans* é uma propriedade única ligada às duplas ligações. A introdução da ligação dupla *cis* na cadeia acila produz uma "dobra" na cadeia, a qual cria um impedimento estérico no empacotamento apertado dos lipídeos nas membranas biológicas e então permite uma maior mobilidade das cadeias acila (TANOJO, 1996).

Nos tecidos, características como grau de insaturação, local de insaturação e conformação *cis-trans* são essenciais para formar várias citoquinas, como prostaglandinas, leucotrienos, etc (GRANSTROM, 1984). Nos lipídeos da pele, a qualidade da barreira é também dependente destas propriedades (WAHLE, 1983). Este pode ser um mecanismo de perturbação da barreira pelos ácidos graxos.

2.3. Estudos *in vitro* de permeação cutânea de fármacos

A absorção e/ou retenção podem ser medidas por técnicas *in vitro* devido à simplicidade das condições experimentais. Estudos *in vitro* podem minimizar ou eliminar o uso de animais, os quais podem ser substituídos por membranas sintéticas. Compostos potencialmente tóxicos são freqüentemente estudados *in vitro*. De maneira geral, para propostas cosméticas ou uso tópico de fármacos, a absorção percutânea excessiva não é desejada, mas um efeito sustentado no local ou próximo à superfície da pele (BRONAUGH & COLLIER, 1993). Os métodos experimentais *in vitro* para medidas de permeação de fármacos através da pele são necessários para avaliar a passagem e/ou retenção dos mesmos na/através

da pele, quando destinadas à aplicação tópica. A razão limitante do processo parece ser a difusão passiva de substâncias químicas através da barreira. Para a maioria dos compostos, a membrana controladora da razão é o EC, mas para compostos lipofílicos, a difusão através da *epiderme viável* é o passo limitante (BRONAUGH & COLLIER, 1993).

A técnica usual para os estudos de permeação *in vitro* na pele é o uso de membranas simuladoras da pele, ambientes ajustáveis, vários protocolos e células de permeação ou células de difusão, as quais representam o compartimento externo e interno do corpo. Geralmente, as células de difusão consistem de dois compartimentos, estando entre estes dois compartimentos, pele ou outra membrana. Os estudos de permeação *in vitro* aproximam-se mais das condições *in vivo* quando se utilizam sistemas com membranas. Devido às amostras de pele humana serem de difícil obtenção e variarem quanto à sua permeabilidade, muitos pesquisadores empregam outros materiais para simulá-la. A membrana de acetato de celulose tem sido utilizada como uma membrana com características hidrófilas em células de difusão para estudos de liberação *in vitro*. Dentre as membranas de origem natural, a pele humana, obtida pela dissecação de cadáveres e em cirurgias (ROY et al., 1994) é insubstituível nos estudos de penetração e permeação cutâneas. Entretanto, devido às dificuldades na aquisição desta membrana, as peles de animais como ratos (HADGRAFT & BEUTNER, 1993), camundongos com ou sem pêlo (GHOSH et al., 1993), coelhos (DE VOS et al., 1991), cobaias e cricetos (SURBER et al., 1991), porcos (SATO et al., 1991), cães sem pêlo (REIFENRATH et al., 1984), macacos (SURBER et al., 1991), têm sido empregadas como membranas naturais. O modelo animal mais importante para ser utilizado nestes estudos é a pele de porco, a qual está disponibilizada diretamente dos abatedouros e tem mostrado propriedades histológicas e bioquímicas semelhantes a pele humana (MEYER et al., 1978). Além disso, a permeabilidade dos fármacos através da pele de porco tem mostrado similaridade com a pele humana (SATO et al., 1991; DICK et al., 1992). A pele de orelha de porco é particularmente adequada para os estudos de permeação e proporciona resultados comparáveis a pele humana (HOECK et al., 1994).

As condições para os estudos de permeação são cuidadosamente ajustados a fim de mimetizar a situação no local proposto de liberação do fármaco. Como a

permeação tende a aumentar com o aumento da temperatura, é aconselhável regular a temperatura para 32- 37°C, a qual pode ser mantida por um banho circulante de água termostaticado, através de uma jaqueta de água cobrindo cada célula de difusão. A intervalos de tempo selecionados, alíquotas do fluido receptor são removidas e analisadas quanto ao conteúdo de fármaco permeado (FRANZ, 1975).

O protocolo dos estudos de permeação na pele preocupa-se do modo como a fase doadora (amostra) é aplicada, ou seja, **dose finita ou infinita** e o modo de coleta da fase receptora (normalmente um tampão fisiológico) no sistema, **modo estático ou fluxo contínuo**.

A fase receptora pode ser mantida: (i) em estado estacionário com agitação, enquanto de tempos em tempos uma amostra é coletada e o volume reduzido pode ser compensado pela adição de fase receptora (ii) em um sistema de fluxo contínuo, no qual a fase receptora é continuamente transportada de um reservatório em um coletor de amostra (TANOJO, 1996).

Nas células de difusão estáticas, o volume do compartimento deve ser relativamente grande (≥ 10 mL) para assegurar dissolução homogênea e a diluição da substância permeante (TOUITOU & ABED., 1985). Os requerimentos para a técnica de difusão no estado estacionário são uma fase doadora homogênea a concentração constante, liberando o fármaco através da membrana, sendo este recebido por uma fase receptora mantida em *sink condition*, ou seja, todo o fármaco que for liberado deve estar solubilizado na solução receptora. Modelos matemáticos para este tipo de sistema têm sido descritos por outros autores (BODDÉ & JOOSTEN, 1985). Em células de fluxo contínuo (ADDICKS et al., 1987) o volume do compartimento receptor deve ser o menor possível (GUMMER, 1989).

Vários tipos de células de difusão podem ser utilizados para estes estudos, mas há somente dois tipos básicos: as células de uma só câmara e as células de duas câmaras. Cada tipo tem sua aplicação nos estudos de absorção percutânea. O compartimento doador pode ser fechado ou aberto. As células de difusão com compartimento aberto são conhecidas como células de uma só câmara (AKHTER et al, 1984), enquanto aquelas com o compartimento fechado são referidas como células de duas câmaras (COOPER, 1984). As células de duas câmaras têm

vantagem sobre a de uma só câmara porque o doador pode ser aplicado tanto em uma dose finita (FRANZ, 1978) como em uma dose infinita. O último caso é importante para monitoramento dos perfis de difusão de substâncias com alto coeficiente de permeabilidade.

Em ambas as técnicas, a solução receptora (solução salina ou tampão fisiológico isotônico) corresponde ao sangue fornecido e a fase doadora representa a formulação aplicada na pele, por ex., material sólido depositado de um solvente volátil, um líquido, um semi-sólido (pomada, creme, pasta ou gel), um filme ou até mesmo um dispositivo de liberação transdérmica (*patch*) (TANOJO, 1996).

2.4. Avaliação *in vivo* da liberação cutânea de fotossensibilizadores e seus precursores após aplicação tópica de formulações em modelo animal.

A produção e/ou acúmulo bem como a distribuição cutânea de fotossensibilizadores exógenos ou daqueles produzidos endogenamente (principalmente a PpIX) têm sido investigadas para avaliar a potencialidade de fármacos como também de formulações a serem aplicadas na TFD.

Uma insuficiente penetração no tecido ou liberação do precursor de PpIX na pele, assim como, uma distribuição não favorável desta, são fatores que estão envolvidos na ineficácia da TFD, já que o sucesso desta terapia depende da concentração de PpIX no tecido alvo (GERSCHER et al., 2001). A avaliação quantitativa da PpIX é importante para avaliar sua concentração e distribuição no tecido e, assim, possibilitar a modulação dos parâmetros de otimização da formulação aplicada.

A técnica de *microscopia de fluorescência* foi utilizada por GERSCHER et al. (2001) para a visualização da PpIX produzida após a aplicação de 5-ALA e ALA pentil éster *in vivo* em pele humana, utilizando a iontoforese como sistema de liberação dos pró-fármacos. Após a biópsia e congelamento das peles tratadas, estas foram analisadas por microscópio de fluorescência com excitação laser a 633 nm (laser de Helio-neônio), obtendo as imagens fluorescentes da PpIX. Foi verificado que a profundidade de fluorescência na pele foi semelhante para

ambos os pró-fármacos, mas uma distribuição mais homogênea de PpIX foi verificada com o fármaco mais lipofílico, o ALA pentil éster. A microscopia confocal a laser também tem se mostrado uma técnica valiosa nos estudos de visualização da PpIX produzida na pele (DE ROSA et al., 2000).

A avaliação *in vivo* da PpIX tem sido investigada por vários autores e existem vários métodos descritos na literatura para a **extração da PpIX**, os quais utilizam técnicas complexas (LILGE et al., 1997), mistura de solventes (IINUMA et al., 1995; RICK et al., 1997; DE ROSA et al., 2000), digestão química dos tecidos (HERMAN et al., 1997; WEBBER et al., 1997b; NINOMIYA et al., 2001), cromatografia (KESSEL & CHOU, 1983), digestão do tecido seguido de extração com solvente (TSAI et al., 2002), entre outros.

A produção e acúmulo de PpIX também podem ser estudados *in vivo* por um **método não-invasivo**, ou seja, por medidas espectrofluorimétricas utilizando uma **sonda de fibra óptica**, diretamente no tecido animal ou humano. Este dispositivo mede *in vivo* a fluorescência da PpIX sintetizada endogenamente, possibilitando leitura direta no local de aplicação de formulações a serem utilizadas na TFD do câncer de pele e, assim, avaliá-las em termos de otimização da produção de PpIX.

Vários autores tem relatado o uso de modelo animal *in vivo* (peles sadias de camundongos sem pêlo) para a avaliação da quantidade de PpIX acumulada após a aplicação tópica das formulações contendo 5-ALA ou seus derivados esterificados.

MOAN et al. (2003) determinaram a distribuição de PpIX induzida *in vivo* por 5-ALA e seus ésteres (ALA metil e ALA hexil éster) aplicados topicamente em peles sadias de camundongos, através de medidas espectrofluorimétricas utilizando uma *sonda de fibra óptica* ou por *extração química* da PpIX destes tecidos. Os resultados destas duas técnicas de medida foram comparados e mostraram que o 5-ALA e seus ésteres induziram quantidades semelhantes de PpIX no local da aplicação, sendo que os ésteres produziram uma quantidade muito menor de PpIX em áreas distantes do local de aplicação.

A quantificação da PpIX induzida por 5-ALA e/ou seus ésteres pode também avaliar o melhor tempo para a irradiação de luz laser, após a aplicação das formulações, bem como determinar as condições ideais para aumentar a seletividade tumoral da PpIX.

JUZENAS et al. (2002) estudaram a fotodegradação e a fototransformação da PpIX em peles sadias de camundongos, após a aplicação tópica de 5-ALA 20% (p/p) em pomada, sob oclusão. As medidas de fluorescência da pele foram realizadas até 14 horas de aplicação do creme, pois após este tempo, a degradação da PpIX começa a ocorrer.

RICK et al. (1997) estudaram o acúmulo *in vivo* de PpIX em diferentes locais da pele após administração de 5-ALA por várias vias: oral, inalação, instilação intravesical e tópica em pacientes, através de medidas de fluorescência direta sobre a pele utilizando fibra óptica.

Gerscher et al. (2001) estudaram e compararam em humanos a farmacocinética da PpIX induzida por 5-ALA (2,0%) e ALA pentil éster (2,8%), assim como, a fototoxicidade após a TFD, usando a iontoforese como método físico para liberar os fármacos na pele. As medidas *in vivo* da PpIX também foram realizadas com um espectrômetro de fluorescência acoplado a um dispositivo de fibra óptica, diretamente sobre a pele, com comprimento de onda de excitação e emissão característicos da PpIX.

JUZENIENE et al. (2002) utilizaram esta técnica para a determinação da cinética do acúmulo de PpIX após aplicação tópica de cremes contendo 5-ALA ou seus derivados esterificados em diferentes concentrações (0,5% a 20,0 %), aplicado topicamente sob oclusão e de forma repetida, por um período de 0 a 24 horas. A intensidade de fluorescência da PpIX formada foi medida no sítio de aplicação do creme, em função do tempo, por meio da técnica de espectroscopia de fluorescência utilizando um dispositivo de fibra óptica acoplado a um espectrômetro de luminescência. Os autores puderam estudar a cinética de produção/acúmulo da PpIX na pele animal antes (controle ou pele sem tratamento) e depois da aplicação dos cremes, pela determinação do pico de fluorescência máxima da PpIX em períodos de aplicação curtos (2 a 4 horas) ou longos (8 a 12 horas e 12 a 24 horas). Observaram que para tempos de aplicação entre 2 e 4 horas, a concentração de 5-ALA que atinge máxima

intensidade de fluorescência de PpIX foi de 5%. Por outro lado, para tempos de aplicação mais longos (8 a 12 horas), a uma menor concentração de 5-ALA (1%) atingiu máxima fluorescência. Períodos de aplicação maiores que 12 horas e concentrações elevadas de 5-ALA devem ser considerados, devido ao efeito sistêmico do 5-ALA topicamente aplicado. Em resumo, pode-se concluir que a produção de PpIX é um processo dominante para tempos de aplicação mais curtos (1 a 8 horas) enquanto que para longos períodos (maiores que 12 horas), a eliminação da PpIX é o que prevalece.

Outros autores (VAN DEN AKKER et al., 2000) estudaram as diferenças na cinética de fluorescência da PpIX após aplicação tópica de 5-ALA e ALA hexil éster (10% p/p) em cremes e a influência do promotor de absorção HPE-101 sobre o acúmulo de PpIX. Utilizaram também uma sonda de fibra óptica diretamente no sítio de aplicação das formulações, após estas terem sido removidas. Protocolos variados foram estudados a fim de avaliar o melhor intervalo de tempo entre a aplicação da formulação e as medidas de fluorescência (0 a 60 minutos); ou seja, as formulações foram aplicadas e após intervalos de tempo variados, foram removidas da pele do animal e as medidas de fluorescência *in vivo* da PpIX foram conduzidas até 8 horas após o início de cada aplicação. Para o **5-ALA**, foi verificado que a intensidade de fluorescência máxima da PpIX aumenta com o aumento do intervalo de tempo, sendo 60 minutos considerado o melhor intervalo de tempo entre aplicação da formulação e as medidas de fluorescência. Também estudaram a variação da concentração dos fármacos utilizados (0,5, 2, 5, 10, 20 ou 40% p/p), onde o intervalo de tempo entre a aplicação e as medidas foi de 10 minutos, e as medidas de fluorescência da PpIX foram feitas até 8 horas após o início de cada aplicação. Os resultados indicaram que a fluorescência máxima da PpIX aumenta com o aumento das concentrações de 5-ALA ou seu éster ALA hexil. No caso do 5-ALA, a fluorescência máxima da PpIX foi atingida após 2-3 horas do início de cada aplicação para todas as concentrações estudadas. Além disso, 10% de 5-ALA correspondeu à concentração ótima, ou seja, a concentração que induziu maior produção de PpIX comparada àquela induzida pelo ALA hexil éster na mesma concentração.

Assim sendo, a quantificação de PpIX para o conhecimento da relação dose-resposta entre a liberação cutânea de 5-ALA e o acúmulo cutâneo de PpIX, são de valiosa importância para o desenvolvimento e a avaliação de formulações e de esquemas de tratamento mais adequados para TFD-5ALA tópica.

3. OBJETIVOS

Este trabalho tem como objetivo a otimização da penetração cutânea do ácido 5-aminolevulínico para a TFD do câncer de pele empregando formulações contendo adjuvantes lipídicos (ácido oléico e ceramidas) como promotores de absorção cutânea.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. MATERIAL

4.1.1 Fármacos

- Ácido 5-aminolevulínico (Cloridrato, $C_5 H_{10} Cl NO_3$, mol 167,6); (~ 98%)- Sigma
- ALA n-hexil éster, ALA n-octil éster – gentilmente sintetizados e cedidos pelo prof. Antonio Cláudio Tedesco
- Protoporfirina IX ($C_{34}H_{34}N_4O_4$, mol: 562,7; ~ 95%) -Sigma

4.1.2. Solventes, Reagentes e Matérias-primas

- Ceramida tipo III (~ 95%)- Galena
- Ácido Oléico (~ 99%)- Sigma
- Formaldeído 37% (MERCK)
- Acetilacetona, grau reagente (VETEC)
- Metanol grau cromatográfico (MERCK)
- Clorofórmio grau cromatográfico (MERCK)
- Propilenoglicol P.A (SYNTH)
- Água MilliQ

4.1.3. Equipamentos e Acessórios

- Células de difusão vertical MICROETTE-. Modelo 57-100-828 acoplada a coletor automático SIP Control- HANSON RESEARCH CO
- Fluorímetro FLUOROLOG 3 (SPEX- IVON JOBIN) acoplado ou não a um dispositivo de fibra óptica de λ excitação/emissão= 400/632 nm.
- Banho de aquecimento (0 a 120° C) QUIMIS
- Homogeneizador de tecidos -TURRAX
- Agitador magnético modelo PC-420 (CORNING)
- Agitador de tubos-PHOENIX-modelo AP56

- Balança analítica modelo A-200 DS (DENVER INSTRUMENTS COMPANY)
- Banho sonificador modelo 1210 (BRANSON)
- Medidor de pH-CORNING
- Tubos de ensaio com tampa (âmbar)
- Tubos de plástico para extração (25 mL)
- Vidraria âmbar (balões volumétricos, béqueres)
- Micropipetas automáticas ajustáveis de 1,0 a 100,0 μL , 100 a 1000 μL e 1,0 a 10 mL-(Finnpipette).
- Pinça e tesoura cirúrgica para dissecação
- Luvas de procedimento

4.1.4. Animais de Laboratório

- Camundongos sem pêlo, com quatro a seis semanas de idade, linhagem HRS/J. Laboratórios Jackson, BarHarbor, ME, mantidos no Biotério da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, USP, em salas climatizadas, com suprimento de água e ração *ad libidum*.
- Pele de porco, obtida da região externa das orelhas, logo após o abate dos animais.

4.2. MÉTODOS

4.2.1. Padronização da metodologia analítica para a quantificação de 5-ALA por Espectrofluorimetria.

O 5-ALA e seus ésteres não apresentam fluorescência, porém; após a **reação de derivação** do 5-ALA com formaldeído e acetilacetona (OISHI et al., 1996), há formação de derivados altamente fluorescente. Estes podem ser identificados e quantificados com detector de fluorescência, utilizando os λ de excitação e de emissão, característicos dos derivados fluorescentes de 5-ALA e de seus ésteres.

4.2.1.1. Reação de derivação (OISHII et al., 1996)

Esta reação foi baseada numa modificação da reação de Hantzsch, na qual compostos amínicos reagem com acetilcetona e formaldeído. Em recipiente âmbar, adicionaram-se 3,5 mL de reagente de acetilcetona, 0,45 mL de uma solução de formaldeído 10% e 50 μ L da solução padrão de 5-ALA ou seus ésteres, nas concentrações de 5, 25, 50 e 100 μ g/mL. A mistura foi agitada em mixer por aproximadamente 3 segundos, e aquecida em banho a 100°C por 10 minutos. Resfriou-se então o produto em banho de gelo, mantendo ao abrigo da luz até o momento da realização dos experimentos.

- Preparação do reagente de acetilcetona

A preparação foi feita misturando-se 15 mL de acetilcetona, 10 mL de etanol, e 75 mL de água destilada sob agitação a 600 rpm em agitador magnético, ao abrigo da luz.

- Preparação da solução de formaldeído 10% (v/v)

Diluiu-se 3,7 vezes o reagente químico (37% v/v) em água destilada, e a solução foi estocada ao abrigo da luz.

4.2.1.2. Determinação do comprimento de onda (λ) de emissão do derivado fluorescente de 5-ALA em espectrofluorímetro.

Foi preparada uma solução estoque de 5-ALA a 100 μ g/mL, dissolvendo-se 12,8 mg do cloridrato do fármaco em 100 mL de tampão fosfato pH 5, mantendo-a estocada ao abrigo da luz, a 4°C.

Cerca de 50 μ L da solução foi utilizada para a reação de derivação descrita no item 4.2.1.1. O derivado fluorescente obtido foi então submetido à excitação na região do ultravioleta utilizando-se $\lambda = 378$ nm e foi determinado o λ máximo de emissão no espectrofluorímetro da solução preparada.

4.2.1.3. Determinação da Linearidade do Método

Para avaliar a linearidade do método analítico, ou seja, a proporcionalidade entre a concentração e a resposta, foi feita uma curva analítica onde foram determinados os coeficientes de correlação (r) e a equação da reta. Partindo de uma solução estoque de 5-ALA (100 $\mu\text{g/mL}$) em tampão fosfato pH 5, prepararam-se diluições em quadruplicata, representando os seguintes pontos da curva analítica: 5,0; 25,0; 50,0 e 100,0 $\mu\text{g/mL}$.

Alíquotas de 50,0 μL de cada diluição (quadruplicata) foram transferidas para tubos de ensaio âmbar com tampa esmerilada e procedeu-se à reação de derivação descrita no item 4.2.1.1. Em seguida, as amostras foram submetidas a leituras de fluorescência em espectrofluorímetro. A curva analítica foi obtida relacionando-se as concentrações de 5-ALA ($\mu\text{g/mL}$) nas abscissas (eixo x) e os valores de intensidade de fluorescência correspondentes aos picos de fluorescência nas ordenadas (eixo y).

4.2.1.4. Determinação da Precisão e Exatidão do método de espectrofluorimetria para o 5-ALA (CAUSON, 1997)

Para avaliar a precisão e exatidão do método, foi feita uma curva padrão em triplicata (5-100 $\mu\text{g/mL}$) e dez réplicas de amostras das concentrações de 5 e 50 $\mu\text{g/mL}$ foram analisadas juntamente com a curva padrão, em um mesmo dia, para avaliar a precisão e exatidão intra-ensaio e, por 5 dias consecutivos, para avaliar a precisão e exatidão inter-ensaio.

A precisão está relacionada com a dispersão das medidas ao redor de seu valor médio, e é expressa matematicamente através da porcentagem do coeficiente de variação (% CV), calculado pela seguinte fórmula:

$$\% \text{ CV} = (\text{desvio padrão} / \text{média das concentrações determinadas}) \times 100$$

A exatidão corresponde à diferença entre o valor obtido após a análise e o valor real da amostra, e é calculada pela seguinte fórmula:

$$\% E = \frac{\text{Média da concentração experimental} \times 100}{\text{Média da concentração teórica}}$$

4.2.2. Determinação da Linearidade do método para ALA n-hexil éster e ALA n-octil éster.

4.2.2.1. Determinação do comprimento de onda (λ) de emissão do derivado fluorescente de ALA n-hexil éster e ALA n-octil éster em espectrofluorímetro.

Foram preparadas soluções estoques de ALA n-hexil éster e ALA n-octil éster a 100 $\mu\text{g/mL}$, dissolvendo-se as quantidades de cada fármaco descritas na **TABELA 1** em 100 mL de tampão fosfato pH 7,2; estocando-a posteriormente ao abrigo da luz, a 4°C.

TABELA 1: Preparo das soluções aquosas de 5-ALA e seus ésteres a 100 $\mu\text{g/mL}$ para a determinação dos comprimentos de onda (λ) de emissão em espectrofluorímetro.

<i>Fármaco</i>	<i>Quantidade utilizada (mg/ 100mL de tampão)</i>
ALA n-hexil éster	19,2
ALA n-octil éster	21,3

Cerca de 50 μL de cada solução foram utilizados para a reação de derivação descrita no item 4.2.1.1. Os derivados fluorescentes obtidos foram então submetidos à excitação na região do ultravioleta utilizando-se $\lambda = 378 \text{ nm}$ e foi determinado o λ máximo de emissão no espectrofluorímetro das soluções preparadas.

4.2.2.2. Curvas analíticas para ALA n-hexil e ALA n-octil éster

Foram obtidas curvas analíticas para o ALA n-hexil e ALA n-octil éster, a partir de uma solução a 100 $\mu\text{g/mL}$ em tampão fosfato pH 7,2. Em balão de 25 mL, foram dissolvidas as quantidades dos derivados esterificados, ou seja, foram pesados 4,80 mg de ALA n-hexil éster e 5,25 mg ALA n-octil éster, respectivamente. O volume foi completado com o tampão para 25 mL. A partir destas soluções estoque foram realizadas diluições adequadas em tampão para a obtenção das concentrações de 5,0; 25,0; 50,0 e 100,0 $\mu\text{g/mL}$.

Alíquotas de 50,0 μL de cada diluição (quaduplicata) foram transferidas para tubos de ensaio âmbar com tampa esmerilada e procedeu-se à reação de derivação descrita no item 4.2.1.1. Em seguida, as amostras foram submetidas a leituras de fluorescência em espectrofluorímetro. As curvas analíticas foram obtidas relacionando-se as concentrações dos derivados ($\mu\text{g/mL}$) nas abscissas (eixo x) e os valores de intensidade de fluorescência correspondentes aos picos de fluorescência nas ordenadas (eixo y).

4.2.3. Caracterização de parâmetros físico-químicos de 5-ALA e derivados ésteres ALA n-hexil e ALA n-octil

4.2.3.1. Determinação do coeficiente de partilha óleo/água ($K_{O/A}$)

A água e o octanol utilizados foram previamente saturados após agitação por uma noite para saturação dos mesmos. Após a separação das fases, preparou-se uma solução aquosa de 5-ALA ou dos derivados esterificados na concentração de 60 $\mu\text{g/mL}$, de modo a obter a solução mãe deste fármaco. A cada 5,0 mL da solução mãe foi adicionado igual volume de octanol.

As misturas foram agitadas em erlenmeyers por 30 minutos a 500 rpm. Após este período foram colocadas em funis de separação e mantidas em repouso por 5 minutos. A fase aquosa de cada amostra foi retirada e centrifugada a 450 g por 10 minutos (WELLS, 1988). A identificação e a quantificação do 5-ALA ou seus ésteres na fase aquosa (50 μL) foi realizada após reação de derivação (**item 4.2.1.1**). Suas concentrações foram determinadas

por espectrometria de fluorescência utilizando o λ de excitação /emissão 378 nm/464 nm. Os experimentos foram conduzidos em triplicatas. Um controle com água e octanol também foi realizado. A concentração de 5-ALA e seus ésteres na fase aquosa foi quantificada antes (C_1) e depois da partilha (C_2) e o $K_{O/A}$ foi determinado segundo a equação (WELLS, 1988):

$$K_{O/A} = \frac{C_1 - C_2}{C_2}$$

4.2.3.2. Determinação do coeficiente de partilha pele/água ($K_{P/A}$) para 5-ALA e seus derivados esterificados

Esta metodologia foi baseada no método proposto por SCHEUPLEIN et al. (1969). Amostras de pele de camundongo sem pêlo (aproximadamente 150 mg) foram cortadas e transferidas para tubos de extração contendo 3,0 mL de uma *solução aquosa* de 5-ALA ou seus derivados esterificados, todas na concentração de 60 $\mu\text{g/mL}$. As misturas de pele com solução aquosa do fármaco foram agitadas em mixer por 6 minutos, e posteriormente filtradas em papel de filtro, e em membrana Millipore de 0,45 μm . Alíquotas de 50 μL dos filtrados foram utilizados para a reação de derivação descrita no **item 4.2.1.1.** e a concentração de 5-ALA ou seus derivados não partilhados na pele foram determinados por espectrometria de fluorescência, utilizando o λ de excitação /emissão 378 nm/464 nm. O $K_{P/A}$ foi determinado através da fórmula descrita anteriormente. Um controle contendo apenas pele e água foi também testado. Os experimentos foram conduzidos em triplicata.

4.2.3.3. Determinação do coeficiente de partilha estrato córneo/ água ($K_{EC/A}$) para 5-ALA e seus derivados.

Primeiramente, foram obtidas as amostras EC da seguinte maneira: peles da região dorsal de camundongos sem pêlo foram dissecadas, e a parte inferior das mesmas, referente ao tecido subcutâneo, colocada em contato ("flutuação") com uma solução de tripsina III 0,1% (p/v) e bicarbonato de sódio 0,5% (p/v), por um período de 14 horas à temperatura ambiente. As membranas de EC assim obtidas foram lavadas com água destilada para remover a tripsina e o tecido digerido e armazenadas em dessecador. Amostras de EC pesando cerca de 20,0 mg foram cortadas e transferidas para tubos de extração contendo 3,0 mL das *soluções aquosas* de 5-ALA, ALA-6 ou ALA-8, agitadas em mixer por 6 minutos, filtradas em papel de filtro e posteriormente através de membrana de 0,45 μm .

A identificação e a quantificação do 5-ALA, bem como dos derivados de 5-ALA na fase aquosa foram realizadas após reação de derivação (**item 4.2.1.1**). Suas concentrações foram determinadas por espectroscopia de fluorescência utilizando o λ de excitação/emissão 378 nm/464 nm. A concentração de 5-ALA e seus ésteres na fase aquosa de cada amostra foi quantificada antes (C_1) e depois da partilha (C_2) determinando então o $K_{EC/A}$ segundo a equação já descrita anteriormente. Os experimentos foram conduzidos em triplicatas.

4.2.4. Estudos *in vitro* de permeação cutânea

4.2.4.1. Obtenção das diferentes formulações contendo 5ALA, ALA n-hexil e ALA n-octil éster.

4.2.4.1.1. Obtenção de misturas de ceramida e fármaco

As misturas contendo 2% (p/p) de **ceramida** e 1% (p/p) dos fármacos **5-ALA** ou **ALA n-hexil éster** ou **ALA n-octil éster**, foram obtidas pela dissolução da mistura em de solventes clorofórmio: metanol (2:1) e em seguida submetidas

à secagem sob corrente de nitrogênio, obtendo-se assim um filme. Em seguida, este filme foi dissolvido em propilenoglicol. Soluções de 5-ALA ou de seus ésteres em PG na mesma concentração foram utilizadas como controles.

4.2.4.1.2. Obtenção das formulações de 5-ALA ou seu derivado ALA *n*-hexil éster com ácido oléico.

Foram preparadas as formulações de **5-ALA a 1% (p/p)** pesando-se quantidade apropriada do fármaco, e adicionando-se as soluções de **AO** em PG a diferentes concentrações (**2,5%, 5% ou 10% p/p**). Para a formulação de **ALA *n*-hexil éster a 1% (p/p)**, quantidade apropriada deste fármaco foi pesada (peso equivalente a 1% de 5-ALA) e a solução de **AO a 5% (p/p)** em PG foi adicionada. As formulações controle consistiram das mesmas soluções, porém não contendo AO.

4.2.4.2. Estudos de permeação *in vitro* utilizando pele de porco para as diferentes formulações contendo 5-ALA, ALA *n*-hexil éster e ALA *n*-octil éster.

Foram realizados experimentos de difusão com pele de orelha de porco utilizando as preparações descritas nos **itens 4.2.4.1.1. e 4.2.4.1.2.**

As orelhas foram obtidas logo após o abate do animal. Seu preparo consistiu de lavagem em água corrente e, em seguida, dissecação da região externa das mesmas, retirando-se toda e qualquer porção de tecido subcutâneo. Foram empregadas células de difusão Microette-HANSON RESEARCH CO.

(**Figura 6**).

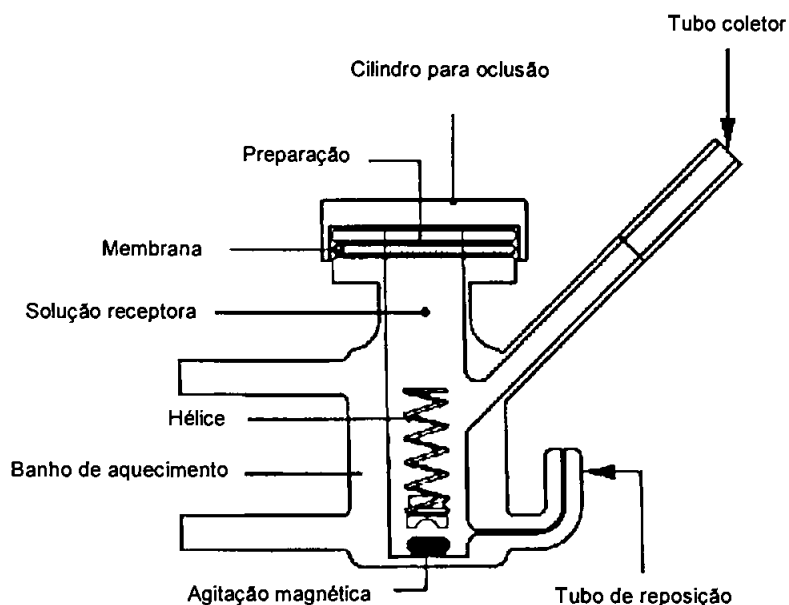


FIGURA 6: Célula de difusão vertical empregada nos estudos *in vitro* de permeação cutânea (Microette-Hanson Research).

As soluções receptoras utilizadas foram: tampão fosfato 0,15 M, pH 5 para o 5-ALA e pH 7,2 para os derivados ésteres, mantidas a temperatura de 37°C por um banho termostatzado de água circulante. Estas fases receptoras mantiveram condições de "sink" para os fármacos no experimento *in vitro*.

As porções da pele animal (orelha de porco) foram colocadas nas células de difusão, sendo que o lado inferior da pele ficou em contato com a solução receptora. A área de exposição das peles foi de aproximadamente 1,77 cm². Alíquotas de 120 µL de cada preparação (formulações ou controle) foram aplicadas sobre a membrana animal (lado epidérmico) fixada ao suporte. A solução receptora (cerca de 7,0 mL) foi constantemente agitada a 300 rpm e amostras de 1 mL foram coletadas em intervalos de tempo pré- estabelecidos: 1, 2, 6, 8, 12 e 16 horas. O equipamento manteve constante o volume da solução

receptora automaticamente, sendo assim, a cada coleta foi repostos 1,0 mL de solução nova.

As alíquotas foram quantificadas pela técnica de espectrofluorimetria, após a obtenção dos derivados fluorescentes de 5-ALA, ALA n-hexil éster ou ALA n-octil éster, pela reação de derivação, seguido por determinação em fluorímetro (**item 4.2.1.1**).

Para o cálculo da quantidade de fármaco permeada, foram feitas as correções das diluições decorrentes das coletas, segundo a equação abaixo:

$$Q_{\text{real, t}} = (C_{\text{mensurada, t}} \times V_r) + (V_a \times \sum^{n-1} C_a)$$

Onde,

Q = quantidade permeada acumulada

Q real = o valor real no tempo t

C mensurada, t = concentração medida da coleta no tempo t

V_r = volume da célula de difusão

V_a = volume de amostra removido

C_a = concentração da amostra removida

Finalmente, a quantidade do fármaco permeado foi dividida pela área de pele utilizada, e esses valores foram plotados em função do tempo ($\mu\text{g}/\text{cm}^2 \times \text{tempo}$) para visualização do perfil de permeação do fármaco. Os experimentos foram realizados em quadruplicata.

4.2.4.3. Estudos *in vitro* de retenção cutânea em pele de porco

Para os estudos de retenção cutânea, o procedimento foi o mesmo descrito no **item 4.2.4.2**. Após 12 ou 16 horas de experimento na célula de difusão, as peles foram retiradas e gentilmente lavadas com água destilada para retirar o excesso da formulação, levemente pressionadas com papel absorvente para a retirada do excesso de água. Em seguida, foram submetidas aos procedimentos de *tape stripping* e retenção [epiderme + derme].

4.2.4.3.1. *Tape Stripping ou retenção no estrato córneo (LOPEZ, 2001)*

A área de pele exposta à difusão (1,77 cm²) foi submetida à extração do EC, utilizando-se de fitas adesivas Scotch®, 3M (n= 10). As fitas foram transferidas para tubos de ensaio contendo 10 mL de metanol e agitadas em mixer por 3 minutos para a extração do fármaco. Um volume de 50 µL do extrato metanólico foi posteriormente quantificado por espectrofluorimetria, após reação de derivação (**item 4.2.1.1**). Os resultados obtidos foram expressos em quantidade de 5-ALA ou seus ésteres retido no EC por área de exposição (µg de fármaco /cm²).

4.2.4.3.2. *Estudos de retenção dos fármacos na [epiderme + derme]*

Após a retirada do EC como descrito anteriormente, a área da pele restante foi recortada, picada e os fragmentos obtidos foram adicionados de 5 mL de metanol e agitados em homogeneizador de tecidos Turrax por 1 minuto. Em seguida, foi realizada a sonicação em banho de ultra-som durante 30 minutos, afim de romper as células e liberar o fármaco. A suspensão assim obtida foi filtrada em papel de filtro qualitativo. Alíquotas de 50,0 µL do filtrado foram submetidas à quantificação por espectrofluorimetria, após reação de derivação (**item 4.2.1.1**) Os resultados obtidos expressam a quantidade de fármaco retido na [epiderme + derme] por área de exposição (µg fármaco /cm²).

4.2.5. Quantificação *in vitro* da PpIX induzida por 5-ALA em peles sadias de camundongos sem pêlo

4.2.5.1. Determinação do comprimento de onda (λ) de emissão da PpIX e obtenção da curva analítica.

Uma solução estoque de PpIX foi preparada diluindo-se 4 mg em 200 mL de metanol/água (9:1), acidificada com HCl a pH 3,0 para total solubilização da PpIX. Esta solução foi estocada ao abrigo da luz, à temperatura inferior a 0°C. A partir desta solução foi preparada uma solução de 100 ng/mL em metanol/água

(9:1) e esta solução foi submetida ao λ excitação= 400 nm (DE ROSA, 1999) para se determinar o λ máximo de emissão no espectrofluorímetro.

A curva analítica foi feita na faixa de concentração de 0,5 a 40,0 ng/mL. As leituras das amostras foram feitas diretamente em espectrofluorímetro com λ de excitação: **400** nm e com pico de emissão em **632** nm (fenda: excitação/emissão= 5/5). As curvas padrão foram obtidas plotando-se os valores das concentrações de PpIX no eixo das abcissas (X) pelos valores de intensidade de fluorescência da mesma, no eixo das ordenadas (Y).

4.2.5.1.1. Determinação da precisão e exatidão do método de espectrofluorimetria para a PpIX

Para avaliar a precisão e exatidão do método, foi feita uma curva analítica em triplicata (0,5 a 40 ng/mL) e dez réplicas de amostras das concentrações de 2,5 e 20 ng/mL foram analisadas juntamente com a curva analítica, em um mesmo dia, para avaliar a precisão e exatidão intra-ensaio, e por 5 dias consecutivos, para avaliar a precisão e exatidão inter-ensaio. A precisão e exatidão foram calculadas conforme descrito anteriormente (**item 4.2.1.4**).

4.2.5.1.2. Procedimento de extração da PpIX induzida por 5-ALA após aplicação in vivo das formulações contendo 5-ALA + AO em PG.

Para este estudo, as formulações descritas no **item 4.2.4.1.2**, ou seja, as formulações contendo 1% de 5-ALA (p/p) e 0%, 2,5%, 5% e 10% AO (p/p) em PG foram aplicadas no dorso de camundongos sem pêlo, machos, apresentando pele sadia sem nenhum ferimento. Também foram testados os seguintes controles: peles de camundongos sem pêlo não tratadas, peles de camundongos tratadas somente com AO, peles de camundongos tratadas somente com PG, peles de camundongos tratadas com 10% de AO em PG, peles de camundongos tratadas com 5-ALA 1% (p/p) em PG e peles de camundongos tratadas somente com 5-ALA 20% (p/p) em PG.

Cerca de 200 mg de cada formulação e controles foram aplicados na região dorsal dos animais, em uma área de aproximadamente 2,0 cm². Os animais foram mantidos ao abrigo da luz durante 4 horas. Após este tempo, foram sacrificados, e as regiões das peles correspondentes aos locais de aplicação foram dissecadas.

O método de extração da PpIX da pele normal tratada com as formulações foi baseado na metodologia descrita por DE ROSA et al. (2000), conforme descrito a seguir.

Cerca de 200 mg de cada pele tratada (n=4 para cada grupo) foram homogeneizadas em 25,0 mL de metanol/água (v/v= 9:1) por 2 minutos, submetidas a banho de ultra-som por 15 minutos, repouso de 10 minutos e filtradas em papel de filtro comum. O filtrado resultante foi novamente filtrado através de membranas filtrantes (0,45 µm), resultando no **Filtrado 1**. O homogeneizado foi submetido a uma segunda extração, resultando no **Filtrado 2**. Os filtrados 1 e 2 foram unidos e submetidos à determinação da concentração de PpIX extraída, nas mesmas condições descritas no **item 4.2.5.1** e expressas em µg de PpIX extraída/g de pele. Todo o procedimento foi realizado ao abrigo da luz.

Um esquema da metodologia de extração da PpIX induzida por 5-ALA é mostrado na **Figura 7**.

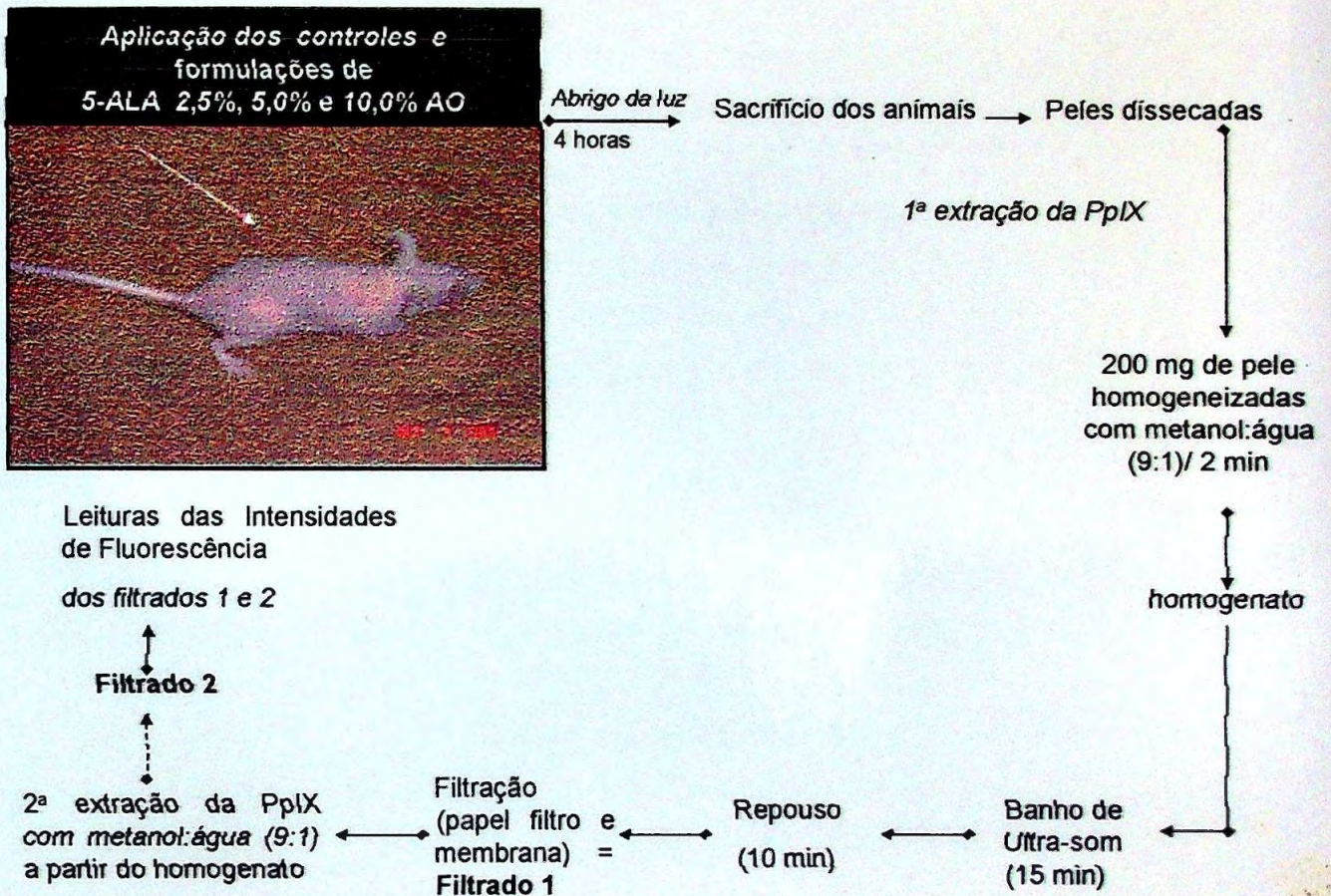


FIGURA 7: Esquema da metodologia da extração da PpIX após aplicação dos controles e formulações em modelo animal *in vivo*.

4.2.6. Avaliação do acúmulo de PpIX *in vivo* por espectroscopia de fluorescência empregando dispositivo de fibra óptica em peles sadias de camundongos sem pêlo.

*4.2.6.1. Obtenção das formulações para a quantificação da PpIX *in vivo* por fibra óptica em peles sadias de camundongos sem pêlo*

Foram preparadas formulações de 5-ALA a 1% (p/p) pesando-se 10,0 mg do fármaco e completando-se o peso para 1,0 g com soluções de ácido oléico (AO), nas concentrações de 5,0% e 10,0% em PG. As formulações controle consistiram de: solução de 5-ALA a 1% (p/p) em PG, solução de AO 10% (p/p) em PG ou somente PG.

*4.2.6.2. Metodologia analítica para a determinação *in vivo* da fluorescência da PpIX induzida por 5-ALA em peles sadias de camundongo sem pêlo.*

As formulações controle e testes obtidas no **item 4.2.6.1.** foram aplicadas no dorso de camundongos sem pêlo, machos, apresentando pele sadia sem nenhum ferimento (n= 4 animais para cada grupo, com duplicatas em cada animal).

Cerca de 200 mg de cada formulação foram aplicados na região dorsal dos animais (dorso total). Os animais foram mantidos ao abrigo da luz durante 4 horas. Após este tempo, as regiões de aplicação foram submetidas à leituras de intensidade de fluorescência da PpIX através de uma sonda de fibra óptica com diâmetro de 1 cm² (λ excitação= 400 nm e λ emissão= 632 nm) acoplada a um espectrofluorímetro e posicionada diretamente sobre a pele dos animais (**Figura 08**).

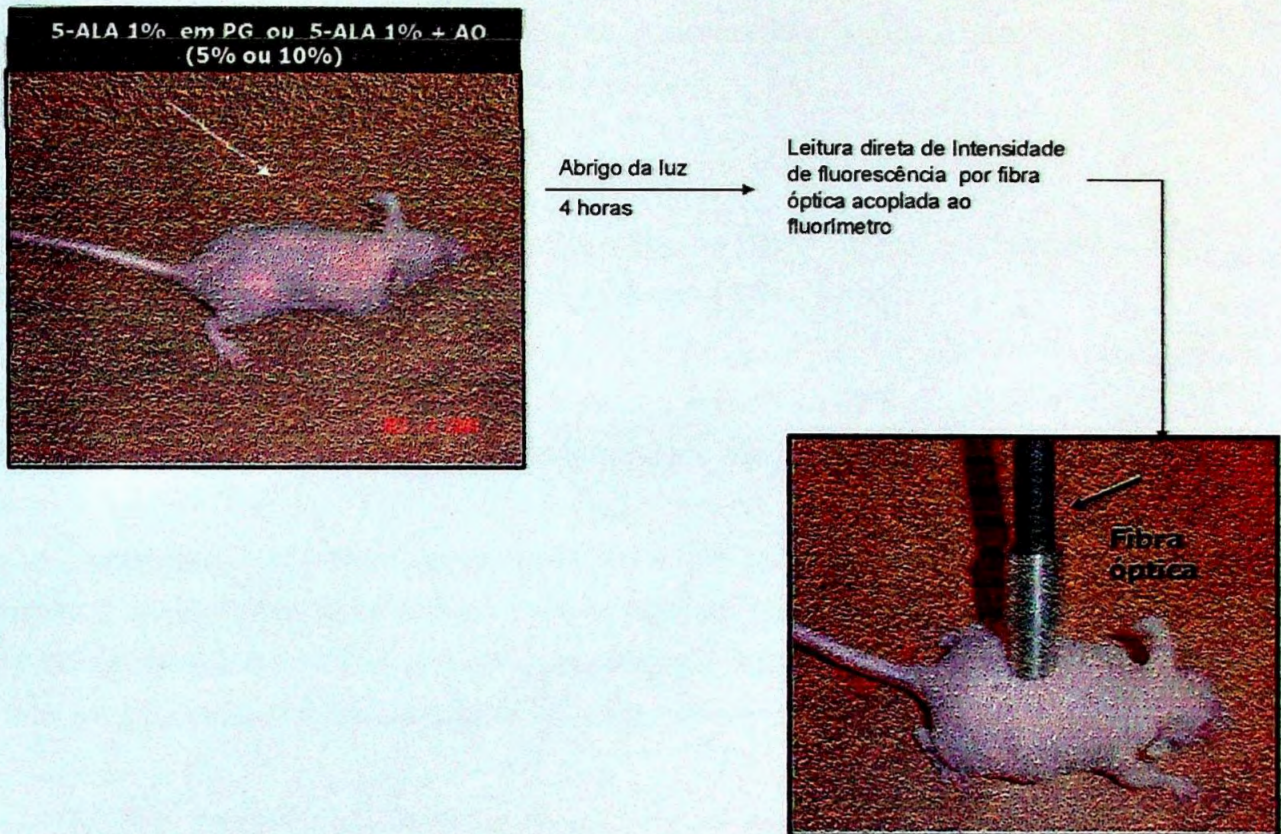


FIGURA 8: Esquema da metodologia para a determinação *in vivo* da fluorescência da PpIX induzida por 5-ALA em peles sadias de camundongo sem pêlo, utilizando dispositivo de fibra óptica. As intensidades de fluorescência da PpIX foram determinadas *in vivo* diretamente na pele animal após 4 horas de aplicação dos controles e formulações.

Antes da aplicação das formulações, foi determinada a fluorescência basal da pele dos animais (n=4). A análise dos dados foi feita com as médias de 04 camundongos para cada grupo (02 leituras para cada animal). Todo o procedimento foi realizado ao abrigo da luz. Um gráfico de barras foi construído, relacionando os valores de intensidade de fluorescência máxima obtidos *in vivo* versus formulações aplicadas (controles e testes).

4.2.7. Estudo da cinética de degradação da PpIX após a aplicação da formulação contendo 5-ALA (1% p/p) + AO (10% p/p).

4.2.7.1. Obtenção da formulação para o estudo da cinética da PpIX in vivo por fibra óptica em peles sadias de camundongos sem pêlo.

Foi preparada a formulação de 5-ALA a 1% (p/p) pesando-se 10,0 mg do fármaco e completando-se o peso para 1,0 g com solução de ácido oléico (AO), na concentração de 10,0% em PG. A formulação controle consistiu somente de uma solução de 5-ALA 1% (p/p) em PG, sem o promotor.

4.2.7.2. Metodologia Analítica para a determinação in vivo da cinética de degradação da PpIX utilizando dispositivo de fibra óptica

A formulação obtida no item anterior (4.2.7.1) foi aplicada no dorso de camundongos sem pêlo, machos, apresentando pele sadia sem nenhum ferimento (n= 7 animais para cada grupo).

Cerca de 200 mg de cada formulação foi aplicado na região dorsal dos animais (dorso total). A área de aplicação da formulação foi submetida a leituras de intensidade de fluorescência da PpIX (no mínimo 2 leituras em cada animal) no período de 30 minutos a 24 horas após o início da aplicação.

As medidas de intensidade de fluorescência foram realizadas através de uma sonda de fibra óptica com diâmetro de 1 cm² (λ excitação= 400 nm e λ emissão= 632 nm) acoplada a um espectrofluorímetro e posicionada diretamente

sobre a pele dos animais. A **Figura 9** mostra o esquema da metodologia para o estudo da cinética de acúmulo/ degradação da PpIX.

Antes da aplicação das formulações, a *autofluorescência da pele* foi determinada para a verificação da fluorescência basal da pele dos animais (n=3). A análise dos dados foi feita com as médias de 03 camundongos para cada grupo (02 leituras para cada animal). Todo o procedimento foi realizado ao abrigo da luz. Um gráfico de barras foi construído, relacionando os valores de intensidade de fluorescência máxima obtidos *in vivo* versus formulações aplicadas (controle e formulação). Os animais foram mantidos ao abrigo da luz durante todo o experimento.

Os resultados do experimento foram plotados em um gráfico relacionando o tempo (horas) *versus* intensidade de fluorescência máxima da PpIX (média dos experimentos, n=7). Para cada curva de cinética/ degradação da PpIX obtida (n=7 para controle e formulação) foi determinada a área abaixo da curva (AAC), medida matematicamente por meio da Regra dos Trapezóides e a qual representa um dos parâmetros para a avaliação da biodisponibilidade da PpIX no tecido animal.

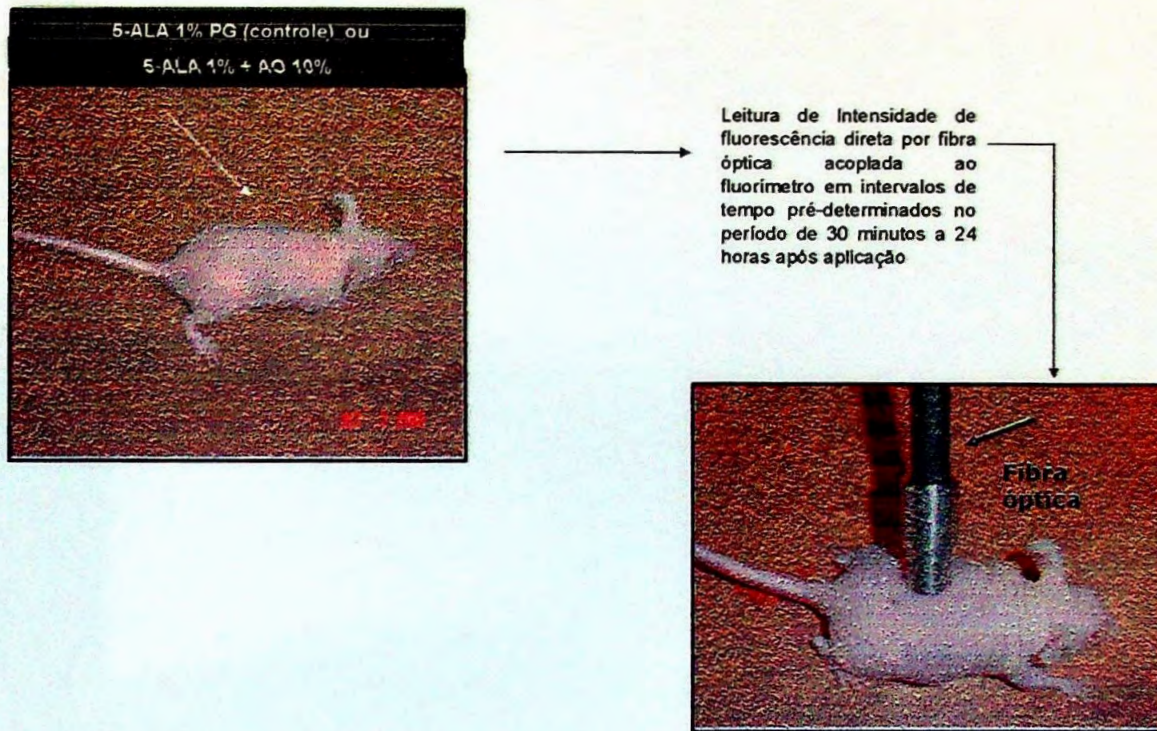


FIGURA 9: Esquema da metodologia para a avaliação da cinética de acúmulo/degradação da PpIX *in vivo* em peles sadias de camundongo sem pêlo, utilizando dispositivo de fibra óptica. As intensidades de fluorescência da PpIX foram determinadas diretamente na pele animal de 30 minutos a 24 horas após a aplicação dos controles e formulações.

5- RESULTADOS

5.1. Padronização da Metodologia para quantificação do 5-ALA por espectrofluorimetria

5.1.1. Determinação do λ de emissão dos derivados fluorescentes do 5-ALA em espectrofluorímetro.

A **Figura 10** ilustra o espectro de emissão do derivado fluorescente do 5-ALA (item 4.2.1.2), na concentração de 100 $\mu\text{g/mL}$. Utilizou-se o λ excitação = 378 nm.

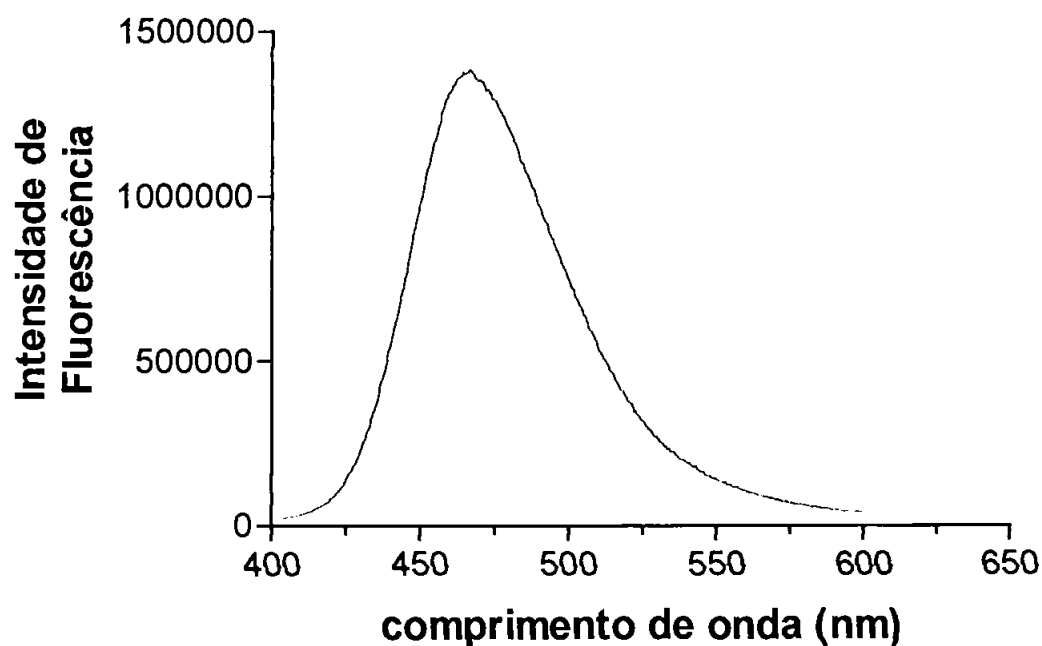


FIGURA 10: Espectro de **emissão** do derivado fluorescente de 5-ALA. (especificações: λ excitação: 378 nm, a 25°C. **Pico de emissão: 464 nm.**

5.1.2. Determinação da linearidade do método- Obtenção da curva analítica para o 5-ALA.

A **Tabela 2** mostra os parâmetros analíticos para a determinação da linearidade do método analítico para os derivados fluorescentes de 5-ALA.

TABELA 2: Valores de Intensidade de fluorescência e desvios padrão dos derivados fluorescentes do 5-ALA, em diferentes concentrações, determinados por espectrofluorimetria.

Concentração de 5-ALA ($\mu\text{g/mL}$)	*Intensidade de Fluorescência x (10)⁵
5	1,606 (\pm 0,2583)
25	4,044 (\pm 0,092)
50	7,124 (\pm 0,1453)
100	13,120 (\pm 0,7960)

Os valores em parênteses representam os desvios padrão de quatro determinações.

A **Figura 11** representa a curva analítica para o 5-ALA quantificado por Espectrofluorimetria conforme os dados apresentados na **Tabela 2**.

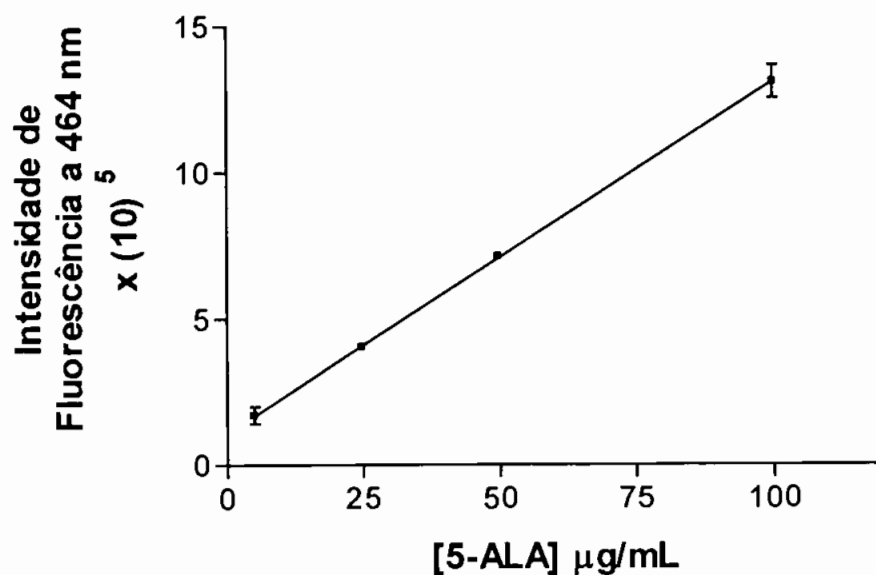


FIGURA 11 : Curva analítica do **5-ALA** em tampão fosfato pH 5,0, após derivação: λ excitação= 378 nm/ λ emissão= 464 nm; voltagem: 700 v . Curva de 5 a 100 µg/mL; $y = 0,1214 x + 1,0147$; $r = 1$; Slit (fenda): 1,5/2,5 nm

5.1.3. Determinação da precisão e exatidão intra e inter-ensaios do método de espectrofluorimetria para o 5-ALA.

A **Tabela 3** mostra os valores da precisão e exatidão intra-ensaio para o fármaco 5-ALA.

TABELA 3: Avaliação da precisão e exatidão intra-ensaio para o 5-ALA.

Concentração real ($\mu\text{g/mL}$)	Concentração obtida ($\mu\text{g/mL}$)	C. V (%)	E (%)
5	4,89 (\pm 0,38)	7,69	97,8
50	51,42 (\pm 1,044)	2,03	102,84

Os resultados representam a média e os desvios padrão de 10 determinações. C. V= coeficiente de variação; E= exatidão.

A **Tabela 4** mostra os valores da precisão e exatidão inter-ensaio para o fármaco 5-ALA.

TABELA 4: Avaliação da precisão e exatidão inter-ensaio para o 5-ALA.

Concentração real ($\mu\text{g/mL}$)	Concentração obtida ($\mu\text{g/mL}$)	C. V (%)	E (%)
5	4,97 (\pm 0,2110)	5,34	99,3
50	51,32 (\pm 1,268)	2,85	102,64

Os resultados representam a média e os desvios padrão de 5 determinações. CV= coeficiente de variação; E= exatidão.

5.2. Determinação da linearidade do método para os derivados esterificados ALA n-hexil e ALA n-octil éster

5.2.1. Determinação do λ de emissão dos derivados fluorescentes de ALA n-hexil e ALA n-octil éster em espectrofluorímetro.

A **Figura 12** ilustra os espectros de emissão dos derivados fluorescentes de ALA n-hexil e ALA n-octil éster, na concentração de 100 $\mu\text{g/mL}$. Utilizou-se o λ excitação = 378 nm.

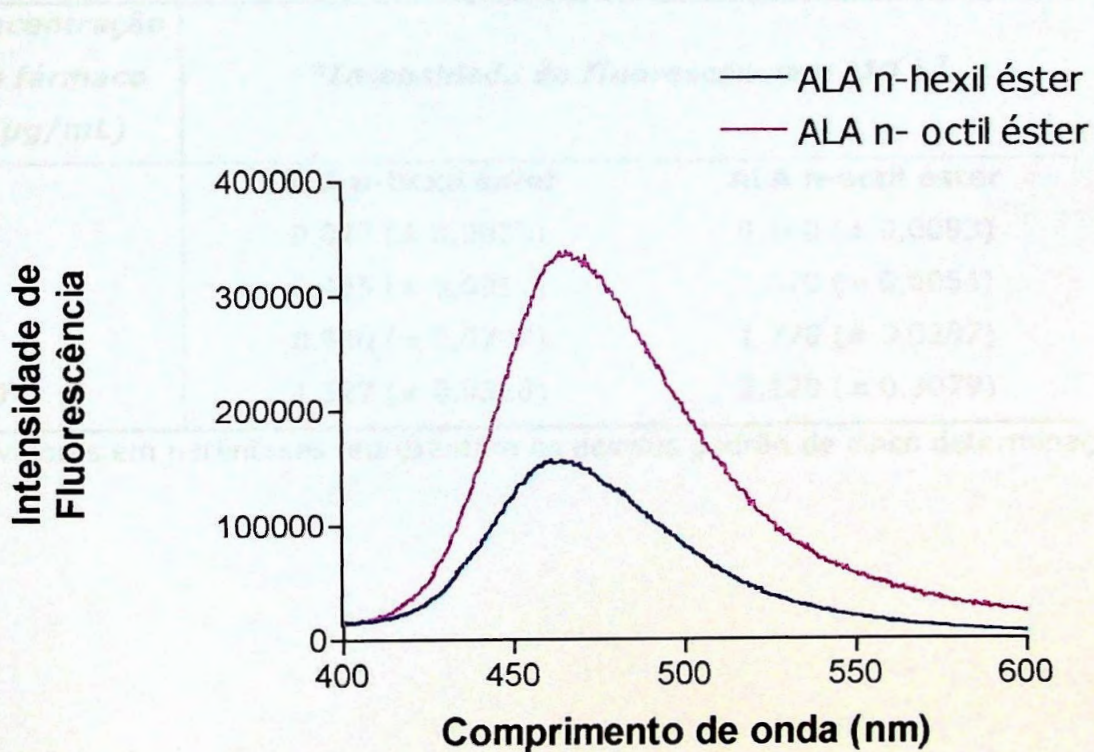


FIGURA 12: Espectros de **emissão** dos derivados fluorescentes dos ésteres ALA n-hexil e ALA n-octil. (especificações: λ excitação: 378 nm, a 25°C. **Pico de emissão: 464 nm.**

5.2.2. Obtenção das curvas analíticas para ALA n-hexil e ALA n-octil éster.

A **Tabela 5** mostra os parâmetros analíticos para a determinação da linearidade do método analítico para os derivados fluorescentes do ALA n-hexil e ALA n-octil ésteres.

TABELA 5: Valores de Intensidade de fluorescência e desvios padrão dos derivados fluorescentes de ALA n-Hexil e ALA n-octil éster determinados por espectrofluorimetria.

Concentração do fármaco ($\mu\text{g/mL}$)	*Intensidade de Fluorescência x (10)⁵	
	ALA n-hexil éster	ALA n-octil éster
5	0,077 (\pm 0,0035)	0,560 (\pm 0,0093)
25	0,465 (\pm 0,0919)	1,070 (\pm 0,0054)
50	0,940 (\pm 0,0707)	1,770 (\pm 0,0287)
100	1,527 (\pm 0,0318)	3,120 (\pm 0,3079)

Os valores em parênteses representam os desvios padrão de cinco determinações.

As **Figuras 13 e 14** representam as curvas analíticas e as equações das retas obtidas para o ALA n-hexil éster e ALA n-octil éster, quantificados por espectrofluorimetria, segundo os dados apresentados na **Tabela 5**.

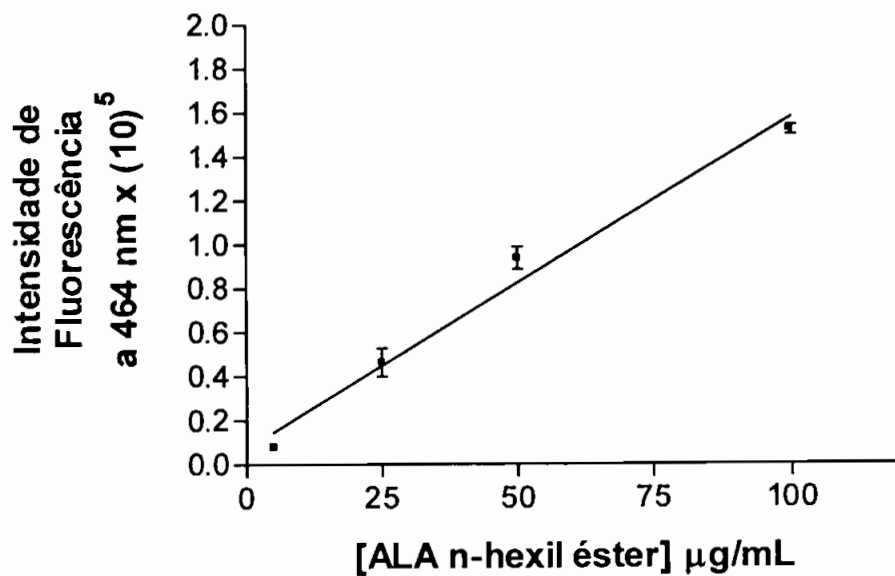


FIGURA 13 : Curva analítica do **ALA- n hexil éster**: λ excitação= 378 nm/ λ emissão= 464 nm; voltagem: 700 v. Curva de 5 a 100 µg/mL. $y = 0,0151 x + 0,0725$; $r = 0,9910$; Slit (fenda): 1,5/2,5 nm.

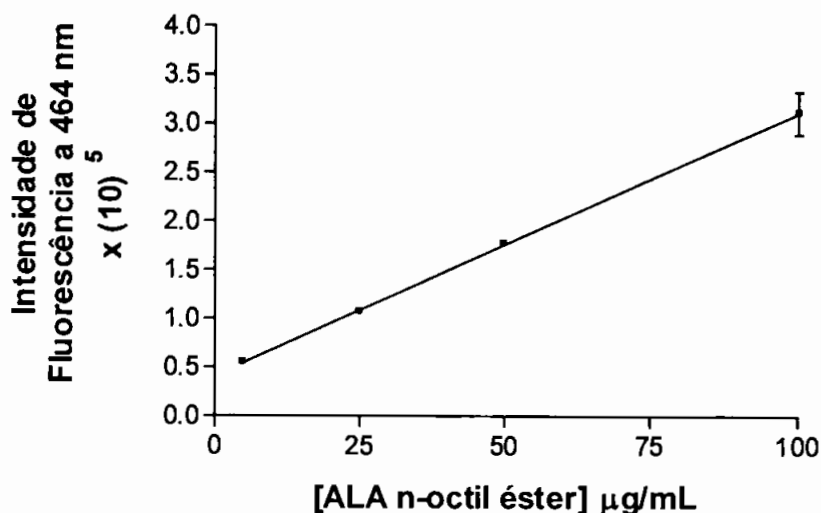


FIGURA 14: Curva analítica do **ALA- n octil éster**:: λ excitação= 378 nm/ λ emissão= 464 nm; voltagem: 700 v. Curva de 5 a 100 $\mu\text{g/mL}$.
 $y = 0,027 x + 0,4143$; $r = 0,9999$; Slit (fenda): 1,5/2,5 nm.

5.3. Caracterização dos parâmetros físico-químicos de 5-ALA e de seus ésteres

Os resultados dos coeficientes de partilha óleo/água, pele/água e estrato córneo/água do 5-ALA, ALA n-hexil éster e ALA n-octil éster, obtidos como descrito no item 4.2.3., estão representados na **Tabela 6**, assim como a análise estatística dos resultados. A **Figura 15** mostra os valores de K para cada fármaco estudado.

Tabela 6: Resultados referentes aos parâmetros físico-químicos do 5-ALA e de seus ésteres.

Coefficiente de partilha	5-ALA	ALA hexil éster	ALA octil éster
K_{O/A}^a	0,055 (± 0,007)	0,1720 (± 0,035)	0,3205 (± 0,010)
K_{P/A}^b	0,032 (± 0,007)	0,2740 (± 0,135)	0,8265 (± 0,020)
K_{EC/A}^c	0,020 (± 0,002)	0,356 (± 0,092)	0,374 (± 0,194)

Os valores entre parênteses representam os desvios padrão de 3 determinações.

^a, ^b, ^c Teste estatístico ONE WAY ANOVA (Teste de múltiplas comparações de Tukey). Valores considerados significativos para $P < 0,05$.

^c Não significativo somente para ALA n-hexil éster *versus* ALA n-octil éster

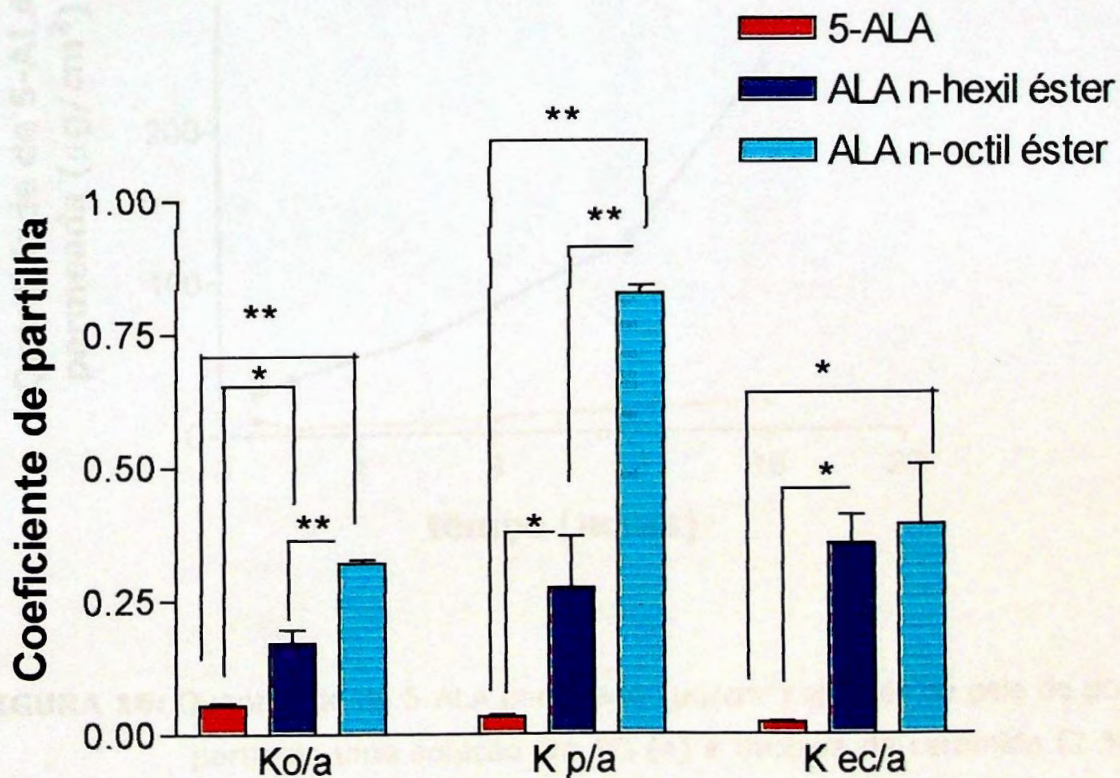


FIGURA 15: Valores do coeficiente de partilha (K): K_{O/A}, K_{P/A} e K_{EC/A} do 5-ALA e de seus ésteres mostrados na **Tabela 6**.

5.4. Estudos *in vitro* de permeação e retenção cutâneas de 5-ALA e de seus ésteres

5.4.1. Estudos de permeação e retenção cutâneas *in vitro* para a mistura de 5-ALA + Ceramida

A **FIGURA 16** representa o perfil de permeação de 5-ALA a partir da mistura de ceramida + 5-ALA (**item 4.2.4.1.1**) através de pele de porco em função do tempo.

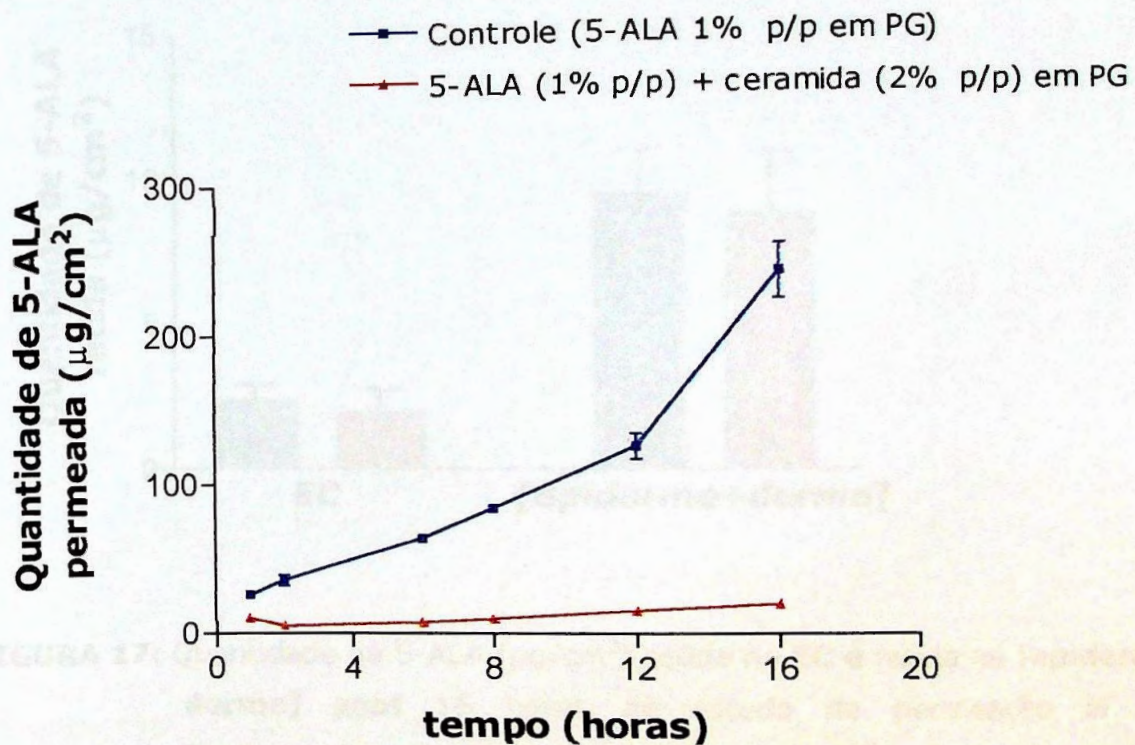


FIGURA 16: Quantidade de 5-ALA permeado ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$) através de pele de porco, a partir de uma solução em PG (■) e mistura de ceramida (2 % p/p) em PG (▲) em função do tempo (horas). Porcentagem de 5-ALA nas formulações: 1% (p/p). Valores expressos em erro médio padrão, (n=4) para cada grupo (significativo para $P < 0,05$). Análise estatística: T Test.

A **Figura 17** representa as quantidades de 5-ALA (μg) retidas no **EC** bem como na [**epiderme + derme**] após 16 horas de estudos de permeação *in vitro*, em pele de porco, para as formulações estudadas.

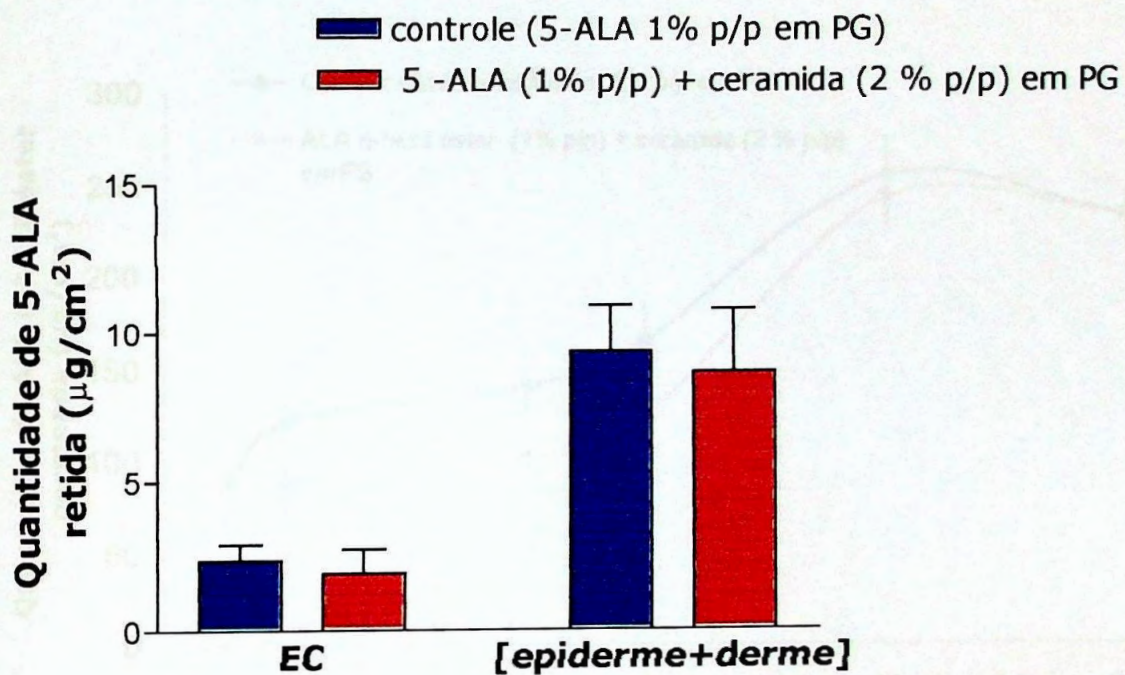


FIGURA 17: Quantidade de 5-ALA ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$) retida no **EC** e retida na [**epiderme + derme**] após 16 horas de estudo de permeação *in vitro*.

Porcentagem de 5-ALA nas formulações: 1 % (p/p). Valores expressos em erro médio padrão, ($n=4$) para cada grupo. Análise estatística: T Test, grupos não diferentes significativamente.

5.4.2. Estudos de permeação e retenção cutâneas *in vitro* para a mistura de ceramida + ALA n-hexil éster

A **Figura 18** representa o perfil de permeação de ALA-n hexil éster a partir da mistura de ceramida + ALA-n hexil éster (item 4.2.4.1.1) através de pele de porco em função do tempo.

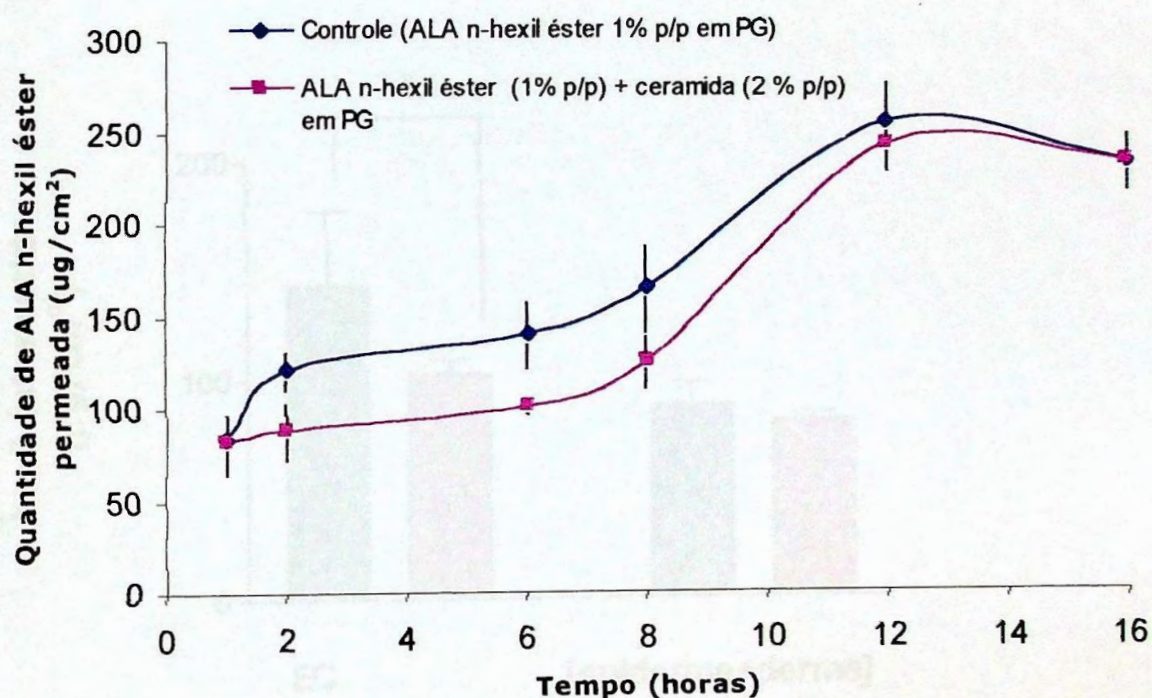


FIGURA 18: Quantidade de ALA n-hexil éster permeado ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$) através de pele de porco, a partir de uma solução em PG (●) e mistura de ceramida a 2 % p/p em PG (■) em função do tempo (horas). Porcentagem de ALA n-hexil éster nas formulações: 1% (p/p). Valores expressos em erro médio padrão, $n=3$ para cada grupo. Valores significativos ($P < 0,01^*$) para os tempos de 2, 6 e 8 horas. Análise estatística: T Test.

A **Figura 19** representa as quantidades de 5-ALA retidas no **EC** bem como na [**epiderme + derme**] após 16 horas de estudos de permeação *in vitro*, em pele de porco, para as formulações estudadas.

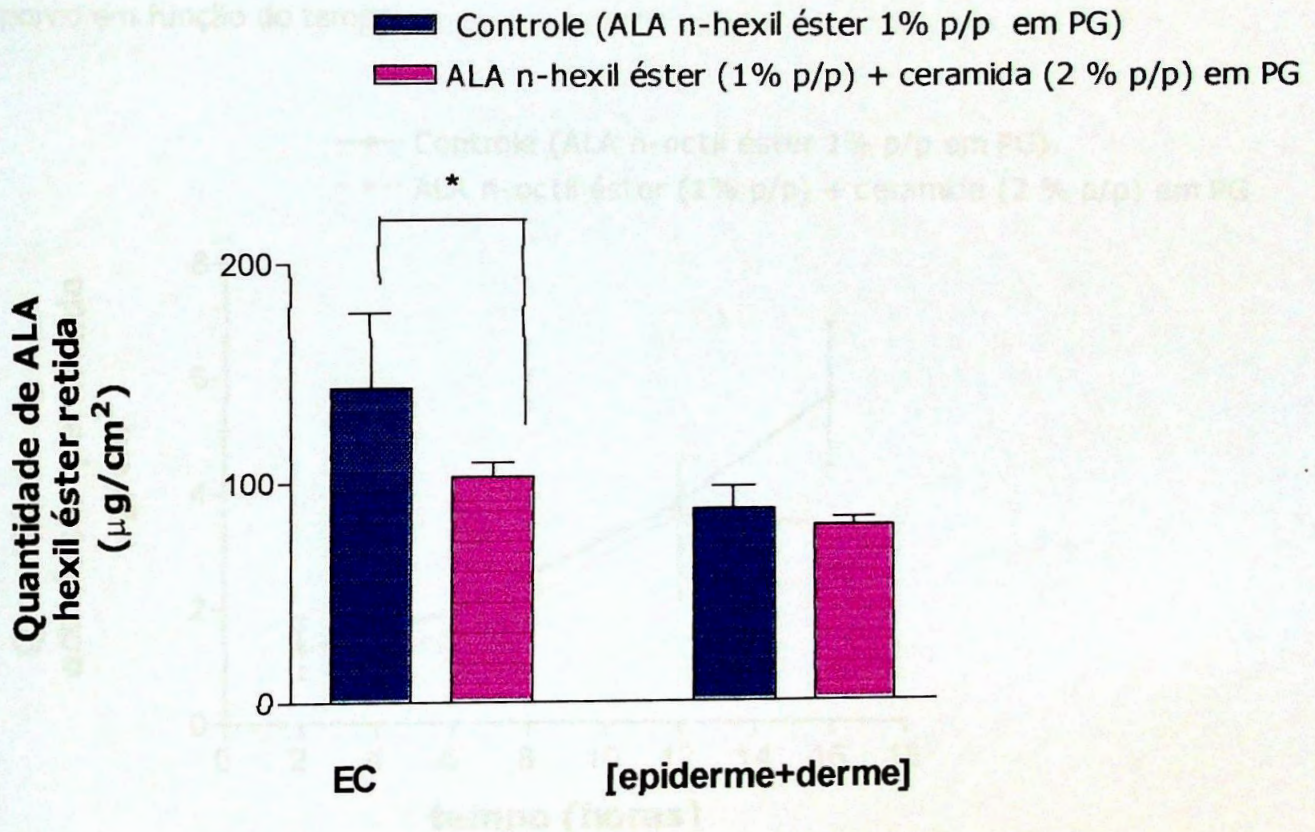


FIGURA 19: Quantidade de 5-ALA hexil éster ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$) retida no **EC** e na [**epiderme + derme**] após 16 horas de estudo de permeação *in vitro*. Porcentagem de ALA n-hexil éster nas formulações : 1% (p/p). Valores expressos em erro médio padrão, $n=3$ para cada grupo. Valores significativos ($P < 0,01^*$) para a retenção no EC e não significativo para retenção na [epiderme + derme] entre controle e formulação. Análise estatística: T Test.

5.4.3. Estudos de permeação e retenção cutâneas *in vitro* para a mistura ceramida + ALA n-octil éster.

A **Figura 20** representa o perfil de permeação de ALA-n octil éster a partir da mistura de ceramida + ALA-n octil éster (**item 4.2.4.1.1**) através de pele de porco em função do tempo.

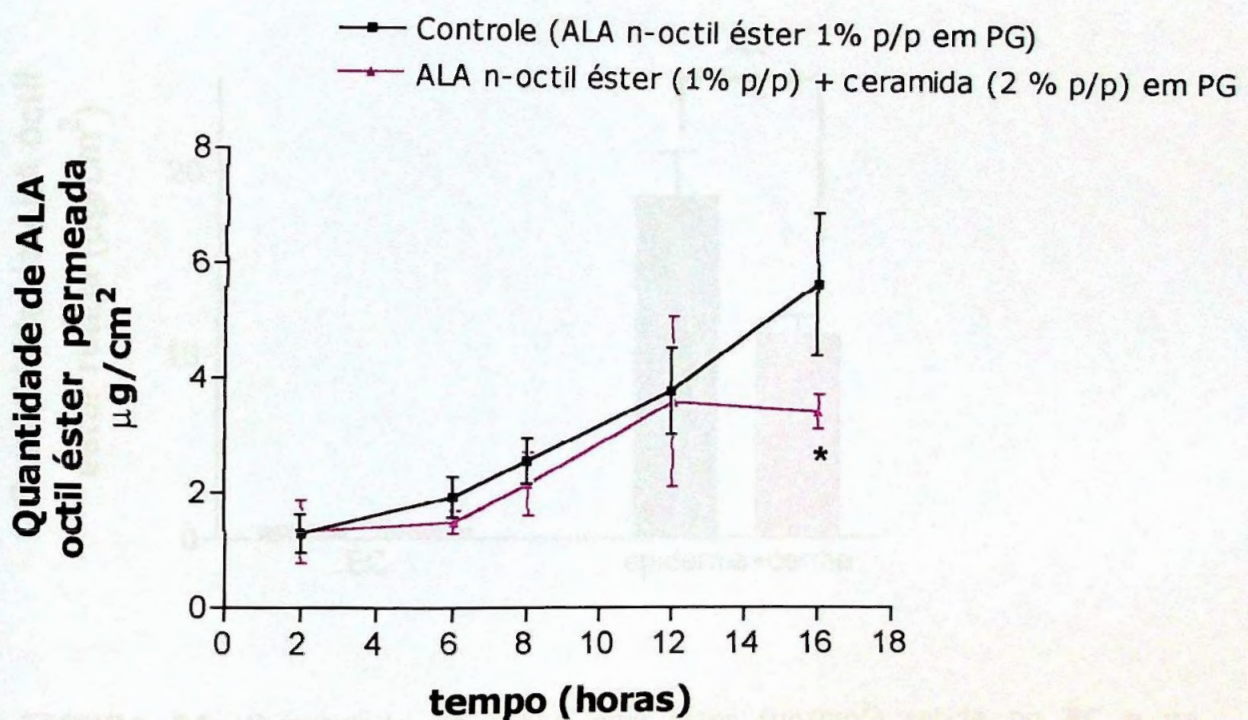


FIGURA 20: Quantidade de ALA n-octil éster permeado ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$) através de pele de porco, a partir de uma solução em propilenoglicol (■) e mistura de ceramida + ALA n-octil éster (■) em função do tempo (horas). Porcentagem de ALA n-octil éster nas formulações: 1% (p/p). Valores expressos em erro médio padrão, $n=3$ para cada grupo. *Valor significativo ($P < 0,0001$ ***) somente para tempo de 16 horas. Análise estatística: T Test.

A **Figura 21** representa as quantidades de ALA n-octil éster retidas no **EC** bem como na [**epiderme + derme**] após 16 horas de estudos de permeação *in vitro*, em pele de porco, para as formulações estudadas.

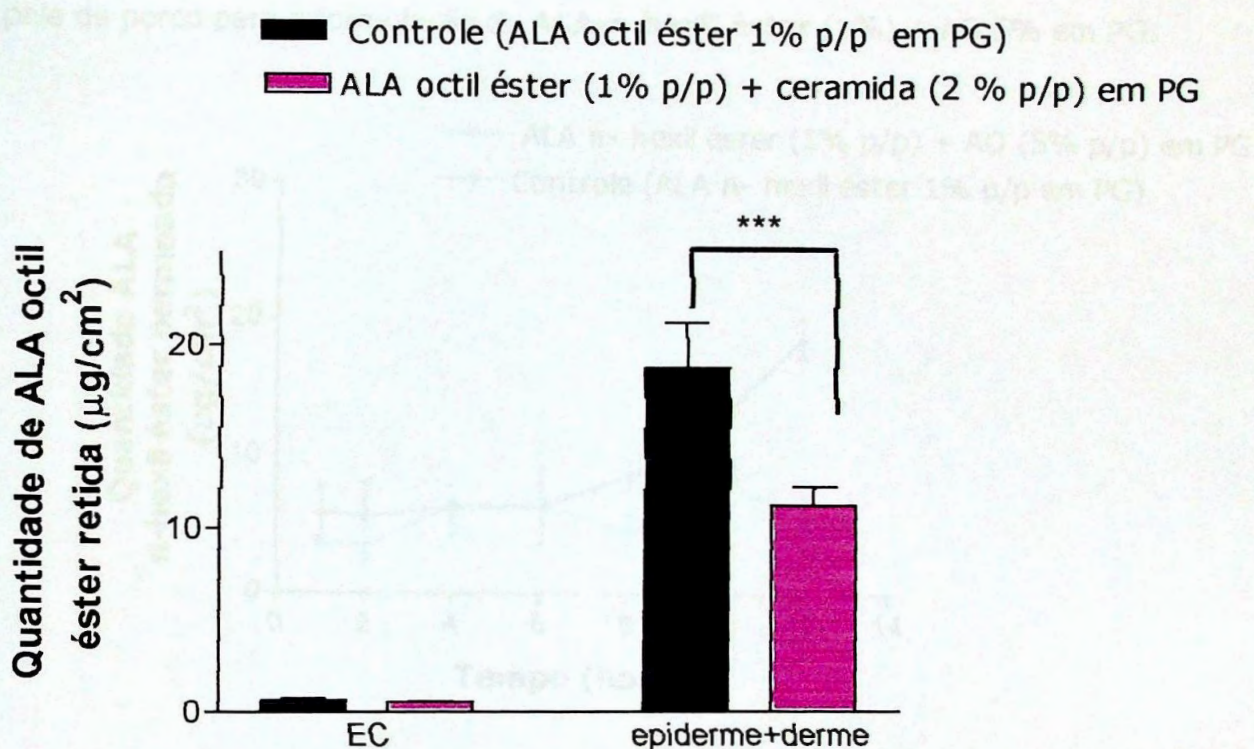


FIGURA 21: Quantidade de 5-ALA octil éster ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$) retida no **EC** e na [**epiderme + derme**] após 16 horas de estudo de permeação *in vitro*. Porcentagem de ALA n-octil éster na formulação: 1% (p/p). Valores expressos em erro médio padrão, $n=3$ para cada grupo. Valores considerados significativos para $P < 0,05$. Não significativo para valores de retenção no EC. Análise estatística: T Test.

5.4.4. Estudos de permeação e retenção cutâneas *in vitro* para as formulações de ALA n-hexil éster + ácido oléico (AO) em PG.

A **Figura 22** representa o perfil de permeação cutânea *in vitro* através de pele de porco para a formulação de **ALA-n-hexil éster** (1%) + AO 5% em PG.

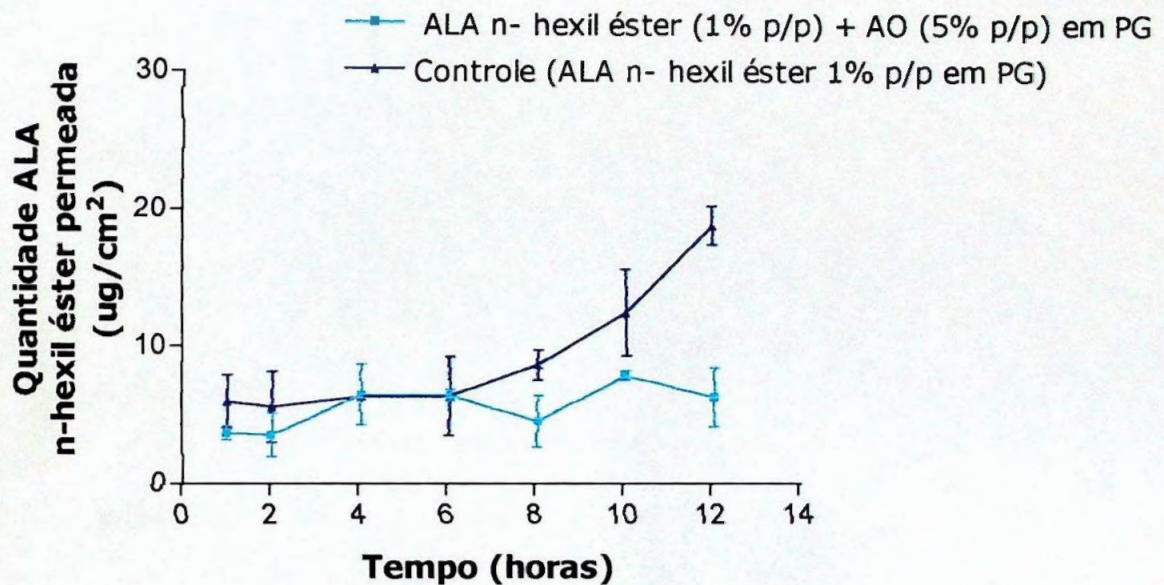


FIGURA 22: Quantidade de **ALA n-hexil** permeado ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$) através de pele de porco, a partir de uma solução em PG (■) e formulação contendo AO 5% (■) em função do tempo (horas). Concentração de ALA n-hexil nas formulações: 1%. Valores expressos em erro médio padrão, $n=3$ para cada grupo. Diferenças consideradas significativas nos tempos de 8 a 10 horas ($P < 0,01^*$) e no tempo de 12 horas ($P < 0,001^{**}$). Análise estatística: T Test.

A **Figura 23** representa as quantidades de ALA hexil éster retidas no **EC** bem como na [**epiderme + derme**] após 12 horas de estudos de permeação *in vitro*, em pele de porco, para as formulações estudadas.

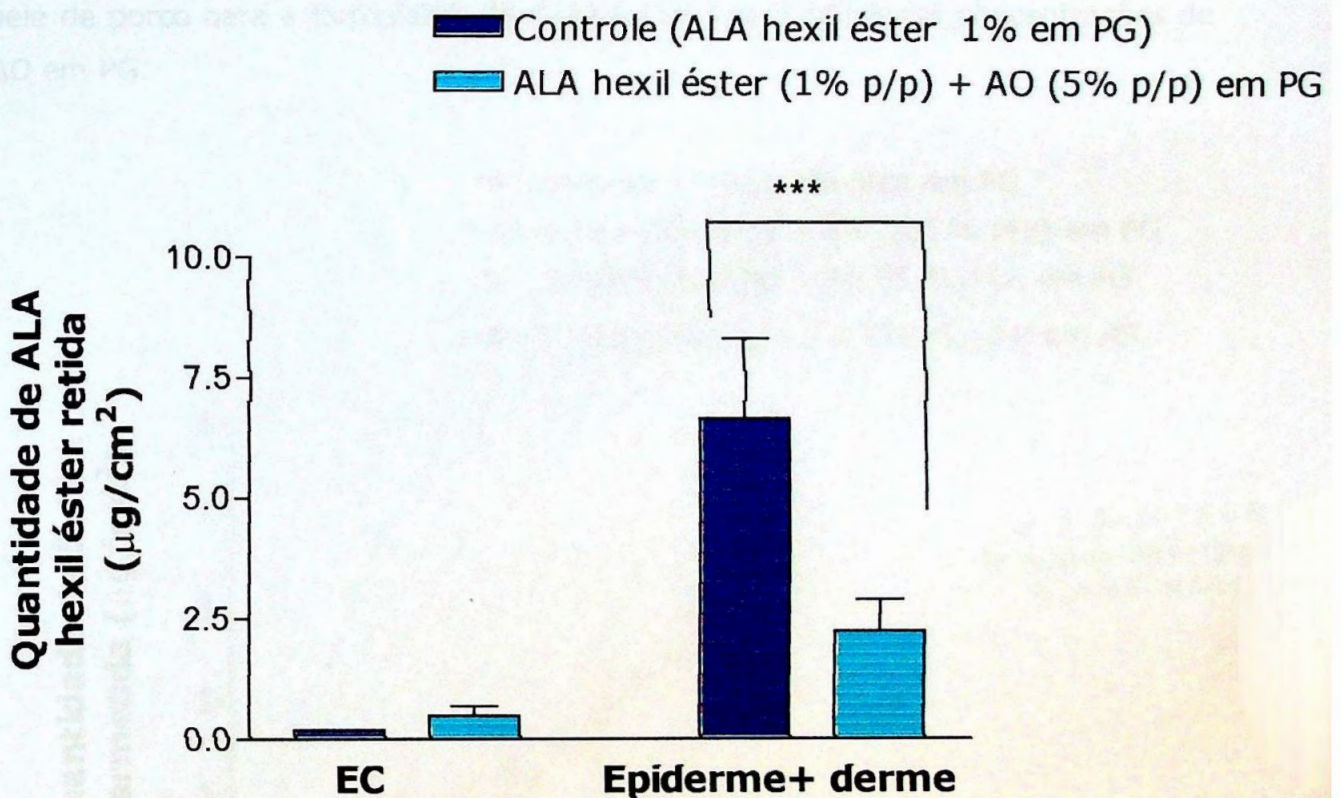
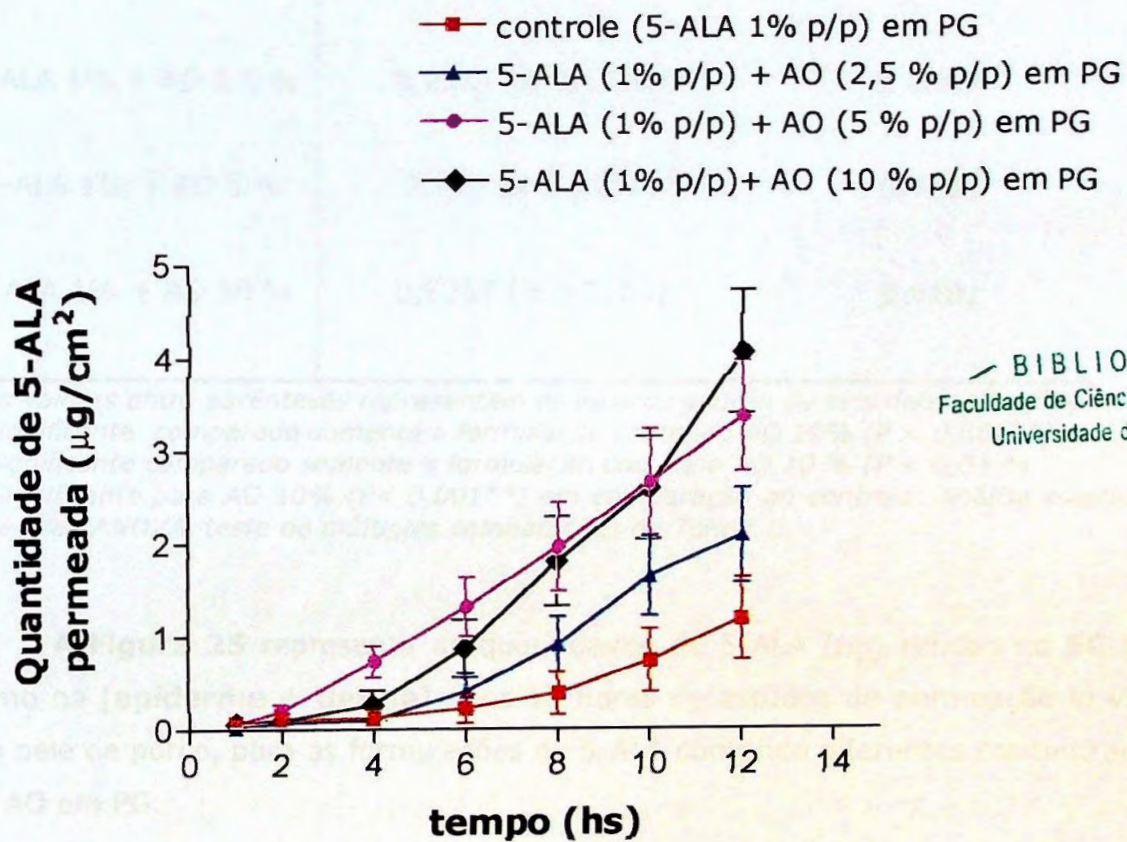


FIGURA 23: Quantidade de 5-ALA hexil éster (µg/cm²) retida no **EC** e na [**epiderme + derme**] após 12 horas de estudo de permeação *in vitro*. Porcentagem de ALA n-octil éster na formulação: 1% (p/p). Valores expressos em erro médio padrão, n=3 para cada grupo. Valores considerados significativos para P < 0,05. Não significativo para valores de retenção no EC. Análise estatística: T Test.

5.4.5. Estudos de permeação e retenção cutâneas *in vitro* para as formulações de 5-ALA + AO em diferentes concentrações (2,5%, 5% e 10% p/p) em PG.

A **Figura 24** representa o perfil de permeação cutânea *in vitro* através de pele de porco para a formulação de **5-ALA** (1%) com diferentes concentrações de AO em PG.



BIBLIOTECA
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Universidade de São Paulo

FIGURA 24: Quantidade de 5-ALA permeado ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$) através de pele de porco, a partir de uma solução em PG (■) e formulações contendo AO 2,5 % (▲) 5% (●) e 10% (◆) em propilenoglicol em função do tempo (horas). Concentração de 5-ALA nas formulações: 1%. Valores expressos em erro médio padrão (n=6) para cada grupo. Diferença significativa para as formulações contendo AO 5% ($P < 0,01^{**}$) e AO 10% ($P < 0,001^{***}$) comparados ao controle, após 12 horas de experimento. Análise estatística: One way ANOVA (Teste de múltiplas comparações de Tukey).

A **Tabela 7** representa os valores do fluxo (J) *in vitro* do 5-ALA através da pele animal, obtidos da porção linear dos perfis da **Figura 24**.

TABELA 7: Valores de fluxo J ($\mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{hora}$) para o 5-ALA (**Figura 24**)

Formulações em PG	Fluxo J ($\mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{hora}$)*	Correlação linear (r)
5-ALA 1 %	0,2601 (\pm 0,1283)	0,9974
5-ALA 1% + AO 2,5 %	0,2444 (\pm 0,1329) ^a	0,9953
5-ALA 1% + AO 5 %	0,372 (\pm 0,1221) ^b	0,9991
5-ALA 1% + AO 10 %	0,6257 (\pm 0,2264) ^c	0,9881

*Os valores entre parênteses representam os desvios padrão de seis determinações.

^a Significante comparado somente a formulação contendo AO 10% ($P < 0,001^{**}$)

^b Significante comparado somente a formulação contendo AO 10 % ($P < 0,01$ *)

^c Significante para AO 10% ($P < 0,001^{**}$) em comparação ao controle. Análise estatística: One-Way ANOVA, teste de múltiplas comparações de Tukey.

A **Figura 25** representa as quantidades de 5-ALA (μg) retidas no **EC** bem como na [**epiderme + derme**] após 12 horas de estudos de permeação *in vitro*, em pele de porco, para as formulações de 5-ALA contendo diferentes concentrações de AO em PG.

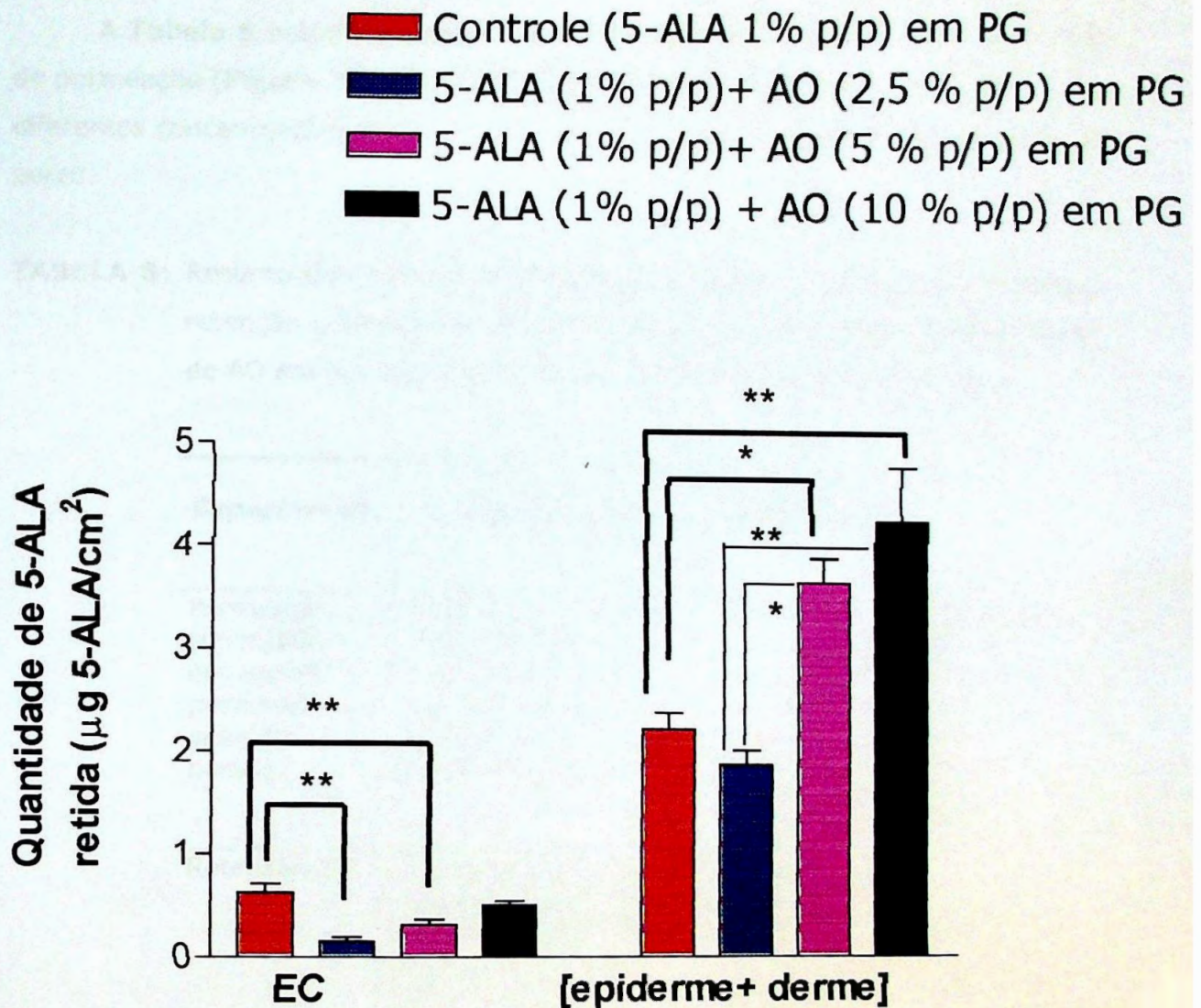


FIGURA 25: Quantidade de 5-ALA (μg) retida no **EC** e na **[epiderme + derme]** após 12 horas de permeação *in vitro*. Valores expressos em erro médio padrão e considerados significativamente diferentes em relação ao controle para $P < 0,05$. Análise estatística: One way ANOVA (Teste de múltiplas comparações de Tukey).

A **Tabela 8** mostra o resumo dos dados estatísticos para os estudos *in vitro* de permeação (**Figura 24**) e retenção (**Figura 25**) do 5-ALA (1% p/p) para diferentes concentrações de AO em PG, após 12 horas de experimento com pele de porco.

TABELA 8: Resumo dos dados estatísticos dos estudos *in vitro* de permeação e retenção cutâneas do 5-ALA (1% p/p) para diferentes concentrações de AO em PG, após 12 horas de experimento com pele de porco.

Experimento	Comparação	Significância^a
Permeação (quantidade em ug/cm ² permeada após 12 horas)	Controle x AO 2.5%	$P > 0,05$
	Controle x AO 5%	$P < 0,01$ **
	Controle x AO 10%	$P < 0,001$ ***
	AO 2,5 % x AO 5 %	$P > 0,05$
	AO 2,5 % x AO 10 %	$P < 0,05$ *
	OA 5% x AO 10%	$P > 0,05$
Retenção (EC)	Controle x AO 2.5%	$P < 0,001$ **
	Controle x AO 5.0%	$P < 0,001$ **
	Controle x AO 10%	$P > 0,05$
	AO 2,5 % x AO 5 %	$P < 0,05$ *
	AO 2,5 % x AO 10 %	$P < 0,001$ **
	OA 5% x AO 10%	$P < 0,05$ *
Retenção [epiderme + derme]	Controle x AO 2.5%	$P > 0,05$
	Controle x AO 5%	$P < 0,01$ *
	Controle x AO 10%	$P < 0,001$ **
	AO 2,5 % x AO 5 %	$P < 0,01$ *
	AO 2,5 % x AO 10 %	$P < 0,001$ **
	AO 5 % x AO 10%	$P > 0,05$

^a Considerado significativo para $P < 0,05$

5.5. Metodologia para a quantificação *in vitro* da PpIX induzida por 5-ALA em peles de camundongo sem pêlo.

5.5.1. Determinação do λ de emissão de fluorescência da PpIX e obtenção das curvas analíticas da PpIX.

A **Figura 26** ilustra o espectro de emissão de fluorescência da PpIX, obtido segundo o item 4.2.5.1.

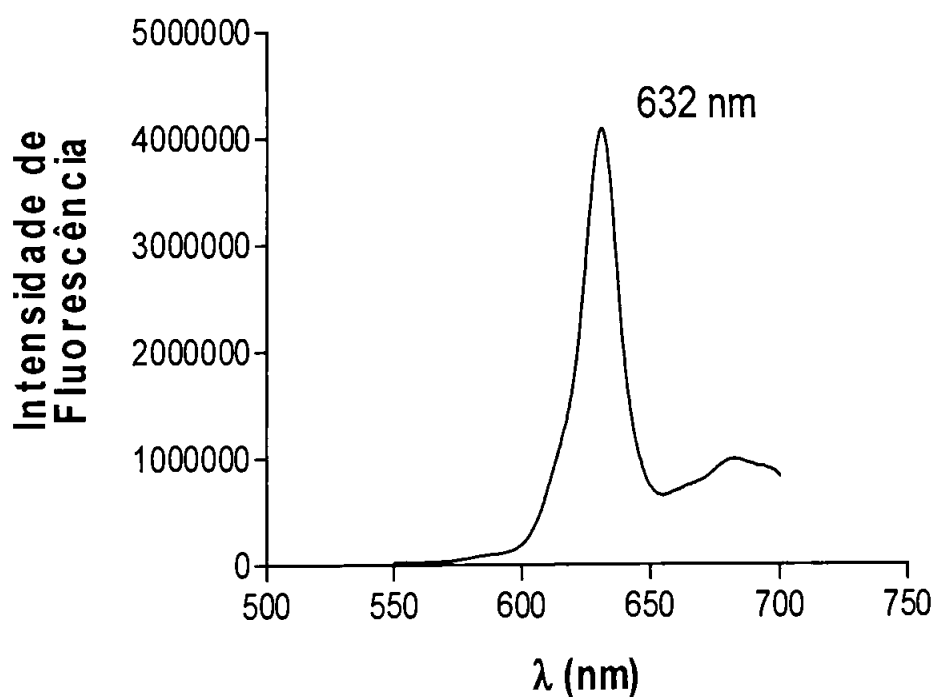


FIGURA 26: Espectro de emissão de fluorescência da PpIX em metanol/água (v/v=9:1). Especificações: λ de excitação: 400 nm; fenda de excitação/emissão: 5/5). **Pico de emissão= 632 nm.**

5.5.2. Curva analítica da PpIX em metanol/água

A **Tabela 9** mostra os valores para a elaboração da curva analítica de PpIX em metanol/água (9:1) (**Figura 24**) pelo método proposto no item 4.2.5.1.

TABELA 09: Parâmetros analíticos obtidos para a elaboração da curva analítica de PpIX em metanol/ água (9:1) por fluorimetria.

<i>Concentração de PpIX (ng/mL)</i>	<i>Intensidade de Fluorescência x 10⁵</i>
0,5	0,288 (± 0,011)
1,0	0,462 (±0,030)
2,5	1,030(± 0,025)
10	3,803 (±0,222)
20	7,773 (±0,046)
30	11,684 (±0,130)
40	15,339(±0,043)

Os valores entre parênteses representam os desvios padrão de três determinações.

A **Figura 27** ilustra os espectros de emissão de fluorescência da PpIX a diferentes concentrações.

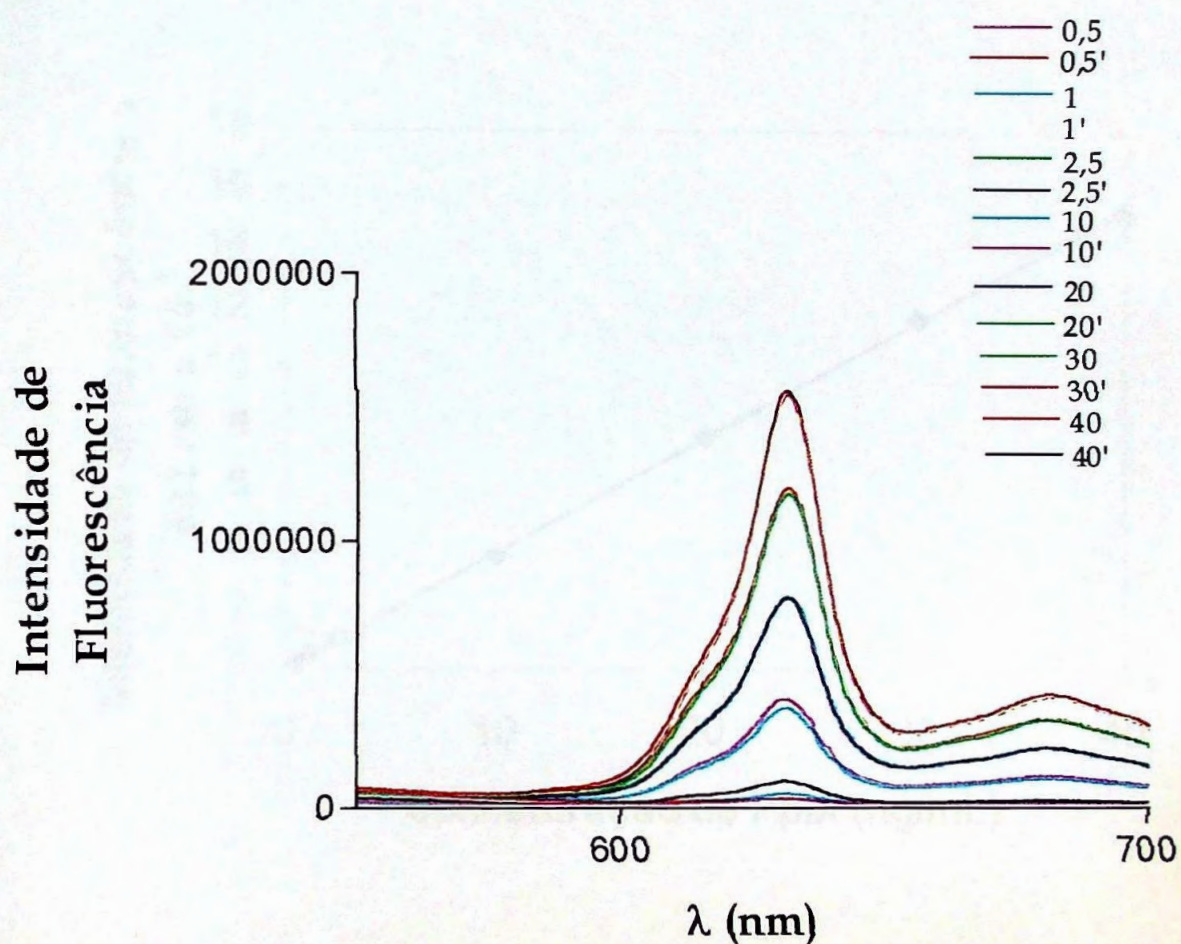


FIGURA 27: Espectros de emissão de fluorescência da PpIX. Especificações: Ex: 400nm /Em: 632 nm; fenda: 5,0/5,0 nm; a 25°C. Os valores indicados na legenda representam os valores de concentração de PpIX em ng/mL em metanol /água (9:1) utilizados para a curva analítica.

A **Figura 28** mostra a curva analítica da PpIX em metanol/água na faixa de concentração de 0,5 a 40 ng/mL, obtida dos valores máximos de emissão de fluorescência.

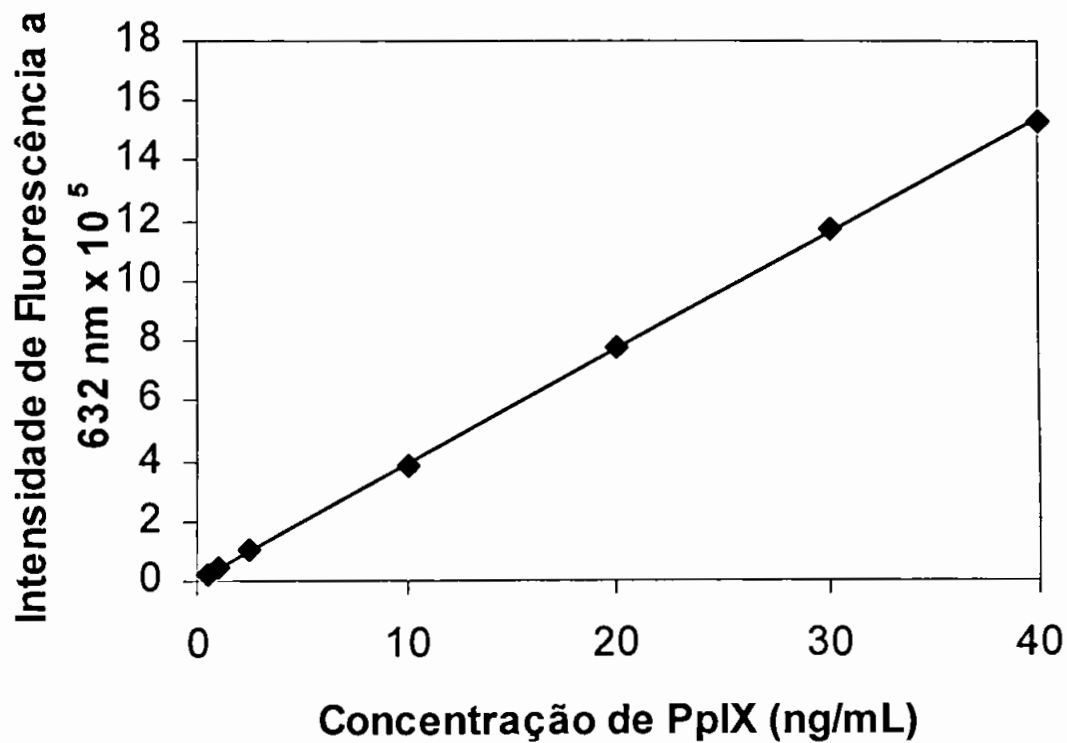


FIGURA 28: Curva analítica para a PpIX em metanol/ água (9:1):
 λ excitação= 400 nm; λ emissão= 632 nm.
 $y = 0,3835 x + 0,0706$; $r = 0,9999$

5.5.3. *Determinação da precisão e exatidão intra e inter-ensaios do método de espectrofluorimetria para a PpIX*

A **Tabela 10** mostra os valores da precisão e exatidão intra -ensaio para a PpIX

TABELA 10: Avaliação da precisão e exatidão intra-ensaio para a PpIX

Concentração real (ng/mL)	Concentração obtida (ng/mL)	C. V (%)	E (%)
2,5	2,867 (\pm 0,02)	0,69	114,68
20	18,93 (\pm 0,70)	3,70	94,65

Os resultados representam a média e os desvios padrão de 10 determinações. CV= coeficiente de variação; E= exatidão.

A **Tabela 11** mostra os valores da precisão e exatidão inter-ensaio para a PpIX

TABELA 11: Avaliação da precisão e exatidão inter-ensaio para a PpIX

Concentração real (ng/mL)	Concentração obtida (ng/mL)	C. V (%)	E (%)
2,5	2,54 (\pm 0,2470)	3,41	102,13
20	20,33 (\pm 0,802)	2,51	101,2

Os resultados representam a média e os desvios padrão de 5 determinações. CV= coeficiente de variação; E= exatidão.

5.5.4. Extração da PpIX dos tecidos após a aplicação das formulações contendo 5-ALA e AO (2,5%, 5% e 10%) em PG.

Os resultados do procedimento de extração da PpIX dos tecidos estão representados na **Tabela 12** e na **Figura 29**.

TABELA 12: Valores de PpIX extraída, induzida por 5-ALA e AO em PG, extraída de peles de camundongo sem pêlo, após 4 horas de aplicação tópica *in vivo* das formulações.

Controles	ng PpIX/ g de pele
Camundongo não tratado	289,13 (\pm 50,81)
PG	170,85 (\pm 39,33)
AO	168,87 (\pm 9,39)
5-ALA 1% (p/p) em PG	738,73 (\pm 43,27)
5-ALA 20% (p/p) em PG	805,59 (\pm 298,75)
AO 10% (p/p) em PG	222,48 (\pm 9,67)
Formulações	ng PpIX/ g de pele
5-ALA 1% + AO 2,5%	648,55 (\pm 76,1)
5-ALA 1% + AO 5%	1332,94 (\pm 356,45)
5-ALA 1% + AO 10%	1595,3 (\pm 348,55)

Os valores entre parênteses representam os desvios padrão de quatro determinações.

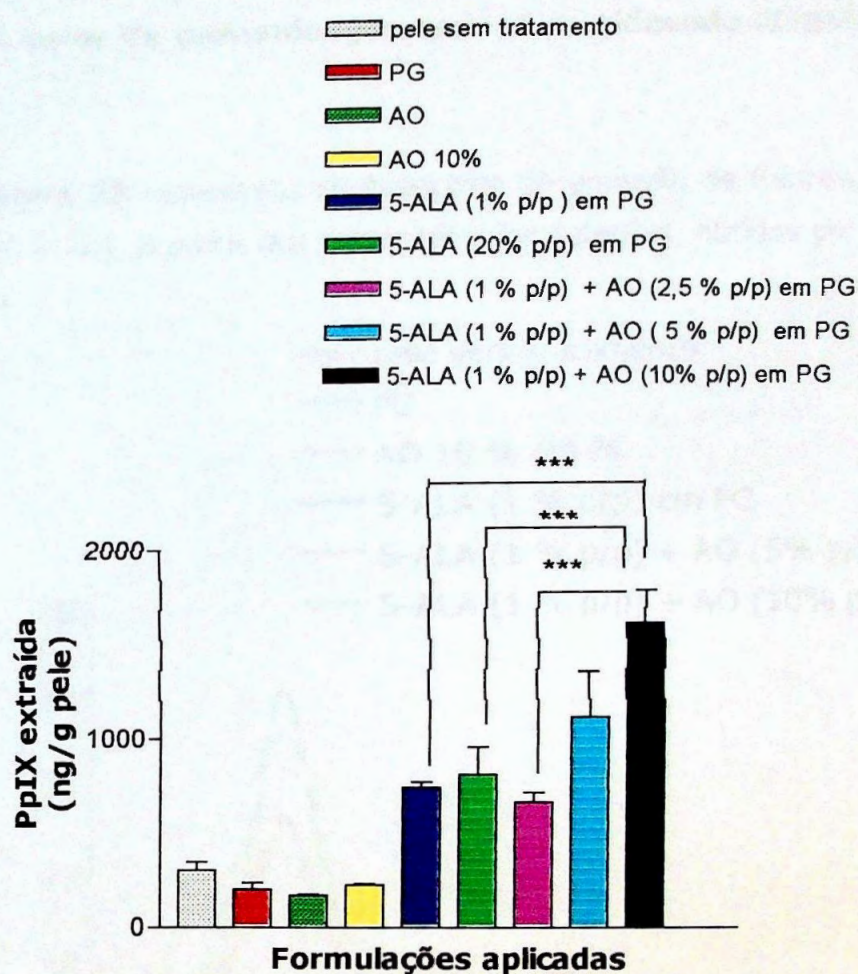


FIGURA 29: PpIX extraída das peles de camundongo sem pêlo após 4 horas de aplicação tópica *in vivo* das formulações contendo 5-ALA e AO (2,5%, 5% e 10%) em PG. Controles: camundongo não tratado; camundongo tratado somente com PG, camundongo tratado somente com AO 10 % em PG, camundongo tratado somente com 5- ALA (1%) em PG ou 5-ALA 20% em PG. Valores expressos em erro médio padrão, n=4 para cada grupo. Diferenças consideradas significativas para $P < 0.05$. Análise estatística: One Way ANOVA (Teste de múltiplas comparações de Tukey).

5.6. Determinação *in vivo* da PpIX induzida por 5-ALA a partir da formulação contendo 5-ALA (1%) + ácido oléico (AO) a 5% e 10% (p/p) em PG em peles de camundongos sem pêlo utilizando dispositivo de fibra óptica

A Figura 30 representa os espectros de emissão de fluorescência da PpIX induzida por 5-ALA, a partir dos controles e formulações, obtidos por dispositivo de fibra óptica.

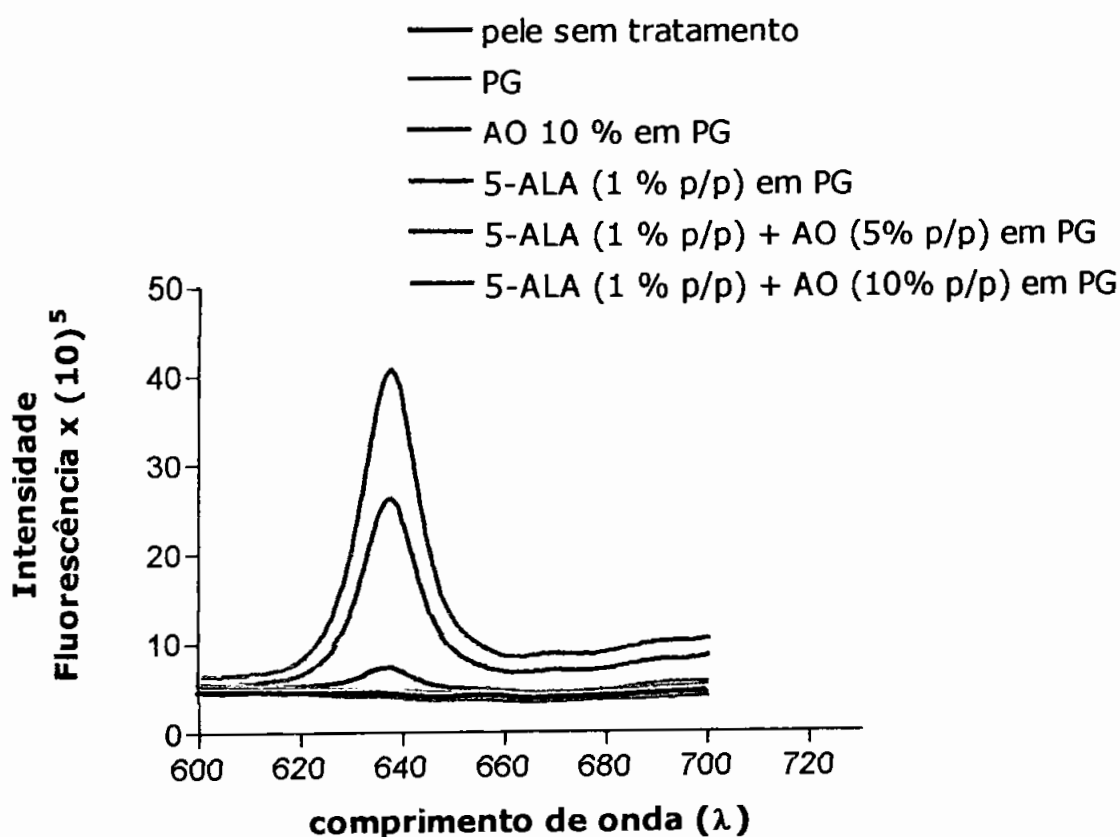


FIGURA 30: Espectros de emissão de fluorescência da PpIX induzida por 5-ALA a partir dos **controles** (peles sem tratamento, peles tratadas somente com PG, peles tratadas somente com AO 10% em PG e peles tratadas somente com 5-ALA 1% em PG) e **formulações** (5-ALA 1% + AO 5% ou AO 10% em PG) aplicadas em peles sadias de camundongos sem pêlo. Especificações: λ excitação/emissão= 400/637,5 nm; fenda: 5,0/5,0 nm, a 25°C. **Pico de emissão de fluorescência: 637,5 nm.** Os espectros plotados correspondem aquele mais representativo para o valor da intensidade de fluorescência média ($n=3$) para cada grupo.

A **Tabela 13** mostra os valores de intensidade de fluorescência da PpIX *in vivo*, (λ máximo de emissão= 637,5 nm) medidas por dispositivo de fibra óptica, a partir dos controles e formulações, relativos a **Figura 30**.

TABELA 13: Valores de intensidade de fluorescência da PpIX *in vivo* medidos por dispositivo de fibra óptica, após aplicação dos controles e formulações.

Controles	Intensidade de Fluorescência $\times 10^5$ a 637,5 nm
Camundongo não tratado	3,918 ($\pm 0,606$)
PG	4,534 ($\pm 0,369$)
AO 10% em PG	3,535 ($\pm 0,491$)
5-ALA 1% (p/p) em PG	6,857 ($\pm 0,756$)
Formulações	Intensidade de Fluorescência $\times 10^5$ a 637,5 nm
5-ALA 1% + AO 5%	24,328 ($\pm 6,765$)
5-ALA 1% + AO 10%	38,789 ($\pm 5,824$)

Os valores entre parênteses representam os desvios padrão de quatro determinações.

A **Figura 31** representa os dados da **Tabela 13** plotados com as replicatas ($n=4$) dos valores obtidos das leituras de intensidade de fluorescência da PpIX *in vivo* medidas por dispositivo de fibra óptica.

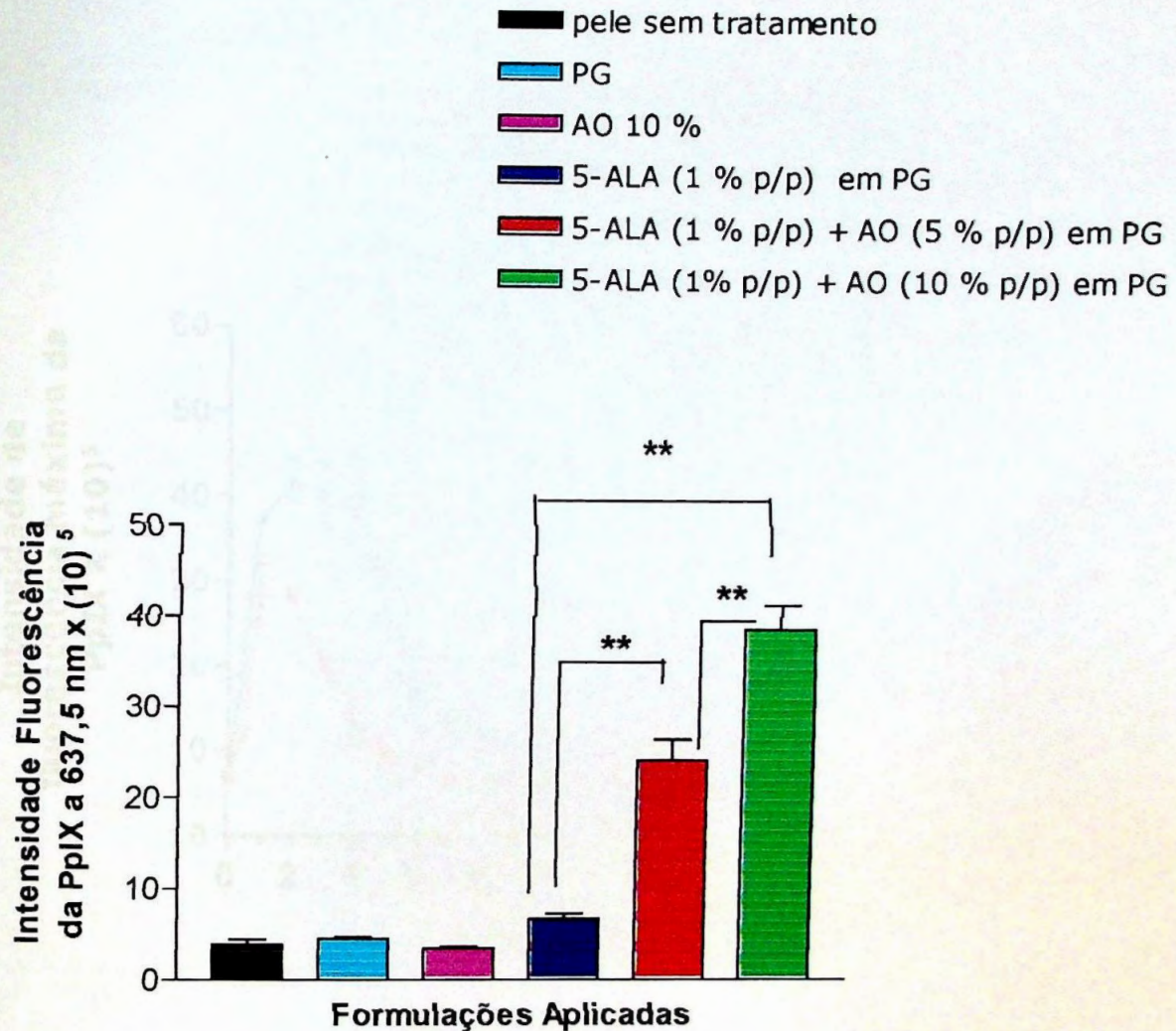


FIGURA 31: Valores de intensidade de fluorescência *in vivo* da PpIX induzida por 5-ALA a partir dos **controles** (pele sem tratamento, pele tratada com PG, pele tratada com AO 10% em PG, pele tratada com 5-ALA 1% em PG) e **formulações** (5-ALA 1% + AO 5% em PG e 5-ALA 1% + AO 10% em PG) utilizando dispositivo de fibra óptica. Valores expressos em erro médio padrão (n=4) para cada grupo. Diferenças consideradas significativas para $P < 0,05$). Análise estatística: One-way ANOVA (Teste de múltiplas comparações de Tukey).

5.7. Estudo da cinética de acúmulo e degradação da PpIX *in vivo*, após a aplicação das formulações contendo 5-ALA 1% (p/p)+ AO 10% (p/p) em PG.

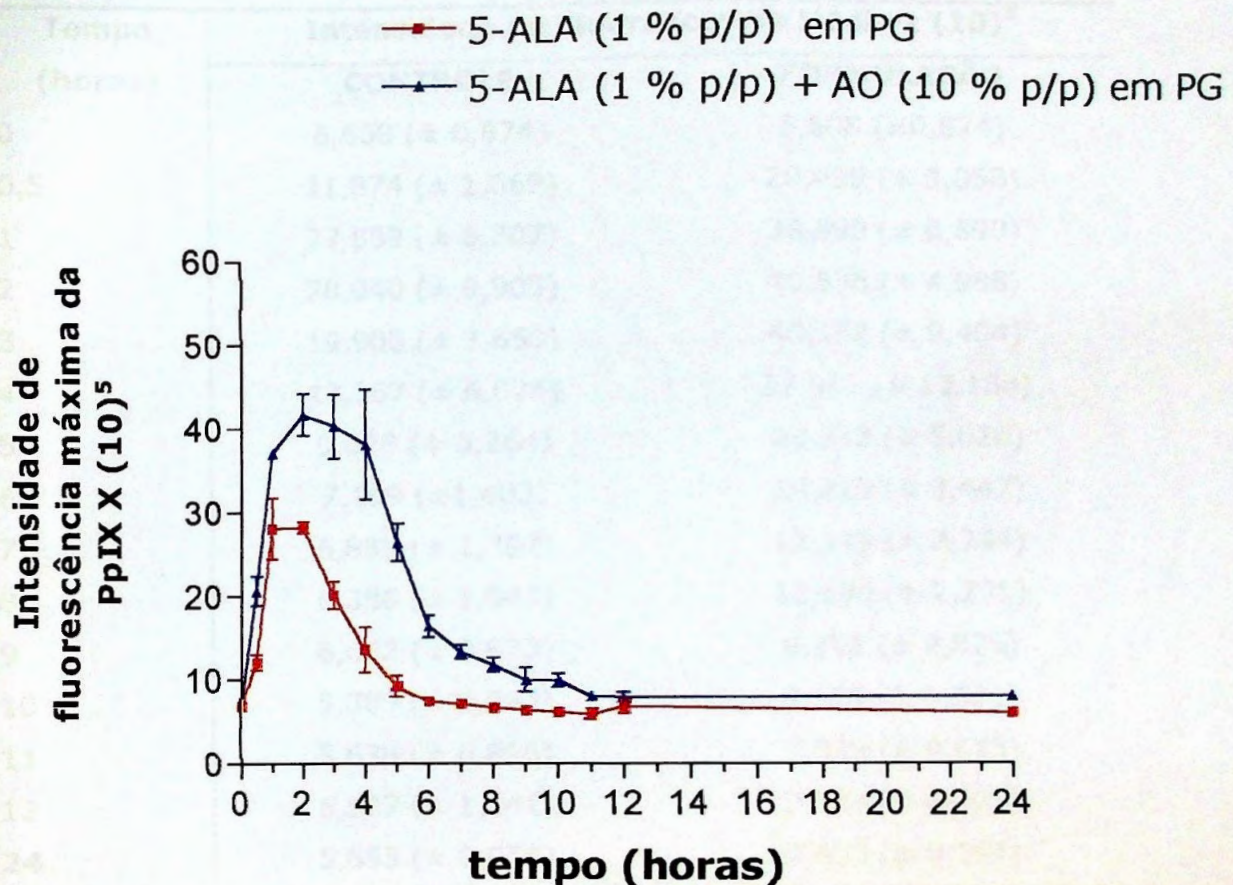


FIGURA 32: Valores de intensidade de fluorescência *in vivo* da PpIX induzida por 5-ALA a partir do **controle** (pele tratada com 5-ALA 1% em PG) e **formulação** (5-ALA 1% + AO 10% em PG) utilizando dispositivo de fibra óptica. Valores medidos a partir de 30 minutos até 24 horas após a aplicação das formulações controle e teste. Valores expressos em erro médio padrão (n=7) para cada grupo. Diferenças significativas entre o controle e a formulação no intervalo de tempo de 30 minutos a 8 horas após aplicação. (Valores de $P < 0,05$). Análise estatística: T Test.

Tabela 14: Valores de intensidade de fluorescência da PpIX *in vivo* medidos por dispositivo de fibra óptica, de 30 minutos a 24 horas após aplicação do controle e formulação.

Tempo (horas)	Intensidade de Fluorescência Média x (10) ⁵	
	CONTROLE	FORMULAÇÃO
0	6,608 (± 0,874)	6,608 (±0,874)
0,5	11,874 (± 1,669)	20,439 (± 3,050)
1	27,889 (± 6,307)	36,890 (± 0,890)
2	28,040 (± 0,905)	41,536 (± 4,988)
3	19,900 (± 3,650)	40,152 (± 9,404)
4	13,367 (± 6,024)	37,957 (± 13,188)
5	9,028 (± 3,264)	26,232 (± 5,026)
6	7,199 (±1,403)	16,219 (± 3,447)
7	6,889 (± 1,387)	13,145 (± 2,244)
8	6,386 (± 1,043)	11,599 (± 2,275)
9	6,062 (± 0,873)	9,798 (± 2,826)
10	5,889 (± 0,943)	9,725 (± 1,521)
11	5,638 (± 0,896)	7,829 (± 0,673)
12	6,577 (± 1,141)	7,673 (± 0,823)
24	5,655 (± 0,954)	7,692 (± 0,751)

Os valores entre parênteses representam os desvios padrão de sete determinações.

Tabela 15: Valores das áreas abaixo das curvas de cinética da PpIX *in vivo* medidos por dispositivo de fibra óptica, de 30 minutos a 24 horas após aplicação do controle e formulação.

Área abaixo da curva	
Controle (5-ALA 1% em PG)	188,53 (\pm 14,17)
Formulação (5-ALA 1% + ao 10% em PG)	347,46 (\pm 19,62)

Valores expressos em erro médio padrão (n=7) para cada grupo. Diferenças significativas entre o controle e a formulação (valores de $P \leq 0,0001$). Análise estatística: T Test

6. DISCUSSÃO

Primeiramente, a padronização da metodologia analítica para quantificação de 5-ALA e derivados foi realizada por espectrofluorimetria. Para que se utilizasse a fluorimetria como método de quantificação, foi necessária a conversão do fármaco em um composto fluorescente, através de reação de derivação com acetilacetona e formaldeído, podendo então ser analisado diretamente por fluorimetria. O derivado fluorescente de 5-ALA formado pela mistura do reagente de acetilacetona, formaldeído e acetilacetona foi identificado por KAJIWARA et al. (1993) como sendo **2,6-diacetil-1,5-dimetil-7-(2-carboxetil)-3H-pirrolizina**. Na **Figura 33** está apresentada a formação do derivado fluorescente de 5-ALA e sua estrutura.

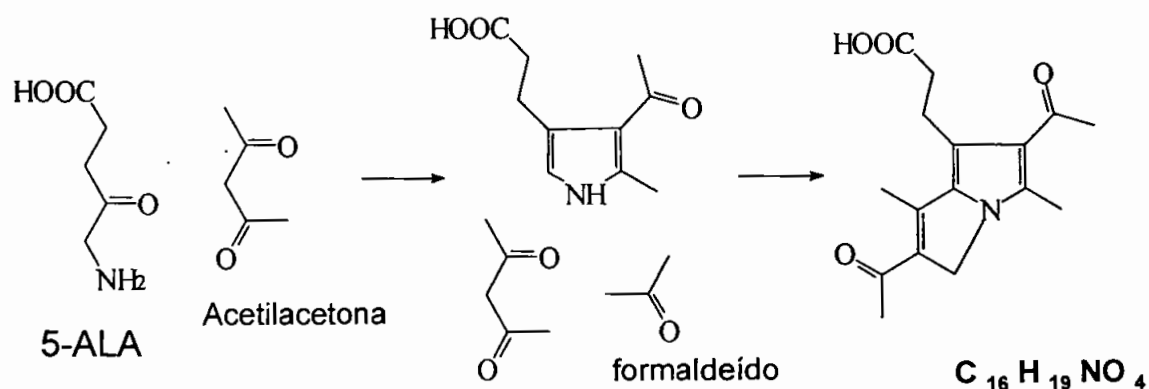


FIGURA 33: Formação do derivado fluorescente de 5-ALA pela reação de mesmo com acetilacetona e formaldeído (KAJIWARA et.al, 1993; OISHI et al., 1996).

Os ésteres hexil e octil foram submetidos à mesma reação de derivação feita para o 5-ALA, e seus espectros de excitação e emissão de fluorescência determinados em espectrofluorímetro. Os derivados fluorescentes de 5-ALA e seus ésteres apresentaram espectros de excitação muito semelhantes com λ excitação máximo = **378 nm** (dados não mostrados). Os espectros de emissão do 5-ALA e dos derivados ALA n-hexil e ALA n-octil éster são mostrados nas

Figuras 10 e 12, respectivamente. Estes espectros foram muito semelhantes e todos apresentaram λ emissão máximo igual a **464 nm**.

Porém, a sensibilidade do método é diferente para o 5-ALA e os ésteres, observado pela intensidade de fluorescência emitida pelo derivado fluorescente de cada fármaco, na mesma concentração. Ou seja, uma menor quantidade do derivado fluorescente é formada na reação de derivação com os ésteres, provavelmente devido a um efeito de impedimento estérico na molécula, causado pela cadeia alquílica mais longa. Acredita-se que o derivado fluorescente dos ésteres apresente a mesma estrutura molecular resultante da reação apresentada na **Figura 33**, porém com o grupo carboxílico substituído pela cadeia alquílica de cada éster. Uma outra hipótese para a menor intensidade de fluorescência dos ésteres seria a hidrólise da cadeia alquílica do éster durante a reação de derivação, mas esta deve ser mínima, já que os ésteres parecem apresentar uma estrutura estável (DE ROSA 2002).

Nas **Figuras de 11, 13 e 14** são apresentadas as curvas analíticas do 5-ALA e dos ésteres, as quais apresentam linearidade na faixa de concentração de 5 a 100 $\mu\text{g/mL}$. **A Tabela 2 e a Tabela 5** mostram os valores de intensidade de fluorescência e desvios padrão para as leituras dos derivados fluorescentes de 5-ALA e seus ésteres, respectivamente, determinados por espectrofluorimetria.

Foram realizados estudos intra-ensaio e inter-ensaio para a determinação da precisão e exatidão (% CV e % E) para o *fármaco 5-ALA*. As **Tabelas 3 e 4** mostram % CV e % E para o 5-ALA (intra-ensaio e inter-ensaio respectivamente) menores que 10%, portanto dentro dos limites aceitáveis. A literatura indica que a % CV e %E aceitáveis em torno de $\pm 15\%$ (CAUSON, 1997).

Esta metodologia de quantificação do 5-ALA e derivados utilizando leitura em espectrofluorímetro precedido por reação de derivação mostrou-se adequada para a quantificação em nossos estudos, e além disso, é um método bastante rápido, sensível e simples.

Os fármacos que apresentam excessiva hidroflicidade ou lipoflicidade não levam a um transporte passivo ótimo através da pele e outras barreiras biológicas. A esterificação do 5-ALA tem como objetivo aumentar suas propriedades lipoflicas, o que torna imprescindível a caracterização físico-química do 5-ALA e de seus ésteres. A lipoflicidade é um dos parâmetros chave

o qual define a biodisponibilidade de fármacos topicamente aplicados. Neste estudo, o coeficiente de partilha do 5-ALA e de seus derivados esterificados foram determinados como uma medida relacionada a esta propriedade.

A determinação dos diferentes coeficientes de partilha (K) do 5-ALA e seus derivados é, portanto, uma medida importante para a verificação do comportamento destes em diferentes meios, em relação à pele ou ao EC. Os estudos dos coeficientes de partilha do 5-ALA e de seus derivados esterificados constituíram, portanto, uma caracterização importante para a avaliação: (i) do grau de lipofilicidade (representado pelo $K_{O/A}$) (ii) do grau de afinidade destes na pele ($K_{P/A}$) e do grau de afinidade dos mesmos no EC ($K_{EC/A}$).

Os valores obtidos para o K de 5-ALA e seus ésteres estão apresentados na **Tabela 6** e **Figura 15**. Os valores de $K_{O/A}$ foram aproximadamente 3 vezes maior para o ALA n-hexil e 5,8 vezes maior para o ALA n-octil éster em relação ao 5-ALA, mostrando que existe uma relação entre o aumento da cadeia carbônica na molécula de 5-ALA, com o aumento na lipofilicidade do fármaco. Recentemente, os $K_{O/A}$ de 5-ALA e derivados esterificados foram determinados (UHELINGHER et al., 2000) mostrando este efeito, ou seja, um aumento no $K_{O/A}$ maior que quatro vezes entre o 5-ALA e o ALA n-octil éster.

Também foi determinado o coeficiente de partilha pele/água ($K_{P/A}$) para o 5-ALA e os derivados ésteres estudados. Para o ALA n-hexil éster, este valor representou uma partilha do fármaco em solução aquosa para a pele aproximadamente 8,5 vezes maior comparado ao 5-ALA. Para o derivado ALA n-octil éster, este valor foi 25,8 vezes maior em relação ao 5-ALA. Isto significa que quanto maior a lipofilicidade do fármaco (verificada pelos valores crescentes de $K_{O/A}$) maior a sua partilha para a pele e, portanto, maior afinidade com esta, a qual é constituída de ácidos graxos, ceramidas, colesterol (principalmente no estrato córneo), água, etc.

Sendo o EC uma barreira e o fator limitante na penetração de fármacos, a determinação do coeficiente de partilha no EC em relação à solução aquosa, ($K_{EC/A}$) foi verificado para o 5-ALA e seus ésteres. O 5-ALA partilhou ou se manteve somente no meio aquoso (baixo $K_{EC/A}$). Como esperado, isto é devido à alta hidrofiliabilidade da molécula de 5-ALA e à característica altamente lipofílica do EC. Tanto o ALA n-hexil como o ALA n-octil éster partilharam menos para o meio

aquoso e conseqüentemente mais para o EC (~ 18 vezes para ambos) comparado ao 5-ALA. A aumentada lipofilicidade dos derivados ésteres, fornecida pelas cadeias alquílicas, melhorou significativamente sua afinidade para o EC.

Devido ao fato do 5-ALA não penetrar na pele intacta e sadia, mas sim na tumoral o qual apresenta tecido anormal, torna a TFD-ALA tópica um método seletivo (KENNEDY & POTTIER, 1992). Porém, a penetração no tecido cancerígeno ainda deve ser aumentada para que se atinja concentrações adequadas de PpIX, pois mesmo o tecido anormal apresenta-se como uma "barreira" à penetração do 5-ALA. Para contornar esta limitação, é necessário o desenvolvimento de veículos, sistemas de liberação (DE ROSA & BENTLEY, 2000; PIERRE et al., 2001) e métodos físicos como iontoforese (LOPEZ et al., 2001; 2003_{a,b}) que otimizem a sua liberação na pele.

A lamela lipídica do EC consiste predominantemente de ceramidas (50%), colesterol (25%), ácidos graxos livres (10 a 15%); e sulfato de colesterila (5%), sendo porém *destituída de fosfolipídeos*, os quais são componentes formadores de bicamadas em todas as outras membranas celulares e intracelulares (DOWNING et al., 1993a). Os lipídeos do EC são originados de precursores polares lipídicos (fosfolipídeos e glicoesfingolipídeos), fornecidos pelas células do estrato granuloso (FARTASH, 1996). As ceramidas constituem a maior parte dos lipídeos do EC e compreende um grupo estruturalmente heterogêneo.

GRAY & YARDLEY (1975) sugeriram que os lipídeos tais como ceramidas e colesterol, participam da formação de bicamadas no EC, proporcionando uma seletividade na permeação transcutânea de substâncias hidro e lipossolúveis. Desse modo, a similaridade da composição do sistema de liberação de fármacos com o principal lipídeo do EC, a ceramida, poderia determinar uma maior interação entre a formulação e a pele, e conseqüentemente, uma maior acúmulo/retenção do fármaco no tecido.

Os métodos experimentais *in vitro* para medidas de permeação de fármacos através da pele são necessários para avaliar a passagem e/ou retenção da droga através/ou da pele, quando destinadas à aplicação tópica.

Assim, primeiramente foi realizado um estudo do perfil de permeação cutânea *in vitro* da mistura de **5-ALA + ceramida** em PG (**Figura 16**) utilizando-se pele de porco, e foi obtida uma *menor* permeação de 5-ALA, quando este se apresentava na forma de mistura com a ceramida, comparado ao controle (solução de 5-ALA em PG). Os estudos *in vitro* de retenção no EC e [epiderme + derme] após 16 horas de experimento (**Figura 17**) mostraram que não houve diferença significativa nas quantidades de 5-ALA retidas no EC e [epiderme + derme] para a formulação em questão, comparada ao controle, concluindo-se que as formulações contendo ceramida não se apresentaram vantajosas na otimização da liberação cutânea do 5-ALA. Nossos estudos anteriores (PIERRE et al., 2001) com lipossomos contendo ceramida mostraram um aumento na retenção cutânea do 5-ALA, sugerindo que a compatibilidade estrutural (bicamada lipídica) com a matriz lipídica do EC pode favorecer a interação da formulação com a pele.

O 5-ALA na forma esterificada é mais lipofílico e sua lipofilicidade deve melhorar a captação, profundidade de penetração e distribuição. Vários pesquisadores têm mostrado que a utilização de derivados de 5-ALA, aumenta a concentração de PpIX acima de duas ordens de magnitude, comparado ao fármaco original (GAULIER et al., 1997; LANGE et al., 1999). Desse modo, prosseguiu-se com os estudos, desta vez com a mistura de **ALA n-hexil éster + ceramida** ou **ALA n-octil éster + ceramida**, afim de complementar e comparar o perfil de permeação desta com os resultados obtidos com **5-ALA+ceramida**. A **Figura 18** mostra o perfil de permeação cutânea *in vitro* utilizando pele de porco, para a formulação **ALA n-hexil éster + ceramida (1:2) em PG** e controle (ALA hexil éster em PG). Pode-se verificar perfis de permeação cutânea semelhantes entre estes, porém, sem aumento da quantidade de fármaco permeado em função do tempo para a formulação, comparado ao controle. Ou seja, a ceramida não facilitou a permeação do ALA n-hexil éster através da pele animal. Na **Figura 19**, pode-se verificar que a retenção do referido fármaco no EC mostrou-se significativamente menor para a formulação em relação ao controle. Para a retenção na [epiderme + derme] não houve diferença significativa entre o controle e a formulação. Assim sendo, pode-

se concluir que a presença da ceramida não representa uma vantagem, uma vez que não promoveu aumento na retenção cutânea para o fármaco em questão.

A **Figura 20** mostra o perfil de permeação cutânea *in vitro* para a mistura **ALA n-octil éster +Ceramida** em PG (1:2) através de pele de porco por 16 horas. A diferença entre os perfis só foi significativa para o tempo de 16 horas ($P < 0,0001^{***}$) comparada o controle. Entretanto, a formulação contendo ceramida apresenta *menor* permeação comparado ao controle. As quantidades de ALA n-octil éster retidas no EC e na [epiderme + derme] após 16 horas de permeação *in vitro* são mostradas na **Figura 21**. Também neste caso, não houve diferença significativa nas quantidades de ALA n-octil éster retidas no EC. A retenção do fármaco na [epiderme+ derme] para o complexo **ALA n-octil éster + ceramida**, foi menor, comparada ao controle sem ceramida.

Uma causa provável para a diminuição da permeação dos fármacos **ALA n-hexil ou n- octil éster** nas misturas *com ceramida* pode ser a maior interação destes fármacos com a ceramida, já que esta é apolar, podendo, assim, retardar a difusão dos fármacos. Além disso, os derivados esterificados possuem alta lipofilicidade, o que dificulta, portanto, a liberação destes de uma formulação lipídica para a pele, refletindo também em uma menor *retenção* na pele.

Estudos de permeação e retenção cutâneas utilizando os derivados lipossolúveis de 5-ALA (ALA n-butil, n-hexil e n-octil éster) foram realizados anteriormente por nosso grupo de pesquisa, utilizando como veículo uma **emulsão O/A** (DE ROSA et al., 2003). Os derivados mais lipossolúveis (ALA n-hexil e ALA n-octil éster) apresentaram uma *permeação* menor através da pele, comparado ao 5-ALA, sendo que o ALA n-octil éster apresentou permeação mínima. A *retenção* na [epiderme + derme] foi maior para o ALA n-octil éster, no veículo utilizado, significando que neste caso, a absorção sistêmica reduzida representa uma vantagem, pois confina a indução de PpIX no sítio de aplicação, a pele. O veículo neste caso, constituído em sua maior parte por água, pode facilitar a liberação dos fármacos lipossolúveis da formulação, e desta para a pele, induzindo a um maior acúmulo destes no tecido. Assim sendo, para um fluxo otimizado dos ésteres de 5-ALA através do EC, é requerida uma

solubilidade lipídica balanceada *água/lipídeo* entre o EC, o veículo utilizado e o fármaco.

Dentre os vários procedimentos descritos na literatura com o propósito de otimizar a penetração cutânea de fármacos, o uso de promotores de penetração é uma proposta interessante. A literatura tem mostrado que os promotores de penetração podem alterar a composição e/ou organização dos lipídeos intercelulares do estrato córneo, diminuindo assim a função de barreira e proporcionando portanto, uma difusão adequada de fármacos através da pele (SANTUS & BAKER, 1993). Uma interessante classe de compostos, os ácidos graxos, tem sido utilizada como promotores de penetração na pele, não somente devido aos vários membros com diferentes graus de eficiência, mas também devido à presença destas substâncias como componentes naturais da pele e de outras membranas do corpo.

O ácido oléico (AO) apresenta três propriedades importantes: (i) o grupo cabeça carboxila; (ii) presença de 18 carbonos em cadeia reta e (iii) uma única dupla ligação. A presença de um grupo cabeça carboxila no AO fornece uma maior facilidade para este composto se misturar nas regiões lipídicas ou protéicas e, portanto, AO tem uma alta afinidade para lipídeos (KAMP & HAMILTON, 1992) e proteínas (albumina) (GOODMAN, 1958). O principal mecanismo de ação sugerido para o AO é a perturbação da função de barreira da pele, seja desordenando os domínios lipídicos intercelulares (MOSER et al., 2001) ou induzindo à separação de fases nos domínios lipídicos do EC (TOUITOU et al., 2002), resultando no aumento da permeabilidade para muitos fármacos.

O derivado ALA hexil éster foi escolhido para os estudos de permeação cutânea *in vitro* por meio de uma formulação contendo 1% deste derivado e AO a 5% em propilenoglicol (item 4.2.4.1.2 e **Figura 22**). Na TFD tópica, formulações contendo o fármaco são aplicadas no tecido tumoral e após um período que varia de 2 a 12 horas, estes tecidos são irradiados. Portanto, é importante que se verifique o perfil de permeação *in vitro* na pele no período de até 12 horas, tempo de exposição muitas vezes descrito como ideal na literatura (SZEIMIES et al., 1994). Na **Figura 22** pode-se observar que a quantidade de **ALA n-hexil éster** permeado ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$) a partir da formulação contendo AO foi

menor comparada à formulação controle, ou seja, houve uma diminuição significativa na permeação do ALA n-hexil éster após 12 horas de permeação *in vitro*. Este resultado pode estar relacionado ao fato da lipofilicidade do ALA n-hexil éster, pois a perturbação e o efeito promotor do AO está ligado em particular aos lipídeos presentes no EC. A literatura mostra que quanto maior a lipofilicidade dos fármacos, **menor** é o aumento da permeação na pele causada pelo AO. Compostos lipofílicos (coeficiente de partilha octanol/água > 0) já apresentam um alto coeficiente de permeabilidade, sem o promotor. Então, a taxa de aumento na permeação para tais compostos não deve atingir um valor alto, pois há um certo limite para a permeabilidade na pele (TANOJO, 1996). A **Figura 23** mostra a retenção do ALA hexil éster no EC e na [epiderme+derme] após 12 horas de permeação *in vitro*. Não houve diferença significativa nas quantidades de ALA hexil éster retidas no EC para a mistura de contendo AO 5% comparada ao controle. Em relação à quantidade de ALA hexil éster retida na [epiderme+derme], a formulação estudada apresentou retenção significativamente *menor* comparada ao controle ($P < 0,0001$ ***), ou seja, não há nenhuma vantagem em sua utilização para a otimização da TFD- 5-ALA tópica.

Ao contrário, o AO tem mostrado ser mais eficiente para compostos hidrossolúveis do que para compostos lipossolúveis. Ou seja, para fármacos muito hidrofílicos (coeficiente de partilha octanol/água < 0) um maior efeito promotor pode ser observado. O 5-ALA sendo um composto altamente hidrofílico e polar poderá ter sua permeabilidade cutânea aumentada pelo AO, já que este último se destaca como promotor de absorção ideal para compostos hidrofílicos. Este efeito foi observado em nossos estudos de permeação cutânea *in vitro* por 12 horas com as formulações **de 5-ALA 1% contendo AO em diferentes concentrações (2,5%, 5% e 10%)** em PG (**Figura 24**). Pode-se observar perfis de permeação com inclinações diferentes à medida que a concentração de AO aumenta de 2,5% para 10%.

Este estudo mostrou que a quantidade de 5-ALA permeada ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$) através da pele de porco após 12 horas, foi significativamente maior tanto para a formulação contendo 5% ($P < 0,01$ **) ou 10% de AO ($P < 0,001$ ***) comparados ao controle (solução de 5-ALA 1% em PG). Entretanto, não houve

diferença significativa entre as formulações contendo 5% de AO e 10% de AO ($P > 0,05$).

O fluxo J , ou a velocidade de difusão através da membrana em função do tempo é representado pela inclinação da porção linear da curva de permeação do fármaco em estudo. Os resultados apresentados na **Tabela 7** mostram que com o aumento da concentração de AO, há um aumento do J . Este aumento é significativo ($P < 0,001^{**}$) somente para a formulação contendo 10% de AO (p/p) em relação ao controle, mostrando assim que a presença de AO aumentou a permeação do 5-ALA na pele de porco, em torno de 2,4 vezes, comparado ao controle. O fluxo J não foi considerado significativamente diferente para as formulações contendo AO 2,5% e AO 5% comparados ao controle. A análise estatística destes dados mostrou também que a diferença nos valores de fluxo J foi significativa entre as formulações de 5-ALA contendo 2,5% AO ($P < 0,001^{**}$) e 5% AO ($P < 0,01^*$) comparadas com a formulação contendo 10% de AO. Ainda na **Tabela 7**, pode-se observar uma correlação linear (r) com a relação da quantidade de 5-ALA permeado ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$) em função do tempo, caracterizando um modelo difusional.

Como descrito na literatura, a penetração limitada do 5-ALA nos tecidos no tratamento de carcinoma de células escamosas e carcinoma basocelular nodular tem como consequência a produção de PpIX em quantidade e profundidade inadequadas para a eficiência de TFD tópica (PENG et al., 1997a). Então, os estudos de retenção cutânea foram realizados para caracterizar melhor a retenção e a localização do fármaco nas principais camadas da pele, ou seja, o EC (representando a barreira à difusão de fármacos) e no conjunto [epiderme + derme].

A retenção de 5-ALA no **EC (Figura 25 e Tabela 8)** foi significativamente menor para a formulação com AO a 2,5% e 5% ($P < 0,001^{**}$) comparada ao controle. Porém a quantidade de 5-ALA retida na pele [**epiderme + derme**] foi aumentada em aproximadamente 2 vezes para a formulação contendo 5% ou 10% de AO, comparados aos valores da formulação controle. Isto indica que a presença de AO a 5% e 10% facilita a penetração do 5-ALA na pele, aumentando quantitativamente sua presença no tecido, bem como sua liberação nas camadas mais profundas [epiderme + derme]. Não houve diferença significativa na

quantidade de 5-ALA retido na [epiderme + derme] para a formulação contendo 2,5% de AO comparado ao controle.

O comportamento de menor retenção do 5-ALA no EC para a formulação contendo 5% de AO e a maior retenção na [epiderme + derme] para as formulações contendo 5% e 10% de AO pode ser explicado pelo efeito promotor do AO. Sendo um perturbador de barreira, o AO pode interagir facilmente com os lipídeos intercelulares do EC, facilitando a transposição desta barreira pelo 5-ALA, como observado na [epiderme + derme]. Devido ao fato da molécula do 5-ALA ser hidrofílica e ter coeficiente de partilha O/A pequeno (DE ROSA et al., 2003), sua partilha para as regiões aquosas da pele [epiderme viável e derme] é facilitada.

A produção e/ ou acúmulo bem como a distribuição cutânea de fotossensibilizadores exógenos ou daqueles produzidos endogenamente (principalmente a PpIX) têm sido investigadas para avaliar a potencialidade de fármacos como também de formulações a serem aplicadas na TFD. Uma insuficiente penetração no tecido ou liberação do fotossensibilizador na pele, assim como, uma distribuição de PpIX favoráveis são fatores que estão envolvidos na eficácia da TFD, já que o sucesso desta terapia depende da concentração de PpIX no tecido alvo (GERSCHER et al., 2001). A **avaliação quantitativa da PpIX** é importante para avaliar sua concentração e distribuição no tecido e, assim, possibilitar a modulação dos parâmetros de otimização da formulação aplicada.

Na **Figura 26** está representado o espectro de emissão de fluorescência da solução de PpIX na concentração de 100 ng/mL, apresentando o λ de emissão máximo em **632 nm**, utilizado para as leituras em espectrofluorímetro.

Na **Tabela 09** estão representados os parâmetros analíticos obtidos para a elaboração da curva analítica da PpIX. A **Figura 28** mostra a curva de calibração da PpIX em metanol/água (9:1) a qual apresentou linearidade na faixa de concentração de 0,5 a 40 ng/mL (item 4.2.4.1). Os espectros de emissão de fluorescência da PpIX referentes aos pontos da curva analítica e suas duplicatas estão representados na **Figura 27**.

As formulações contendo a associação de 5-ALA e AO em PG foram *testadas in vivo* quanto ao acúmulo de PpIX nos tecidos, utilizando camundongos sem pêlo e aplicadas durante 4 horas na pele sadia destes animais. As áreas tratadas foram removidas e submetidas à **extração quantitativa de PpIX**. Os *controles* utilizados neste estudo foram necessários para a avaliação da interferência dos compostos utilizados na formulação sobre a formação *in vivo* de PpIX.

Existem vários métodos descritos na literatura para a extração da PpIX (KESSEL & CHOU, 1983; HERMANN et al., 1997; LILGE et al., 1997; RICK et al., 1997; WEBBER et al., 1997b), os quais utilizam técnicas complexas. O método utilizado neste trabalho foi baseado em DE ROSA et al. (2000), os quais utilizaram duas extrações sucessivas com a mistura de solventes metanol/água (9:1) de modo a garantir a remoção total da PpIX dos tecidos. Pelos resultados obtidos, o método é adequado para a extração da PpIX.

Para a padronização da metodologia analítica da PpIX por análise espectrofluorimétrica direta, foram realizados estudos intra-ensaio e inter-ensaio para a determinação da precisão e exatidão. As **Tabelas 10 e 11** mostram que os respectivos valores para a PpIX estão dentro dos limites aceitáveis (menores que 15%) (CAUSON, 1997).

A **Tabela 12** e a **Figura 29** resumam os resultados do estudo de quantificação da PpIX *in vitro*, após a aplicação dos controles ou formulações de 5-ALA contendo AO a 2,5%, 5% ou 10% em peles sadias de camundongos sem pêlo. Podemos observar aumentos significativos da concentração de PpIX acumulada após a aplicação das formulações contendo a associação de 5-ALA + 5% de AO ou 5-ALA + 10% AO em PG, obtendo-se nestes casos, uma maior quantidade de PpIX acumulada na pele (ng/g pele) em relação ao controle (1% de 5-ALA em PG). Estes resultados indicaram que a associação de 1% 5-ALA + 5% AO bem como 1% 5-ALA + 10% AO aumentaram em aproximadamente 2 vezes a produção e o acúmulo de PpIX *in vivo* em peles sadias de camundongos sem pêlo. Também foi verificado que há diferença significativa entre as formulações de 5-ALA contendo 2,5% e 10% de AO. Não houve diferença significativa entre as formulações de 5-ALA contendo 5% e 10% de AO. Pode-se

notar também que a concentração de PpIX na pele de camundongos sem pêlo sem nenhum tratamento foi bem menor comparada às formulações contendo 5-ALA e além disso, nenhum dos controles sem o fármaco proporcionaram acúmulo de PpIX maior comparado a pele sem tratamento. Também pode-se observar que a formulação utilizada atualmente na prática clínica, a qual contém **20% de 5-ALA (p/p)** em PG apresentou quantidade não significativamente diferente de PpIX induzida a partir da formulação controle, **1% 5-ALA (p/p)** em PG. Portanto, comparando com a formulação contendo **20% ALA**, este estudo mostrou a vantagem e potencialidade da associação de AO nas formulações propostas, as quais contém menor concentração de 5-ALA (**1% p/p**) em PG.

Do mesmo modo, pelos resultados *in vitro* apresentados, verificou-se que as formulações contendo **AO** como promotor de penetração cutânea foram mais efetivas na liberação cutânea do 5-ALA, comparadas às misturas de **ceramida + 5-ALA ou seus derivados esterificados** estudadas.

A avaliação direta da PpIX formada na pele animal também foi determinada através de espectroscopia de fluorescência, acoplada a um dispositivo de fibra óptica, o qual é um método *in vivo* eficiente não invasivo (POTTIER et al., 1986, JOHANSSON et al., 1997).

Desse modo, procedeu-se a avaliação referida, utilizando-se as formulações de 5-ALA (1% p/p) + AO (5% e 10% p/p). Após a aplicação tópica de 5-ALA a partir dos **controles** (pele sem tratamento, peles tratadas somente com PG, peles tratadas com AO 10% em PG, peles tratadas com 5-ALA a 1% em PG) e **formulações** contendo 1% 5-ALA + AO 5% ou 10% (**item 4.2.6.1**), os animais foram mantidos ao abrigo da luz durante 4 horas. Após este tempo, procedeu-se a determinação *in vivo* da fluorescência da PpIX induzida por 5-ALA nos animais. A fluorescência medida da PpIX na pele está correlacionada com a concentração de PpIX na pele (POTTIER et al., 1986).

Espectros típicos de emissão de fluorescência da PpIX foram observados nas peles de camundongos sem pêlo após a aplicação tópica de 5-ALA em formulações contendo AO 5 e 10%. A fluorescência da PpIX induzida por 5-ALA apresentou *pico máximo* de emissão de fluorescência a 637,5 nm após a aplicação da formulação contendo a maior porcentagem de AO estudada (5-ALA + AO 10% p/p) (**Figura 30**).

A **Tabela 13** mostra a média destes valores de intensidade de fluorescência medidos *in vivo* por dispositivo de fibra óptica, diretamente na pele dos animais. Verifica-se que as formulações contendo 5-ALA (1%) + AO 5 % ou 10% apresentam intensidades de fluorescência em torno de 3,5 e 5,6 vezes maiores, respectivamente, comparadas ao controle, 1% 5-ALA em PG.

Os resultados deste estudo foram expressos em *valores médios de intensidade de fluorescência in vivo*, medidas por fibra óptica, correspondente a cada formulação aplicada e plotados em um gráfico de barras (**Figura 31**). Esta maneira de expressar o acúmulo de PpIX por metodologia *in vivo* não invasiva está condizente com trabalhos científicos desta área (VAN DEN AKKER et al., 2000; VAN DEN AKKER et al., 2002; ROBINSON et al., 2000; GERSCHER et al., 2001; JUZENIENE et al., 2002a, 2002b; JUZENAS et al., 2002)

A análise estatística dos dados mostra que não há diferença significativa entre as peles sem tratamento comparadas as peles tratadas com PG, peles tratadas com AO 10% ou peles tratadas com ALA 1% em PG. Porém, há diferenças significativas entre o controle 5-ALA 1% em PG comparado às formulações 5-ALA 1% + AO 5% ou AO 10% ($P < 0,001^{**}$).

Entre as *formulações de 5-ALA na presença de AO*, também houve diferença significativa, sendo que a aplicação de formulação contendo AO a 10% produziu intensidade de fluorescência significativamente maior ($P < 0,001^{**}$) que aquela produzida por formulação contendo AO 5% .

De um modo geral, pode-se dizer que as formulações contendo AO 5% e 10% (diferenças não significativas) foram efetivas para a otimização da penetração/permeação *in vitro* do 5-ALA na pele, (**Figura 24**) estando estes resultados em concordância com os estudos *in vivo* de acúmulo de PpIX determinado por extração (**Figura 29**) ou por fibra óptica (**Figura 30 e Figura 31**) nas peles sadias de animais. Ou seja, uma maior permeação cutânea do fármaco foi alcançada na presença de AO 5% ou 10%, provavelmente devido ao efeito promotor do AO, facilitando o transporte de 5-ALA através do EC, e conseqüentemente, um maior acúmulo de PpIX no sítio de ação desejado [epiderme+ derme]. Esse maior acúmulo de PpIX pôde ser evidenciado tanto por **determinação quantitativa** do fotossensibilizante pela técnica de **extração com solventes**, como por **avaliação qualitativa**, através da técnica de leitura

direta com **fibra óptica**. Este comportamento é uma condição imprescindível para o sucesso da TFD-5ALA tópica, uma vez que esta é dependente da presença de PpIX no tecido alvo.

A técnica de determinação *in vivo* da fluorescência por fibra óptica pode ser considerada mais vantajosa que a extração do fotossensibilizador por solvente orgânico da área excidada de pele, onde ocorreu a aplicação da formulação, por ser um método rápido, sensível, não invasivo e aplicável a estudos com humanos. Além disto, estudos cinéticos do fotossensibilizador no tecido alvo são viáveis com esta metodologia.

A **cinética de acúmulo/degradação da PpIX** foi verificada afim de monitorar o tempo necessário para a produção deste fotossensibilizador endógeno no tecido animal, bem como avaliar a permanência da fluorescência deste na pele. Este estudo foi realizado e avaliado através de medidas *in vivo* de intensidade de fluorescência (I.F) na pele animal, usando dispositivo de fibra óptica, em intervalos de tempo pré-determinados (de 30 minutos até 24 horas) após o início da aplicação do controle e da formulação. Os comprimentos de onda de excitação/ emissão utilizados foram = 400 nm/637,5 nm, os quais correspondem ao máximo do espectro de emissão da PpIX determinados na pele animal.

JUZENAS et al. (2002) investigaram o acúmulo de PpIX *in vivo*, em pele normal bem como em tumores cutâneos induzidos por UV em camundongos sem pêlo. Após a aplicação tópica de cremes contendo 5-ALA e ALA metil éster em diferentes concentrações, a quantidade de PpIX nos tecidos foi determinada por medidas da fluorescência da PpIX *in vivo*, utilizando fibra óptica para as medidas. A maior razão de fluorescência da PpIX entre a pele tumoral e a pele normal foi observada após **3 horas de aplicação** de 5-ALA e seus ésteres, sugerindo que a exposição à luz laser deve ser realizada após este tempo afim de alcançar um efeito de TFD ótimo neste modelo tumoral.

Pelo estudo da cinética/degradação da PpIX, pode-se determinar os parâmetros para a avaliação da biodisponibilidade da PpIX no tecido animal. Estes parâmetros são (i) pico de máximo acúmulo observado após administração

tópica ($C_{\text{máx}}$) (ii) o tempo no qual ocorre o máximo acúmulo ($T_{\text{máx}}$) (iii) área abaixo da curva de tempo (horas) *versus* intensidade fluorescência da PpIX.

A **Figura 32** e a **Tabela 14** mostram os resultados obtidos no experimento, utilizando somente a *formulação de 5-ALA 1% + AO 10%*. Pela análise dos dados da **Tabela 14** pode-se dizer que antes da aplicação do controle e formulação (tempo= 0 hora) a I.F da PpIX na pele é mínima, correspondendo a I.F basal. À medida que aumenta o tempo após a aplicação, a I.F da PpIX atinge um pico máximo ($C_{\text{máx}}$) entre os tempos de **1 hora** (I.F igual a $27,889 \times 10^5$) e **2 horas** (I.F igual a $28,040 \times 10^5$) para o **controle** (diferença não significativa). Para a **formulação 5-ALA 1% + AO 10%**, o pico máximo de I.F atingido para a PpIX ($C_{\text{máx}} = 41,536 \times 10^5$) foi atingido no tempo de **2 horas**. A análise estatística utilizada mostrou que *não há diferença significativa* para as I.F no intervalo de tempo entre **1 a 4 horas**, neste caso.

O $T_{\text{máx}}$ reflete a velocidade de acúmulo da PpIX em determinada forma farmacêutica. É esta velocidade de acúmulo que determina o tempo necessário para que a $C_{\text{máx}}$ da PpIX seja atingida. Considerando somente os valores máximo de I.F da PpIX, pode-se verificar que o tempo de 2 horas foi o tempo necessário para atingir o máximo acúmulo de PpIX, tanto para o controle como para a formulação. Ou seja, praticamente a mesma **velocidade de acúmulo** para as formulações testadas, porém, com a formulação apresentando o maior acúmulo (maior $C_{\text{máx}}$) de PpIX. Além disso, pode-se verificar que a formulação utilizada manteve o acúmulo de PpIX na pele por mais tempo, comparada ao controle. Portanto, podemos sugerir que o melhor tempo para a aplicação da TFD utilizando a formulação deste estudo seria entre **1 a 4 horas** após a aplicação desta formulação.

Após os picos máximos de fluorescência tanto para o controle como para a formulação, a I.F da PpIX vai diminuindo gradativamente, até atingir um valor próximo a I.F basal das peles (24 horas após aplicação).

A análise estatística mostrou que a I.F da PpIX acumulada a partir da **formulação** foi significativamente **maior** (valores de $P < 0,05$) nos períodos de tempo de **30 minutos a 8 horas** após a aplicação, comparada ao controle. Ou seja, a presença de AO a 10% foi capaz de aumentar significativamente o acúmulo de PpIX na pele sadia de animais, a partir de 30 minutos, mantendo a

diferença significativa até 8 horas, comparado ao controle. Pode-se verificar que mesmo no tempo de 8 horas após aplicação da **formulação**, o acúmulo de PpIX (I.F igual a $11,599 \times 10^5$) foi maior comparado ao acúmulo de PpIX induzida pela **formulação controle** no mesmo tempo (I.F igual a $6,386 \times 10^5$). Isto novamente mostra o efeito promotor de penetração do AO para o fármaco 5-ALA, facilitando sua penetração através do EC normal. Como consequência, induz uma maior conversão de 5-ALA a PpIX, e portanto, um maior acúmulo do fotossensibilizador, após pouco tempo de aplicação da **formulação**. Além disso, este acúmulo foi mantido por mais tempo, comparado ao controle.

Em pesquisa recente, VAN DEN AKKER et al. (2002) estudaram a aplicação das formulações de modo contínuo, ou seja, os fármacos em concentrações variando de 0,5 a 20% p/p foram aplicados e as medidas de fluorescência *in vivo* foram feitas até o tempo de 24 horas. O tempo que corresponde a máxima fluorescência da PpIX neste caso foi de 8 horas para o 5-ALA ou ALA hexil éster. A partir de 24 horas de aplicação, a fluorescência da PpIX começa a diminuir. Os autores também avaliaram a influência do *promotor de absorção HPE-101* nas formulações após 10 minutos ou 1 hora de aplicação e as medidas de fluorescência foram feitas até 14 horas. Foi verificado que a presença do promotor de absorção aumentou a intensidade de fluorescência da PpIX tanto após 10 minutos ou 1 hora de aplicação, sendo a intensidade maior após **1 hora**. Estes valores foram maiores para a PpIX induzida por **5-ALA** comparados aquela induzida por ALA hexil éster.

O terceiro parâmetro para a avaliação da biodisponibilidade da PpIX é a determinação da Área abaixo da curva (AAC) de cinética/degradação. Este parâmetro representa a quantidade total de PpIX acumulada ou induzida por 5-ALA após a administração tópica a partir do controle e da **formulação**. Quanto maior a AAC, maior o acúmulo de PpIX e conseqüentemente, maior a biodisponibilidade desta no tecido animal.

A **Tabela 15** mostra os valores de Área abaixo da curva (AAC) para o controle (5-ALA 1% em PG) e **formulação** (5-ALA 1% + AO 10% em PG). Pode-se verificar que utilizando as mesmas concentrações de 5-ALA, foram obtidos

valores de AAC bastante diferentes entre controle e formulação. Esta diferença portanto reflete a extensão do acúmulo da PpIX, o qual foi em torno de 1,8 vezes maior para a formulação, comparada ao controle. Assim sendo, conclui-se que a formulação de 5-ALA contendo 10% de AO proporcionou uma maior biodisponibilidade da PpIX no local de ação desejado, a pele.

Considerando que uma adequada produção e acúmulo da PpIX no tecido representa um fator crucial para o sucesso da TFD, a formulação proposta neste estudo apresenta potencialidade para a otimização da TFD-5-ALA tópica.

Pode-se concluir também que a formulação proposta neste estudo pode ser mais vantajosa comparada às utilizadas atualmente, visto que uma concentração de 1% de 5-ALA na presença de AO, pode induzir uma maior produção/acúmulo de PpIX do que uma solução de **5-ALA a 20%** (**Figura 29**) correspondendo esta a concentração usual de 5-ALA utilizada atualmente na TFD clínica. Entretanto, estudos clínicos empregando TFD devem ser futuramente conduzidos com a formulação estudada (5-ALA 1 % + AO 10 % em PG) no sentido de se verificar a eficiência e segurança das mesmas em pacientes portadores de câncer de pele.

Como contribuição científica, o presente trabalho comprovou a potencialidade de formulações de simples composição e manipulação contendo 5-ALA e promotor de absorção, AO, para a aplicação na TFD tópica do câncer de pele.

7-CONCLUSÕES

- ✚ O método de quantificação de 5-ALA por espectrofluorimetria após reação de derivação mostrou-se adequado para as diversas etapas experimentais;
- ✚ A determinação dos coeficientes de partilha (K) indicou que o **5-ALA** é um composto altamente hidrossolúvel ($K_{O/A}$) cujos valores partilhas para a pele ($K_{P/A}$) ou para o EC ($K_{EC/A}$) foram muito pequenos, significando sua limitada afinidade para a pele e o EC, respectivamente. Por outro lado, os valores de K para os **derivados esterificados** de 5-ALA mostraram as características de lipossolubilidade (valores de $K_{O/A}$ maiores que do 5-ALA) bem como a maior afinidade destes para a pele viável e para o EC (maiores valores de $K_{P/A}$ e $K_{EC/A}$ respectivamente);

- ✚ Os complexos de ceramida contendo os fármacos **5-ALA**, **ALA n - hexil** ou **ALA n- octil éster** (1% p/p) não mostraram perfis adequados de permeação e retenção *in vitro*, tanto no EC como na [epiderme + derme], uma vez que a ceramida diminuiu a permeação dos fármacos através da pele e não aumentou as retenções dos mesmos no tecido animal. Portanto, a ceramida não constituiu um bom adjuvante para o sistema de liberação/penetração cutânea proposto;

- ✚ Os experimentos de permeação *in vitro* para a formulação composta de ALA n-hexil éster (1% p/p) e AO (5 % p/p) mostraram uma diminuição da permeação e da retenção cutâneas após 12 horas para o fármaco em questão, indicando que o AO não é um bom promotor de penetração cutânea para substâncias com características de alta lipossolubilidade;

- ✚ A presença de AO (5 % e 10 % p/p) aumentou o fluxo J *in vitro* do 5-ALA (1 % p/p) em PG através da pele de camundongos sem pêlo, bem como sua retenção na [epiderme + derme], após 12 horas de experimento, comparados ao controle sem AO;

✚ O método de quantificação da PpIX por espectrofluorimetria é adequado, uma vez que apresentou uma alta sensibilidade;

✚ A **determinação quantitativa da PpIX *in vitro*** por metodologia de extração da PpIX por solventes, após 4 horas de aplicação das formulações contendo **1% 5-ALA + 5% ou 10% AO** nos animais, mostrou a potencialidade destas formulações em aumentar o acúmulo de PpIX em peles de camundongos sem pêlo, comparados ao controle sem AO. Comparando as intensidades de fluorescência obtidas após a aplicação da formulação **1 % p/p 5-ALA + 10 % p/p AO** na pele animal com aquela obtida com o controle **20 % p/p 5-ALA em PG** (concentração de 5-ALA utilizada atualmente na TFD clínica) pode-se dizer que a formulação estudada é mais vantajosa em termos de acúmulo do fotossensibilizador. Para o tratamento tópico do câncer de pele, isto representa uma vantagem e pode contribuir para a otimização da TFD-5-ALA tópica.

✚ A **avaliação qualitativa do acúmulo de PpIX *in vivo*** com a formulação contendo **1% 5-ALA + 5% ou 10% AO**, por técnica não invasiva, utilizando dispositivo de fibra óptica, mostrou ser adequada e sensível, comparada com a metodologia de extração da PpIX *in vitro*. Além disso, a técnica utilizada confirmou que a presença do AO a 5% ou 10% aumentaram a permeação do 5-ALA, alcançando a epiderme viável, induzindo assim uma maior conversão de 5-ALA a PpIX e conseqüentemente, maior acúmulo do fotossensibilizador (3,5 e 5,6 vezes, respectivamente) comparado ao controle, sem AO, no sítio de ação desejado.

✚ O estudo da cinética de acúmulo/degradação da PpIX mostrou que houve um acúmulo significativamente maior de PpIX na pele animal, no intervalo de tempo de **1 a 4 horas**, após a aplicação da formulação de **1% 5-ALA + AO 10%**, comparado ao controle, sem AO. Desse modo, determinou-se o intervalo de tempo que corresponde ao melhor tempo para a aplicação da TFD, pois houve maior acúmulo do fotossensibilizador no tecido animal. Além disso, este estudo avaliou o tempo de manutenção da fluorescência na pele em toda a área de aplicação da formulação testada- **30 minutos a 8 horas**- mostrando que o

produto mantém por mais tempo o acúmulo do fotossensibilizador no local de ação, comparado ao controle.

↓ A área abaixo da curva (AAC) de cinética/degradação da PpIX representa a quantidade total de PpIX acumulada após administração tópica e está relacionada com a biodisponibilidade do fotossensibilizante no local de ação desejado. A formulação de 5-ALA (1%) contendo 10% de AO apresentou valor de AAC significativamente maior comparada ao controle (5-ALA 1% em PG), mostrando um maior acúmulo de PpIX e portanto, uma maior biodisponibilidade na pele animal. Como uma adequada produção e acúmulo de PpIX é um fator crucial para o sucesso da TFD, a formulação em estudo mostrou-se potencial para a otimização da TFD-5-ALA- tópica.

↓ Sendo a PpIX uma substância fluorescente e responsável pelos danos fototóxicos ao tecido tumoral, este estudo levou ao desenvolvimento de uma formulação de simples composição e manipulação, mostrando a potencialidade de 5-ALA + AO para a TFD 5-ALA tópica.

8-REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABELS, C.; FRITISH, C.; BOLSEN, K.; SZEIMIES, R-M.; RUZICKA, T.; GOERZ, G. Photodynamic Therapy with 5 aminolevulinic acid induced porphyrins of an amelanotic melanoma in vivo. **J. Photochem. Photobiol. B.**, Lausanne, v. 40, p. 76-83, 1997.
- ACKROYD, R.; KELTY, C.; BROWN, N.; REED, M. The history of photodetection and photodynamic therapy. **Photochem Photobiol.**, Oxford, Nov; v. 74 (5) p. 656-69, 2001.
- ADDICKS, W. J.; FLYNN, G. L.; WEINER, N. Validation of a flow-through diffusion cell for use in transdermal research. **Pharm. Res.**, New York, v. 4, p. 337-341, 1987.
- AKHTER, S. A.; BENNETT, S. L.; WALLER, I. L.; BARRY, B. W. An automated diffusion apparatus for studying skin penetration. **Int. J. Pharm.**, Amsterdam, v. 21, p. 17-26, 1984.
- ALFIN-SLATER, R. B.; AFTERGOOD, L.; WELLS, A. F.; DEUEL, H. J. JR. The effect of essential fatty acid deficiency on the distribution of endogenous cholesterol in the plasma and liver of the rat. **Arch. Biochem. Biophys.**, New York, v. 52, p. 180-185, 1954.
- AUNGST, B. J.; ROGERS, N. J.; SHEFTER, E. Enhancement of naloxone penetration through human skin in vitro using fatty acids, fatty alcohols, surfactants, sulfoxides and amides. **Int. J. Pharm.**, Amsterdam, v. 33, p. 225-234, 1986.
- BARON, J. A. and GREENBERG, E. R. Prevention of nonmelanoma skin cancer. **Arch. Dermatol.**, Chicago, v. 136, p. 245-6, 2000.
- BARRY, B. W.; BENNETT, S. L. Effect of penetration enhancers on the penetration of mannitol, hydrocortisone and progesterone through human skin. **J. Pharm. Pharmacol.**, London, v. 39, p. 535-546, 1987.
- BECH, O., PHILLIPS, D., MOAN, J and MacROBERT, A. J. A hydroxypyridinone (CP94) enhances protoporphyrin IX formation in 5-aminolaevulinic acid treated cells. **J. Photochem. Photobiol. B.**, Lausanne, v. 41, p. 136-144, 1997.
- BENNETT, S. L.; BARRY, B. W. Effectiveness of skin penetration enhancers propylene glycol, azone, decylmethyl sulphoxide and oleic acid with model polar (mannitol) and nonpolar (hydrocortisone) penetrants. **J. Pharm. Pharmacol.**, London, v. 37, p.84, 1987.
- BENTLEY, M. V. L. B.; KEDOR, E. R. M.; VIANNA, R. F.; COLLETT, J. H. The influence of lecithin and urea on the *in vitro* permeation of hydrocortisone acetate through skin from hairless mouse. **Int. J. Pharm.**, Amsterdam, v. 146, n. 2, p. 255-262, 1997b.
- BENTLEY, M. V. L. B.; VIANNA, R. F.; WILSON, S.; COLLETT, J. H. A characterization of the influence of some cyclodextrins on the stratum corneum from hairless mouse. **J. Pharm. Pharmacol.**, London, v. 49, p. 397-402, 1997a.
- BERG, K.; ANHOLT, H.; BECH, O. and MOAN, J. The influence of iron chelators on the accumulation of protoporphyrin IX in 5-aminolevulinic acid-treated cells. **Br. J. Cancer**, London, v. 74, p. 688-697, 1996.
- BLACK, H. S.; DE GRUIJL, F. R.; FORBES, P. D.; CLEAVER, J. E.; ANANTHASWAMY, H. N.; DeFABO, E. C; ULLRICH, S. E.; TYRRELL, R. M. Photocarcinogenesis: an overview. **J. Photochem. Photobiol B: Biol.**, Lausanne, v. 40, p. 29-47, 1997.

- BODDÉ, H. E.; JOOSTEN, J. G. H. A mathematical model for drug release from a two-phase system to a perfect skin. **Int. J. Pharm.**, Amsterdam, v. 26, p. 57-76, 1985.
- BOUCAUD, A.; MACHET, L.; ARBEILLE, B.; MACHET, M. C.; SOURNAC, M.; MAVON, A.; PATAT, F.; VAILLANT, L. In vitro study of low-frequency ultrasound-enhanced transdermal transport of fentanyl and caffeine across human and hairless rat skin. **Int. J. Pharm.**, Amsterdam, v. 228 (1-2), p. 69-77, 2001.
- BOUWSTRA, J. A.; GOORIS, G. S.; SALOMONS-DE VRIES, M. A.; VAN DER SPEK, J. A.; BRAS, W. Structure of human stratum corneum as a function of temperature and hydration: A wide-angle X-ray diffraction study. **Int. J. Pharm.**, Amsterdam, v. 84, p. 205-216, 1992.
- BROUNAUGH, R. L. & COLLIER, S. W. In vitro methods for measuring skin permeation. In: ZATZ, J. L. **Skin Permeation: Fundamentals and Applications**. Wheaton, Allured Publishing, 1993, p. 93-111.
- BURR G. O. and BURR, M. M. A new deficiency disease produced by the rigid exclusion of fat from the diet. **J. Biol. Chem.**, Baltimore, v. 82, p. 345-367, 1929.
- CASAS, A.; FUKUDA, H.; DI VENOSA, G.; BATTLE, A. Photosensitization and mechanism of cytotoxicity induced by the use of ALA derivatives in photodynamic therapy. **Br. J. Cancer, London**, Jul 20; v.85 (2), p.279-84, 2001a.
- CASAS, A.; PEROTTI, C.; FUKUDA, H.; ROGERS, L.; BUTLER, A. R.; BATTLE, A. ALA and ALA hexyl ester-induced porphyrin synthesis in chemically induced skin tumours: the role of different vehicles on improving photosensitization. **Br. J. Cancer, London**, Nov 30; v. 85 (11) p. 1794-800, 2001b.
- CAUSON, R. Validation of chromatographic methods in biomedical analysis. Viewpoint and discussion. **J. Chromatography B.**, New York, v. 689, p. 175-180, 1997.
- CLARYS, P.; ALEWAETERS, K.; JADOUL, A.; BAREL, A.; MANADAS, R. O.; PREAT, V. In vitro percutaneous penetration through hairless rat skin: influence of temperature, vehicle and penetration enhancers. **Eur. J. Pharm. Biopharm.**, Amsterdam, Nov; v. 46 (3), p. 279-83, 1998.
- COOPER, E. R. Increased skin permeability for lipophilic molecules. **J. Pharm. Sci.**, Washington, v. 73, p. 1153-1156, 1984.
- CUMMINGS, S. R.; TRIPP, M. K.; HERRMANN, N. B. Approaches to the prevention and control of skin cancer. **Cancer Metastasis Rev.**, Oxford, v. 16 (3-4), p. 309-27, 1997.
- CURNOW, A., McILROY, B. W., POSTLE-HACON, M. J., PORTER, J. B., Mac ROBERT, A. J. and BOWN, S. G. Enhancement of 5- aminolaevulinic acid induced photodynamic therapy using hydroxypyridinone iron chelating agents. **Br. J. Cancer, London**, v. 78, p. 1278-1282, 1998.
- DE ROSA, F. S. & BENTLEY, M. V. L. B. Photodynamic Therapy of skin cancers: sensitizers, clinical studies and future directives. **Pharm. Res.**, New York, v. 17, p. 1447-1455, 2000.
- DE ROSA, F. S. Influência de promotor de absorção cutânea e derivados do ácido 5-aminolevulínico na terapia fotodinâmica do câncer de pele. Ribeirão Preto, 2002. **Tese de Doutorado**. Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto - Universidade de São Paulo, 132 p.
- DE ROSA, F. S.; MARCHETTI, J. M.; TEDESCO, A. C.; BENTLEY, M. V. L. B. A

- vehicle for photodynamic therapy of skin cancer: influence of dimethylsulphoxide on 5-aminolevulinic acid in vitro cutaneous permeation and in vivo protoporphyrin IX accumulation determined by confocal microscopy. **J. Control. Rel.**, Amsterdam, v. 65 (3), p. 359-366, 2000.
- DE ROSA, F. S.; TEDESCO, A. C.; LOPEZ, R. F.V.; PIERRE, M. B. R.; LANGE, N.; MARCHETTI, J. M.; ROTTA, J. C. G.; BENTLEY, M. V. L. In vitro skin permeation and retention of 5-aminolevulinic acid ester derivatives for photodynamic therapy. **J. Control. Rel.**, Amsterdam, v. 89, p. 261-269, 2003.
- DE VOS, F.; DE MUYNCK, C.; GEERTS, M. and REMON, J. P. Percutaneous absorption of indomethacin from transparent oil/water gels in rabbits. **J. Pharm. Pharmacol.**, London, v. 43, p. 237-241, 1991.
- DEGIM, I. T.; USLU, A.; HADGRAFT, J.; ATAY, T.; AKAY, C. and CEVEHEROGLU, S. The effects of Azone and capsaicin on the permeation of naproxen through human skin. **Int. J. Pharm.**, Amsterdam, v. 179, p. 21-25, 1999.
- DICK, I. P.; SCOTT, R. C. Pig ear skin as an in-vitro model for human skin permeability. **J. Pharm. Pharmacol.**, London, v. 44, p. 640-645, 1992.
- DOUGHERTY, T. J. and POTTER, W. R. Of what value is a highly absorbing photosensitizer in PDT ? **J. Photochem. Photobiol.**, Lausanne, v. 8, p. 223-225, 1991.
- DOUGHERTY, T. J., COOPER, M. T., MANG, T. S. Cutaneous phototoxic occurrences in patients receiving Photofrin. **Lasers Surg. Med.**, New York, v. 10, p. 485-488, 1990.
- DOWNING, D. T.; ABRAHAM, W.; WEGNER, B. K.; WILLMAN, K. W. and MARSHALL, J. L. Partition of dodecyl sulfate into stratum corneum lipid liposomes. **Arch. Dermatol. Res.**, Berlin, v. 285, p. 151-157, 1993a.
- DOWNING, D. T.; STEWART, M. E.; WERTZ, P. W.; STRAUSS, J. S. Lipids of the epidermis and the sebaceous glands; in Fitzpatrick TB, Eisen AZ, Wolff K, Freedberg IM, Austen KF (eds): **Dermatology in General Medicine**. New York, McGraw-Hill, 1993b, ed 4, p.210-221.
- EDDY, D. J. Non-melanoma skin cancer and the "new National Health Service": implications for U.K. dermatology? **Br. J. Dermatol.**, Oxford, v. 142, p. 397-400, 2000.
- EL-KATTAN, A. F.; ASBILL, C. S.; KIM, N.; MICHNIAK, B. B. The effects of terpene enhancers on the percutaneous permeation of drugs with different lipophilicities. **Int. J. Pharm.**, Amsterdam, v. 215 (1-2), p. 229-40, 2001.
- EMANUELLI, T.; PAGEL, F. W.; ALVES, L. B.; REGNER, A. and SOUZA, D. O. Inhibition of adenylate cyclase activity by 5-ami-nolevulinic acid in rat and human brain. **Neurochem. Int.**, Oxford, v. 38, p. 213-218, 2001.
- FARTASH, M. The nature of the epidermal barrier: structural aspects. **Adv. Drug Deliv. Rev.**, Amsterdam, v. 18, p. 273-282, 1996.
- FINK-PUCHES, R.; SOYER, H. P.; HOFER, A.; KERL, H. and WOLF, P. Long-term follow-up and histological changes of superficial nonmelanoma skin cancers treated with topical 5-aminolevulinic acid photodynamic therapy. **Arch. Dermatol.**, Chicago, v. 134, p. 821-826, 1998.
- FOLDVARI, M. Non-invasive administration of drugs through the skin: challenges in delivery system design. **Pharm. Sci. Technol. Today.**, Oxford, dec 1; v. 3 (12), p. 417-425, 2000.
- FRANCOEUR, M. L.; GOLDEN, G. M.; POTTS, R. O. Oleic acid: its effects on stratum corneum in relation to (trans) dermal drug delivery. **Pharm. Res.**, New York, v. 7, p. 621-627, 1990.

- FRANZ, J. T. Percutaneous absorption. On the relevance of in vitro data. **J. Invest. Dermatol.**, New York, v. 64, p. 190-195, 1975.
- FRANZ, T. J. The finite dose technique as a valid in vitro model for the study of percutaneous absorption in man, In: MALI, J. W. H (ed):**Curr. Probl. Dermatol.** Basel, Karger, 1978, v. 7, p. 58-68.
- FRITISCH, C.; VERWOHLT, B.; BOLSEN, K.; RUZICKA, T. and GOERZ, G. Influence of topical photodynamic therapy with 5-aminolevulinic acid on porphyrin metabolism. **Arch. Dermatol. Res.**, Berlin, v. 288, p. 517-521, 1996.
- FRITISH, C.; BATZ, J.; BOLSEN, K. Ex vivo application of 5-aminolevulinic acid induces high and specific porphyrin levels in human skin tumours: possible basis for selective photodynamic therapy. **Photochem. Photobiol.**, Oxford, v. 66 (1), p. 114-118. 1997.
- FRITISH, C.; GOERZ, G. and RUZICKA, T. Photodynamic Therapy in Dermatology. **Arch. Dermatol.**, Chicago, v. 34, p. 207-214, 1998.
- FUKUDA, F.; PAREDES, S.; BATTLE, A. M. Tumor-localizing properties of porphyrins. In vitro studies using the porphyrin precursor, aminolevulinic acid, in free and liposome encapsulated forms. **Drug. Des. Deliv.**, Reading, G.B: Harwood Academic Publishers, v. 5, n. 2, p. 133-139, 1989.
- GARSON, J. C.; DOUCET, J.; LÉVÊQUE, J. L.; TSOUCARIS, G. Oriented structure in human stratum corneum revealed by X-ray diffraction. **J. Invest. Dermatol.**, New York, v. 96, p. 43-49, 1991.
- GAULLIER, J. M.; BERG, K.; PENG, Q.; ANHOLT, H.; SELBO, P. K.; MA, L. W. and MOAN, J. Use of 5-aminolevulinic acid esters to improve photodynamic therapy on cells in culture. **Cancer Res.**, Baltimore, v. 57, p. 1481-1486, 1997.
- GEDERAAS, O. A.; RASH, M. H.; BERG, K.; LAGERBERG, J. W. and DUBBELMAN, T. M. Photodynamically induced effects in colon carcinoma cells (WiDr) by endogenous photosensitizers generated by incubation with 5-aminolevulinic acid. **J. Photochem. Photobiol.**, Lausanne, v. 49, p. 162-70, 1999.
- GERSCHER, S.; CONNELLY, J. P.; BEIJERSBERGEN, VAN HENEGOUWEN, G. M.; MAC ROBERT, A. J.; WATT, P, RHODES, L. E. A quantitative assessment of protoporphyrin IX metabolism and phototoxicity in human skin following dose-controlled delivery of the prodrugs 5-aminolaevulinic acid and 5-aminolaevulinic acid-n-pentylester. **Br. J. Dermatol.**, Oxford, May; v. 144 (5) p. 983-90, 2001.
- GHOSH, T. K.; CHIAO, C. S.; GOKHALE, R. D. In vitro permeation of some β -blockers across the hairless mouse skin. **J. Pharm. Pharmacol.**, London, v. 45, p. 218-9, 1993.
- GIBSON, S. L.; HAVENS, J. J.; FOSTER, T. H. and HILF, R. Time-dependent intracellular accumulation of δ -aminolevulinic acid, induction of porphyrins synthesis and subsequent phototoxicity. **Photochem. Photobiol.**, Lawrence, v. 65, n. 3, p. 416-421, 1997.
- GIBSON, S.; COHEN, H. & COHEN, H. R. Evidence against the production of superoxide by photoirradiation of hematoporphyrin derivate. **Photochem. Photobiol.**, Lawrence, v. 40, p.441-8, 1984.
- GOLDEN, G. M.; McKIE, J. E.; POTTS, R. O. Role of stratum corneum lipid fluidity in transdermal drug flux. **J. Pharm. Sci.**, Washington, v. 76, p. 25-28, 1987.
- GOODMAN, DeWS. The interaction of human serum albumin with long chain fatty acid anions. **J. Am. Chem. Soc.**, Easton, PA, v. 80, p. 3892-3898, 1958.

- GOODMAN, M., BARRY, B. W. Action of penetration enhancers on human skin as assessed by the permeation of model drugs 5-fluorouracil and estradiol. I. Infinite dose technique. **J. Invest. Dermatol.**, New York, v. 91, p. 323, 1988.
- GOTTFRIED, V.; PELED, D.; WINKELMAN, J. Photosensitizers in organized media: singlet oxygen production and spectral properties. **Photochem. Photobiol.**, Lausanne, v. 48, p.157-63, 1988.
- GOTTLÖBER, P.; KRAHN, G.; BEZOLD, G. and PETER, R. U. Basal cell carcinomas occurring after accidental exposure to ionizing radiation. **Br. J. Dermatol.**, Oxford, v. 141 (2), p. 383-5, 1999.
- GRANSTROM, E. The aradonic cascade. The prostaglandins, thromboxanes and leukotrienes. **Inflammation**, New York, v. 8, p. S15-S25, 1984.
- GRAY, G. M. and YARDLEY, H. J. Different population of pig epidermal cells: isolation and lipid composition. **J. Lipids Res.**, Bethesda, MD, v. 16, p. 441-447, 1975.
- GREEN, A.; WHITEMAN, D.; FROST, C. and BATTISTUTTA, D. Sun exposure, skin cancers and related skin conditions. **J. Epidemiol.**, Tokyo, v. 96 (suppl 6): S7-13, 1999.
- GREEN, P. G.; GUY, R. H.; HADGRAFT, J. In vitro and in vivo enhancement of skin permeation with oleic and lauric acids. **Int. J. Pharm.**, Amsterdam, v. 48, p. 103-111, 1988.
- GUMMER, C. L. The in vitro evaluation of transdermal delivery; in Hadgraft, J., Guy, R. H. (eds): **Transdermal drug delivery: developmental issues and research initiatives**. New York, Marcel Dekker, 1989, p.177-196.
- GUNSTONE, F. D. **An introduction to the Chemistry of fats and fatty acids**. London, Chapman & Hall, 1958.
- HADGRAFT, J. and BEUTNER, P. In vivo-in vitro comparisons in the transdermal delivery of nitroglycerin. **Int. J. Pharm.**, Amsterdam, v. 89, R1-R4, 1993.
- HADGRAFT, J. Passive enhancement strategies in topical and transdermal drug delivery. **Int. J. Pharm.**, Amsterdam, v. 184, p. 1-6, 1999.
- HADGRAFT, J.; PECK, J.; WILLIAMS, D. G.; PUGH, W. J.; ALLAN, G. Mechanisms of action of skin penetration enhancers retarders-Azone and analogs. **Int. J. Pharm.**, Amsterdam, v. 141, p. 17-25, 1996.
- HALPRIN, K. M. Cyclic nucleotides and epidermal cell proliferation. **J. Invest Dermatol.**, New York, v. 66, p. 339-343, 1976.
- HANNUKSELA-SAVAHN, A.; PUKKALA, E. and KARNOVEN, J. Basal cell skin carcinoma and other nonmelanoma skin cancers in Finland from 1956 through 1995. **Arch. Dermatol.**, Chicago, v. 135 (7), p. 781-6, 1999.
- HARTH, Y.; HIRSHOWITZ, B.; and KAPLAN, B. Modified topical photodynamic therapy of superficial skin tumors, utilizing aminolevulinic acid, penetration enhancers, red light, and hyperthermia. **Dermatol. Surg.**, NY, v. 24, p. 723-726, 1998.
- HENDERSON, B. W & DOUGHERTY, T. J. How does photodynamic therapy work? **Photochem. Photobiol.**, Oxford, v. 55, p. 145-157, 1992.
- HERMANN, M. A.; WEBBER, J.; LUO, Y.; PATACSIL, V.; KESSEL, D.; FROMM, D. Effects of fractionated 5-aminolevulinic acid administration on tissue levels of protoporphyrin in vivo. **J. Photochem. Photobiol. B: Biol.**, Lausanne, v. 40, p. 107-110, 1997.

- HOECK, U.; ORUP JACOBSEN, L.; KREILGARD, B. Comparison of pig skin and human skin for in vitro percutaneous study of morphine prodrug. **Proc. Int. Symp. Control. Release Bioact Mater.**, v. 21, p. 425-426, 1994.
- HOELGAARD, A.; MOLLGAARD, B.; BAKER, E. Vehicle effect on topical drug delivery. IV. Effect of N-methylpyrrolidone and polar lipids on percutaneous drug transport. **Int. J. Pharm.**, Amsterdam, v. 43, p. 233-240, 1988.
- HURLIMANN, A.F.; HANGGI, G and PANIZZON, R. G. Photodynamic therapy of superficial basal cell carcinomas using topical aminolevulinic acid in a nanocolloid lotion. **Dermatology**, Basel, v. 197, p. 248- 254, 1998.
- IINUMA, S.; BACHOR, R.; FLOTTE, T.; HASAN, T. Biodistribution and phototoxicity of 5-aminolevulinic acid-induced PpIX in orthotopic rat bladder tumor model. **J. Urology**, Hagerstown, MD, v. 153, p. 802-806, 1995.
- IINUMA, S; FARSHI, S. S.; ORTEL, B. and HASAN, T. A mechanistic study of cellular photodestruction with 5-aminolevulinic acid-induced porphyrin. **Br. J. Cancer.**, London, v. 70, p. 21-28, 1994.
- JACKSON, S. M.; ELIAS, P. M. Skin as an organ of protection, in: Fitzpatrick, T. B.; EISEN, A. Z.; WOLFF, K.; FREEDBERG, I. M.; AUSTEN, K. F (eds): **Dermatology in General Medicine**, New York, McGraw-Hill, 1993, ed.4, p. 241-253.
- JOHANSSON, J.; BERG, R.; SVANBERG, K and SVANBERG, S. Laser-induced fluorescence studies of normal and malignant tumour tissue of rat following intravenous injection of d-aminolevulinic acid. **Lasers Surg. Med.**, NY, v. 20, p. 272-279, 1997.
- JUZENAS, P.; SHARFAEI, S.; MOAN, J. and BISSONNETTE, R. Protoporphyrin IX fluorescence kinetics in UV-induced tumours and normal skin of hairless mice after topical application of 5-aminolevulinic acid methyl ester. **J. Photochem. Photobiol B: Biol**, Lausanne, v. 67, p. 11-17, 2002.
- JUZENIENE, A.; JUZENAS, P.; IANI, V.; and MOAN, J. Topical Application of 5-Aminolevulinic Acid and its Methylester, Hexylester and Octylester Derivatives: Considerations for Dosimetry in Mouse Skin Model. **Photochem. Photobiol.**, Oxford, v. 76 (3), p. 329-334. 2002b.
- JUZENIENE, A.; JUZENAS, P.; KAALHUS, O.; IANI, V. and MOAN, J. Temperature Effect on Accumulation of Protoporphyrin IX After Topical Application of 5-Aminolevulinic Acid and its Methylester and Hexylester Derivatives in Normal Mouse Skin. **Photochem. Photobiol.**, Oxford, v. 76 (4), p. 452 -456, 2002a.
- KAJIWARA, M.; HARA, K.; TAKATORI, K. and MATSUMOTO. Revised structure of a 5- aminolevulinic acid derivative. **Clin. Chem.**, Washington, DC, v. 39, n. 9, p. 1867-1871, 1993.
- KAMP, F. and HAMILTON, J. A. pH gradients across phospholipid membranes caused by fast flip-flop of unionized fatty acid. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.**, Washington, v. 89, p. 11367-11370, 1992.
- KANDIMALLA, K.; KANIKKANNANN, K.; ANDEGA, S.; SINGH, M. Effect of fatty acids on the permeation of melatonin across rat and pig skin in-vitro and on the transepidermal water loss in rats in-vivo. **J. Pharm. Pharmacol.**, London, Jul; v. 51 (7), p. 783-90, 1999.
- KAPPAS, A.; SASSA, S.; GALBRAITH, R. A.; NORDMANN, Y. The porphyrias, in: Scriver, C. R., Beaudet, A. L., Sly, W. S., Valle, D. (eds), **The metabolic basis of inherited disease**, McGraw-Hill, New York, 6 th edn., 1989, p. 1305-1366.
- KARRER, S.; SZEIMIES, R. M.; HOHENLEUTNER, U. and LANDTHALER, M. Role of lasers and photodynamic therapy in the treatment of cutaneous malignancy. **Am. J. Clin. Dermatol.**; Auckland, Philadelphia, v. 2 (4) p. 229-37, 2001.

- KENNEDY, J. C. and POTTIER, R. H. Endogenous protoporphyrin IX, a clinically photosensitizer for photodynamic therapy. **J. Photochem. Photobiol. B: Biol.**, Lausanne, v. 14, p. 275-292, 1992.
- KESSEL, D.; CHOU, T. H. Tumor -localizing components of the porphyrin preparation hematoporphyrin derivative. **Cancer Research**, Baltimore, MD, v. 43, p. 1994-1999, 1983.
- KLOECK, J. and VAN HENEGOUWEN, G. M. J. B. Prodrugs of 5- aminolevulinic acid for photodynamic therapy. **Photochem. Photobiol.**, Lawrence, v. 64 (6) p. 994- 1000, 1996.
- KLOECK, J.; AKKERMANS, W. and BEIJERSBERGEN VAN HENEGOUWEN, G. M. J. Derivatives of 5-aminolevulinic acid for photodynamic therapy: enzymatic conversion into protoporphyrin. **Photochem. Photobiol.**, Oxford, v. 67 (1), p. 150-154, 1998.
- KODERHOLD, G.; JINDRA, R.; KOREN, H.; ALTH, G. and SCHENK, G. Experiences of photodynamic therapy in dermatology. **J. Photochem. Photobiol. B.**, Lausanne, v. 36, p. 221-223, 1996.
- KRIEGMAIR, M.; BAUMGARTNER, R.; KNUCHEL, R.; EHSAN, A.; STEIN-BACH, P.; LUPMER, W.; HOFSTAEDTER, F. and HOFSTETTER, A. Pho-todynamische diagnose urothelialer neoplasien nach intravesi-kaler instillation von 5-aminolaevulinsaeure. **Urologe**, Berlin, 33, p. 270 - 275, 1994.
- KRILL, S. L.; KNUTSON, K.; HIGUCHI, W. I. The stratum corneum lipid thermotropic phase behavior. **Biochim. Biophys. Acta**, Amsterdam, v. 1112, p. 281-286, 1992.
- LAMPE, M. A.; BURLINGAME, A. L.; WHITNEY, J. A.; WILLIAMS, M. L.; BROWN, B. E.; ROITMAN, E.; ELIAS, P. M. Human stratum corneum lipids: characterization and regional variations. **J. Lipid Res.**, Bethesda, v. 24, p. 120-130, 1983.
- LANG, K.; LEHMANN, P.; BOLSEN, K.; RUZICKA, T.; FRITISCH, C. Aminolevulinic acid: pharmacological profile and clinical indication. **Expert Opin. Investig. Drugs**, London, Jun; v. 10 (6) p. 1139 - 56, 2001.
- LANGE, N.; JICHLINSKI, P.; ZELLWEGER, M.; TORRER, M.; MARTI, A.; GUILLOU, L.; KUCERA, P.; WAGNIÈRES, G.; VAN DEN BERGH, H. Photodetection of early human bladder cancer based on the fluorescence of 5-aminolevulinic acid hexylester-induced protoporphyrin IX: a pilot study. **Br. J. Cancer**, London, v. 80, p. 185-193, 1999.
- LARRUCEA, E.; ARELLANO, A.; SANTOYO, S.; YGARTUA, P. Combined effect of oleic acid and propylene glycol on the percutaneous penetration of tenoxicam and its retention in the skin. **Eur. J. Pharm. Biopharm.**, Amsterdam, Sep; 52 (2), p. 113-9, 2001.
- LEE, W-R; SHEN, S. C.; LAI, H.; HU, C-H.; FANG, J-Y. Transdermal drug delivery enhanced and controled by erbium: YAG laser: a comparative study of lipophilic and hydrophilic drugs. **J. Control. Rel.**, Amsterdam, v. 75 (2), p. 155-166, 2001.
- LILGE, L.; O' CARROL, C. and WILSON, B. C. A solubilization technique for photosensitizer quantification in ex vivo tissue samples. **J. Photochem. Photobiol. B: Biol.**, Lausanne, v. 39, p. 229-235, 1997.
- LOFTSSON, T.; GILDERSLEEVE, N.; BODOR, N. The effect of vehicle additives on the transdermal delivery of nitroglycerin. **Pharm. Res.**, New York, v. 4, p. 436-437, 1987.
- LOFTSSON, T.; GILDERSLEEVE, N.; SOLIMAN, R.; BODOR, N. Effect of oleic acid on diffusion drugs through hairless mouse skin. **Acta Pharm. Nord.**, Stockholm, v. 1, p. 17-22, 1989b.

- LOFTSSON, T.; PETERSEN, D. S.; LE GOFFIC, F.; OLAFSSON, J. H. Unsaturated glycerol monoethers as novel skin penetration enhancers. **Pharmazie**, Berlin, v. 52 (6) p. 463, 1997.
- LOFTSSON, T.; SIMOGYI, G.; BODOR, N. Effect of choline esters and oleic acid on the penetration of acyclovir, estradiol, hydrocortisone, nitroglycerin, retinoic acid and trifluororthymidine across hairless mouse skin in vitro. **Acta Pharm. Nord.**, Stockholm, v. 1, p. 279-286, 1989a.
- LOPEZ, R.F.V. Estudo de um sistema de liberação para o ácido 5-aminolevulínico por iontoforese para aplicação na terapia fotodinâmica do câncer de pele, 2000, 108p.
- LOPEZ, R. F. V.; LANGE, N.; GUY, R.; BENTLEY, M. V. L. B. Photodynamic therapy of skin cancer: controlled drug delivery of 5-ALA and its esters. **Adv. Drug. Deliv. Rev.**, v. 56, p. 77-94, 2004.
- LOPEZ, R. F. V.; BENTLEY, M. V. L. B.; CHARRO, M. B. D. and GUY, R. H. Optimization of Aminolevulinic Acid (ALA) Delivery by Iontophoresis. **J. Control. Rel.**, Amsterdam, v. 88, p. 65-70, 2003a.
- LOPEZ, R. F. V.; BENTLEY, M. V. L. B.; CHARRO, M. B. D.; SALOMON, D.; VANDER BERGH, H.; LANGE, N.; and GUY, R.H. Iontophoresis of 5-Aminolevulinic Acid Esters: Potential Application in the Photodynamic Therapy of Skin Cancer? **Photochem. Photobiol.**, Oxford, v. 77, n. 3, 2003b.
- LOPEZ, R. F. V.; BENTLEY, M. V. L. B.; DELGADO-CHARRO, M. B.; GUY, R. H. Iontophoretic delivery of 5-aminolevulinic acid (ALA): effect of pH. **Pharm. Res.**, New York, v. 18 (3) p. 311-315, 2001.
- MA, L.-W., MOAN, J.; PENG, Q. and IANI, V. Production of protoporphyrin IX induced by 5-aminolevulinic acid in trans-planted human colon adenocarcinoma of nude mice can be increased by ultrasound. **Int. J. Cancer**, NY, v. 78, p. 464-469, 1998.
- MAK, V. H. W.; POTTS, R. O.; GUY, R. H. Percutaneous penetration enhancement in vivo measured by attenuated total reflectance infrared spectroscopy. **Pharm. Res.**, New York, v. 7, p. 835-841, 1990.
- MEYER, W.; SCHWARZ, R.; NEURAND, K. The skin of domestic mammals as a model for the human skin, with special reference to the domestic pig. **Curr. Probl. Dermatol.**, Basel, NY, v. 7, p. 39-52, 1978.
- MITRAGOTRI, S. & KOST, J. Low-frequency sonophoresis: a noninvasive method of drug delivery and diagnostics. **Biotechnol. Prog.**, New York, v. 16 (3), p. 488-92, 2000.
- MOAN, J.; MA, L. W.; JUZENIENE, A.; IANI, V.; JUZENAS, P.; APREICENA, F.; PENG, Q. Pharmacology of protoporphyrin IX in nude mice after application of ALA and ALA esters. **Int. J. Cancer**, New York, v. 103, p. 132-135, 2003.
- MORTON, C. A. Topical photodynamic therapy in dermatology. **S. Afr. Med. J.**, Capetown, Aug; v. 91 (8) p. 634-7, 2001.
- MOSER, K.; KRIWET, K.; NAIK, A.; KALIA, Y. N.; GUY, R. H. Passive skin penetration enhancement and its quantification in vitro. **Eur. J. Pharm. Biopharm.**, Amsterdam, v. 52, p. 103-112, 2001.
- MOTTA, S.; MONTI, M.; SESANA, S.; MELLESI, L; GHIDONI, R.; CAPUTO, R. Abnormality of water barrier function in psoriasis. Role of ceramide fractions. **Arch. Dermatol.**, Chicago, v. 130 (4), p. 452-456, 1994.
- NIAZY, E. M. Influence of oleic acid and other permeation promoters on transdermal delivery of dihydroergotamine through rabbit skin. **Int. J. Pharm.**, Amsterdam, v. 67, p. 97-100, 1991.

- NICOLAIDES, N. Skin lipids: their biochemical uniqueness. **Science**, Washington, v. 186, p. 19-26, 1974.
- NINOMIYA, Y.; ITOH, Y.; TAJIMA, S.; ISHIBASHI, A. *in vitro* and *in vivo* expression of protoporphyrin IX induced by lipophilic 5-aminolevulinic acid derivatives. **J. Dermatol. Sci.**, Limerick, v. 27, p. 114-120, 2001.
- NOMURA, H.; KAIHO, F.; SUGIMOTO, Y.; DOHI, M.; KATO, Y. Percutaneous absorption of indomethacin from mixtures of fatty alcohol and propylene glycol (FAPG bases) through rat skin: Effects of oleic acid added to FAPG base. **Chem. Pharm. Bull.**, Tokyo, v. 38, p. 1421-1424, 1990.
- NOVO, M.; HUETTMAN, G. and DIDDENS, H. Chemical instability of 5-aminolevulinic acid used in the fluorescence diagnosis of bladder tumors. **J. Photochem. Photobiol. B.**, Lausanne, v. 34, p. 143-148, 1996.
- OCHSNER, M. Photodynamic therapy: the clinical perspective. Review on applications for control of diverse tumorous and non-tumorous diseases. **ArzneimForsch Drug Res.**, Aulendorf, DE, v. 47, n. II, p. 1185-1194, 1997.
- OGISO, T. and SHINTANI, M. Mechanism for the enhancement effect of fatty acids on the percutaneous absorption of propranolol. **J. Pharm. Sci.**, Washington, v. 79, p. 1065-1071, 1990.
- OH, H. J.; OH, Y. K.; KIM, C. K. Effects of vehicles and enhancers on transdermal delivery of melatonin. **Int J Pharm.**, Amsterdam, Jan 5; v. 212 (1) p. 63-71, 2001.
- OISHI, H.; NOMIYAMA, H.; NOMIYAMA, K. and TOMOKUNI, K. Fluorometric HPLC determination of 5-aminolevulinic acid (ALA) in the plasma and urine of lead workers: biological indicators of lead exposure. **J. Anal. Toxicol.**, Niles, IL, v. 20, p. 106-110, 1996.
- PENG, Q., WARLOE, T.; BERG, K.; MOAN, J.; KONGSHAUG, M.; GIERCKSKY, K. E. and NESLAND, J. M. 5-aminolevulinic acid-based photodynamic therapy. Clinical research and future challenges. **Cancer**, NY, v. 79, p. 2282-2308, 1997b.
- PENG, Q.; BERG, K.; MOAN, J.; KONGSHAUG, M. and NESLAND, J. M. 5-aminolevulinic acid-based photodynamic therapy: principles and experimental research. **Photochem. Photobiol.**, Oxford, v. 65, p. 235-251, 1997a.
- PENG, Q.; WARLOE, T.; MOAN, J. and HEYERDAHAL, H. Distribution of 5-aminolevulinic acid induced porphyrins in noduloulcerative basal cell carcinoma. **Photochem. Photobiol.**, Oxford, v. 62, p. 906-913, 1995.
- PEREIRA, G. R.; COLLETT, J. H.; GARCIA, S. B.; THOMAZINI, J. A.; BENTLEY, M.V.L.B. Glycerol monooleate/solvents systems for progesterone transdermal delivery: *in vitro* permeation and microscopic studies. **Bras. J. Pharm. Sci.**, São Paulo, v. 38, n. 1, p. 55-62, 2002.
- PIERRE, M. B. R.; TEDESCO, A. C.; MARCHETTI, J. M. and BENTLEY, M. V. L. B. Stratum corneum lipid liposomes for the topical delivery of 5-aminolevulinic acid in photodynamic therapy of skin cancer: preparation and *in vitro* permeation study. **B. M. C. Dermatology**, v. 1:5, 2001.
- POTTIER, R. H.; CHOW, Y. F.; LaPLANTE, J. P.; TRUSCOTT, T. G.; KENNEDY, J. C. and BEINER, L. A. Non-invasive technique for obtaining fluorescence excitation and emission spectra *in vivo*. **Photochem. Photobiol.** Oxford, v. 44, p. 679-687, 1986.
- POTTS, R. O. and FRANCOEUR, M. L. Infrared spectroscopy of stratum corneum lipids. *In vitro* results and their relevance to permeability; in Walters, K. A.,

- Hadgraft, J. (eds): **Pharmaceutical Skin Permeation Enhancement**. New York, Marcel Dekker, p. 269-291, 1993.
- POTTS, R. O. Physical characterization of the stratum corneum: the relationship of mechanical and barrier properties to lipid and protein structure; in Hadgraft, J., Guy, R. H. (eds): **Transdermal drug delivery: developmental issues and research initiatives**. New York, Marcel Dekker, p. 23-27, 1989.
- POTTS, R. O. Stratum corneum hydration: experimental techniques and interpretations of results. **J. Soc. Cosmet. Chem.**, Pontiac, IL, v. 37, p. 9-33, 1986.
- POTTS, R. O.; GOLDEN, G. M.; FRANCOEUR, M. L.; MAK, V. H. W.; GUY, R. H. Mechanism and enhancement of solute transport across the stratum corneum. **J. Control. Rel.**, Amsterdam, v. 15, p. 249-260, 1991.
- REBEIZ, N.; REBEIZ, C.; ARKINS, S.; KELLEY, K. W.; REBEIZ, C. A. Photodestruction of tumor cells by induction of endogenous accumulation of protoporphyrin IX: enhancement by 1,10-phenanthroline. **Photochem. Photobiol.**, Lawrence, v. 55, p. 431-435, 1992.
- REGNIER, V.; DE MORRE, N.; JADOUL, A.; PRÉAT, V. Mechanisms of a phosphorothiolate oligonucleotide delivery by skin electroporation. **Int. J. Pharm.**, Amsterdam, v. 184 (2), p. 147-156, 1999.
- REINFENRATH, W. G.; CHELLQUIST, E. M.; SHIPWASH, E. A.; JEDERBERG, W.W.; KRUEGER, G. G. Percutaneous penetration in the hairless dog, weanling pig and grafted athymic nude mouse: evaluation of models for predicting skin penetration in man. **Br. J. Dermatol.**, Oxford, v. 111, n. 27, p. 123-35, 1984.
- REN, Q.G.; WU, S. M.; PENG, Q.; CHEN, J. Y. Comparison of 5-aminolevulinic acid and its hexylester mediated photodynamic action on human hepatoma cells. **Sheng Wu Hua Xue Yu Sheng Wu Wu Li Xue Bao** (Shanghai) Sep; v. 34 (5), p. 650-4, 2002.
- RHODES, L. E.; TSOUKAS, M. M.; Anderson, R. R. and KOLLIAS, N. Iontophoretic delivery of ALA provides a quantitative model for ALA pharmacokinetics and PpIX phototoxicity in human skin. **J. Invest. Dermatol.**, Malden, MA, v. 108, p. 87-91, 1997.
- RICK, K.; SROKA, R.; STEPP, H.; KRIEGMAIR, M.; HUBER, R. M.; JACOB, K.; BAUMGARTNER, R. Pharmacokinetics of 5-aminolevulinic acid-induced protoporphyrin IX in skin and blood. **J. Photochem. Photobiol. B: Biol.**, Lausanne, v. 40, p. 313-319, 1997.
- ROBINSON, D. J.; De BRUIJN, H. S.; JOHANNES DE WOLF, W.; STERENBORG, H. J. C. M. and STAR, W. M. Topical 5-Aminolevulinic Acid-photodynamic Therapy of Hairless Mouse Skin Using Two-fold Illumination Schemes: PpIX Fluorescence Kinetics, photobleaching and biological effect. **Photochem. Photobiol.**, Oxford, v. 72, p. 794-802, 2000.
- ROBSON, K. J.; STEWART, M. E.; MICHELSEN, S.; LAZO, N. D.; DOWNING, D. T. J. 6-Hydroxy-4-sphinganine in human epidermal ceramides. **Lipid Res.**, Bethesda, MD, v. 35 (11), p. 2060-2068, 1994.
- ROY, S. D.; ROOS, E. and SHARMA, K. Transdermal delivery of buprenorphine through cadaver skin. **J. Pharm. Sci.**, Washington, v. 83, n. 2. p. 126-30, 1994.
- SANTUS, G. C. and BAKER, R. W. Transdermal enhancer patent literature. **J. Control. Rel.**, Amsterdam, v. 25, p. 1-20, 1993.
- SATO, K.; SUGIBAYASHI, K. and MORIMOTO, Y. Species differences in percutaneous absorption of nicorandil. **J. Pharm. Sci.**, Washington, v. 80, n. 2, p. 104-7, 1991.

- SCHEUPLEIN, R. J.; BLANK, I. H. Permeability of the skin. **Physiol. Rev.**, Bethesda, MD, v. 51, p. 702-747, 1971.
- SCHOENFELD, N.; MAMET, R.; NORDENBERG, Y.; SHAFRAN, M.; BA-BUSHKIN, T. and MALIK, Z. Protoporphyrin biosynthesis in melanoma B16 cells stimulated by 5-aminolevulinic acid and chemical inducers: characterization of photodynamic inactivation. **Int. J. Cancer**, NY, v. 56, p. 106-112, 1994.
- SHANLEY, B. C.; NEETHLING, A. C.; PERCY, V. A. and CARSTENS, M. Neurochemical aspects of porphyria. Studies on the possible neurotoxicity of d-aminolaevulinic acid. **S. Afr. Med. J.**, Cape Town, v. 49, p. 576-580, 1975.
- SHIN, S. C.; CHO, C. W.; OH, I. J. Effects of non-ionic surfactants as permeation enhancers towards piroxicam from the poloxamer gel through rat skins. **Int. J. Pharm.**, Amsterdam, jul 17, v. 222 (2), p. 199-203, 2001.
- SHOKRI, J.; NOKHODCHI, A.; DASHBOLAGHI, A.; HASSAN-ZADEH, D.; GHAFOURIAN, T.; BARZEGAR JABALI, M. The effect of surfactants on the skin penetration of diazepam. **Int. J. Pharm.**, Amsterdam, oct 9, v. 228 (1-2), p. 99-107, 2001.
- SKIDMORE, R. A. Jr. and FLOWERS, F. P. Nonmelanoma skin cancer. **Medical Clinics of North America**, Philadelphia, v. 82 (6), p. 1309-1323, 1998.
- STELUTI, R.; DE ROSA, F. S.; COLLETT, J. H.; BENTLEY, M. V. L B. In vitro skin retention and permeation studies for 5-aminolevulinic acid: effect of a lipid penetration enhancer. **Eur. J. Pharm. Sci.**, v. 13 (Supp. 1), S132, 2001
- STENDER, I. M.; BECH-THOMSEN, N.; POULSEN, T. and WULF, H. C. Photodynamic therapy with topical aminolevulinic acid delays UV photocarcinogenesis in hairless mice. **Photochem. Photobiol.**, Oxford, v. 66 (4), p. 493-496, 1997.
- STENZL, A.; EDER, I.; KOSTRON, H.; KLOCKER, H. and BARTSCH, G. Electromotive diffusion (EMD) and photodynamic therapy with 5-aminolevulinic acid (delta ALA) for superficial bladder cancer. **J Photochem. Photobiol. B.**, Lausanne, Nov; v. 36 (2), p. 233-6, 1996.
- SURBER, C.; WILHELM, K. P. and MAIBACH, H. I. *In vitro* skin pharmacokinetics of acitretin: percutaneous absorption studies in intact and modified skin from three different species using different receptor solutions. **J. Pharm. Pharmacol.**, London, v. 43, p. 836-40, 1991.
- SVAASAND, L. O.; TROMBERG, B. J.; WYSS, M-T.; WYSS-DESSER-ICH, P.; TADIR, Y. and BERNS, M. W. Light and drug distribution with topically administered photosensitizers. **Lasers Surg. Med.**, NY, v. 18, p. 139-149, 1996b.
- SVAASAND, L. O.; WYSS, P.; WYSS, M.-T.; TADIR, Y.; TROMBERG, B. J. and BERNS, M. W. Dosimetry model for photodynamic therapy with topically administered photossensitizers. **Lasers Med. Sci.**, London, v. 11, 261-265, 1996a.
- SZEIMIES, R.M.; SASSY, T. and LANDTHALER, M. Penetration potency of topical applied 5-aminolevulinic acid for photodynamic therapy of basal cell carcinoma. **Photochem. Photobiol.**, Lawrence, v. 59 (1), p. 73-76, 1994.
- TANOJO, H. Fatty acids as enhancers of drug permeation across human skin. An integrated in vitro/in vivo study. **Tese de Doutorado**, Leiden University, Leiden, The Netherlands, 1996.
- TAYLOR, E. L. and BROWN, S. B. The advantages of aminolevulinic acid photodynamic therapy in dermatology. **J. Dermatol. Treat.**; London, v. 13, Suppl 1: S3-11, 2002.

- THISSEN, M. R. T. M.; NEUMANN, M. H. A.; SCHOUTEN, L. J. A systematic review of treatment modalities for primary basal cell carcinomas. **Arch. Dermatol.**, Chicago, v. 135, p. 1177-1183, 1999.
- THISSEN, M. R. T. M.; SCHROETER, C. A.; NEUMANN, H. A. M. Photodynamic therapy with delta-aminolevulinic acid for nodular basal cell carcinomas using a prior debulking technique. **Br. J. Dermatol.**, Oxford, v. 142, p. 338-339, 2000.
- TOUITOU, E. and ABED, L. The permeation behavior of several membranes with potential use in the design of transdermal devices. **Pharm. Acta Helv.**, Zurich, v. 60, p. 193-198, 1985.
- TOUITOU, E.; GODIN, B.; KARL, Y.; BUJANOVER, S.; BECKER, Y. Oleic acid, a skin penetration enhancer, affects Langerhans cells and corneocytes. **J. Control. Rel.**, Amsterdam, v. 80, p. 1-7, 2002.
- TREPTE, O.; ROKAHAR, I.; ANDERSON-ENGELS, S. and CARLSSON, K. Studies of porphyrin-containing specimens using an optical spectrometer connected to a confocal scanning laser microscope. **J. Microsc.**, Oxford, v. 126, p. 238-244, 1994.
- TSAI, J. C.; CHEN, I. H.; WONG, T. W. and LO, Y. L. In vitro/in vivo correlations between transdermal delivery of 5-aminolevulinic acid and cutaneous protoporphyrin IX accumulation and effect of formulation. **Br. J. Dermatol.**, Oxford, 2 May; v. 146 (5), p. 853-62. 2002.
- UEHLINGER, P.; ZELLWEGER, M.; WAGNIÈRES, G.; JUILLERAT-JEANNERET L.; VAN DEN BERGH, H. AND LANGE, N. 5 aminolevulinic acid and its derivatives: physical chemical properties and protoporphyrin IX formation in cultured cells. **J. Photochem. Photobiol. B: Biol.** v. 54: 72-80, 2000
- VAN DEN AKKER, J. T. H. M.; IANI, V.; STAR, W. M.; STERENBORG, H. J. C. M. and MOAN, J. Topical Application of 5-Aminolevulinic Acid Hexyl Ester and 5-Aminolevulinic Acid to Normal Nude Mouse Skin: Differences in Protoporphyrin IX Fluorescence Kinetics and the Role of the Stratum Corneum. **Photochem. Photobiol.**, Oxford, v. 72 (5), p. 681-689, 2000.
- VAN DEN AKKER, J. T. H. M.; IANI, V.; STAR, W. M.; STERENBORG, H. J. C. M. and MOAN, J. Systemic Component of Protoporphyrin IX Production in Nude Mouse Skin upon Topical Application of Aminolevulinic Acid Depends on the Application Conditions. **Photochem. Photobiol.**, Oxford, v. 75 (2), p. 172-177, 2002.
- VAN DER VEEN, N.; DE BRUIJN, H. S. and STAR, W. M. Photobleaching during and re-appearance after photodynamic therapy of topical 5-ALA-induced fluorescence in UVB-treated mouse skin. **Int. J. Cancer**, New York, v. 72, p. 110-118, 1997.
- VAN HAL., D. A.; JEREMIASSE, E.; JUNGINGER, H. E.; SPIES, F.; BOUWSTRA, J. A. Structure of fully hydrated human stratum corneum: a freeze-fracture electron microscopy study. **J. Invest. Dermatol.**, New York, v. 1996, p. 89-95, 1996.
- VIANNA, R. F. L.; COLLETT, J. H.; BENTLEY, M. V. L. B. Influence of cyclodextrin complexation on the in vitro permeation and skin metabolism of drugs. **Int. J. Pharm.**, Amsterdam, v. 200, p. 127-132, 2000.
- WAHLE, K. W. J. Fatty acid modification and membrane lipids. **Proc. Nutr. Soc.**, v. 42, p. 273-287, 1983.
- WALKER, R. B. and SMITH, E. W. The role of percutaneous penetration enhancers. **Adv. Drug. Delivery Rev.**, Amsterdam, v. 18, p. 295-301, 1996.
- WALTERS, K. A. Penetrations enhancers and their use in transdermal therapeutic systems, in: J. Hadgraft and R. H. Guy (Eds.). **Transdermal drug delivery:**

- development issues and researches initiatives.** Marcel Dekker, New York, p. 197-246, 1989.
- WANG, I.; BAUER, B.; ANDERSON-ENGELS, S.; SVANBERG, S. and SVANBERG, K. Photodynamic therapy utilising topical δ -aminolevulinic acid in non-melanoma skin malignancies of the eyelid and the periocular skin. **Acta Ophthalmol Scand.**, Hvidovre, v. 77, p. 182-188, 1999.
- WASHBROOK, R. & RILEY, P. A. Comparison of δ -aminolevulinic acid and its methylester as a inducer of porphyrin synthesis in cultured cells. **Br. J. Cancer**, Oxford, v. 75, n. 10, p. 1417-1420, 1997.
- WEBBER, J.; KESSEL, D. and FROMM, D. Side effects and photosensitization of human tissues after aminolevulinic acid. **J. Surg. Res.**, New York, v. 68, p. 31-37, 1997a.
- WEBBER, J.; KESSEL, D.; FROMM, D. On-line fluorescence of human tissues after oral administration of 5-aminolevulinic acid. **J. Photochem. Photobiol. B: Biol.**, Lausanne, v. 38, p. 209-214, 1997b.
- WERTZ, P. W. and DOWNING, D. T. Acylglucosylceramides of pig epidermis: structure determination. **J. Lipid Res.**, Bethesda, MD v. 24 (6), p. 753-758, 1983.
- WERTZ, P. W. and DOWNING, D. T. Stratum corneum: biological and biochemical considerations, in: Hadgraft, J., Guy, R. H. (eds): **Transdermal drug delivery: developmental issues and research initiatives.** New York, Marcel Dekker, 1989, p.1-22.
- WERTZ, P. W. The nature of the epidermal barrier: biochemical aspects. **Adv. Drug Deliv. Rev.**, Amsterdam, v. 18, p. 283-284, 1996.
- WOODHEAD, A. D.; SETLOW, R. B. and TANAKA, M. Environmental factors in non-melanoma and melanoma skin cancer. **J. Epidemiol.**, Tokyo, v. 9 (suppl 6), S 102-14, 1999.
- XIANG, W.; WEINGANDT, H.; LIESSMANN, F.; KLEIN, S.; STEPP, H.; BAUNGARTNER, R.; HILLEMANN, P. Photodynamic effects induced by aminolevulinic acid esters on human cervical carcinoma cells in culture. **Photochem Photobiol.**, Oxford, Oct; v. 74 (4), p. 617-23, 2001.
- YAMADA, M.; UDA, Y.; TANIGAWARA, Y. Mechanism of enhancement of percutaneous absorption of molsidomine by oleic acid. **Chem. Pharm. Bull.**, Tokyo, v. 35, p. 3399-3406, 1987.
- YAMANE, M. A.; WILLIAMS, A. C.; BARRY, B. W. Effects of terpenes and oleic acid as skin penetration enhancers towards 5-fluorouracil as assessed with time: permeation, partitioning and differential scanning calorimetry. **Int. J. Pharm.**, Amsterdam, v. 116, p. 237-251, 1995.
- YAMASHITA, F.; KOYAMA, Y.; KITANO, M.; TAKAKURA, Y.; HASHIDA, M. Analysis of in vivo skin penetration enhancement by oleic acid based on a two-layer diffusion model with polar and nonpolar routes in the stratum corneum. **Int. J. Pharm.**, Amsterdam, v. 117, p. 173-179, 1995.
- YAROSH, D. B. Liposomes in investigative dermatology. **Photodermatol Photoimmunol. Photomed.**, Copenhagen, v. 17 (5), p. 203-212, 2001.
- ZEITOUNI, N. C.; SHIEH, S.; OSEROFF, A. R. Laser and photodynamic therapy in the management of cutaneous malignancies. **Clin. Dermatol.**, New York, May-Jun; v. 19 (3), p. 328-38, 2001.
- ZHANG, L.; LINGNA, L.; ZILI, A.; HOFFMAN, R. M.; GUNTER, A. In vivo transdermal delivery of large molecules by pressure-mediated electroincorporation and electroporation: a novel method for drug and gene delivery. **Bioelectrochem. and Bioenerg.**, Lausanne, v. 42 (2), p. 283-292, 1997.

9- RESUMO

Na Terapia Fotodinâmica, (TFD) o ácido 5-aminolevulínico (5-ALA) aplicado topicamente é convertido, via ciclo heme, à protoporfirina IX (PpIX), um agente fotossensibilizante, o qual sob excitação com luz, pode induzir destruição tumoral. Devido a suas características hidrofílicas, o 5-ALA tem penetração limitada na pele. Este estudo propôs a otimização da TFD-5-ALA por misturas contendo ceramida + 5-ALA (ou seus derivados ésteres ALA n-hexil e ALA n-octil) ou pelo uso do promotor de penetração, o ácido oléico (AO). A ceramida não constituiu um bom adjuvante para o sistema proposto, pois houve uma redução na permeação bem como na retenção dos fármacos, através da pele, comparado ao controle. Para o tratamento adequado do câncer de pele, uma maior retenção cutânea é desejada, uma vez que a eficácia da TFD depende da concentração de PpIX no tecido alvo. A permeação *in vitro* do 5-ALA (1% p/p) foi realizada na presença do AO em diferentes concentrações (2,5%, 5,0 e 10,0% p/p) em propilenoglicol (PG), utilizando pele de orelha de porco. O fluxo *in vitro* de 5-ALA através da pele bem como sua retenção na [epiderme+ derme] após 12 horas foram aumentados (~ 2,4 e 2 vezes) respectivamente, com o AO a 10,0% (p/p) comparados ao controle 5-ALA (1,0% p/p) em solução de PG. Os estudos *in vivo* do acúmulo de PpIX induzida por 5-ALA foram feitos com as formulações de 5-ALA (1%) com diferentes concentrações de AO, em peles sadias de camundongos sem pêlo. A quantidade de PpIX determinada após 4 hs por extração química da PpIX dos tecidos, aumentou significativamente com as formulações contendo AO a 5,0% p/p (1,8 vezes) e 10,0% p/p (2,16 vezes), comparados a formulação controle. As formulações contendo 1,0% 5-ALA + 5,0% ou 10,0% AO foram avaliadas *in vivo* quanto ao acúmulo de PpIX por uma técnica não-invasiva, utilizando uma sonda de fibra óptica para as medidas espectrofluorimétricas, 4 hs após as aplicações. Neste caso, as concentrações de 5,0% e 10,0% AO puderam aumentar (3,5 e 5,6 vezes, respectivamente) a PpIX induzida por 5-ALA, comparadas ao controle. Então, a formulação de 1,0% 5-ALA + AO 10,0% foi submetida ao estudo cinético da PpIX na pele, mostrando um aumento na fluorescência desta no intervalo de tempo de 30 min a 8 hs após a aplicação, comparado ao controle. Pode-se concluir que 10,0% de AO provavelmente facilitou a penetração do 5-ALA na pele, levando a uma maior conversão deste a PpIX e, assim, a um maior acúmulo do fotossensibilizador, em um curto período após a aplicação da formulação, comparado ao controle. Os resultados *in vitro* e *in vivo* mostraram a potencialidade das formulações contendo AO na otimização da liberação cutânea do 5-ALA e acúmulo *in vivo* de PpIX na pele.

In photodynamic therapy (PDT), 5-aminolevulinic acid (5-ALA) applied topically is converted, via the heme cycle, into protoporphyrin IX (PpIX), a photosensitizing agent, which upon excitation with light can induce tumor destruction. Due to its hydrophilic characteristics, 5-ALA has limited penetration into the skin. This study has proposed the 5-ALA-PDT optimization by mixtures containing *ceramide* + 5-ALA (or its ester derivatives *ALA n-hexyl* and *ALA n-octyl ester*) or by using skin penetration enhancer, oleic acid (OA). The ceramide was not a good adjuvant for the proposed system, because there was a reduction as in the drugs permeation as in drugs retention through the skin, compared to the controls. For an appropriate skin cancer treatment, a higher skin retention is required, since the PDT efficiency depends on the PpIX concentration in the target tissue. The 5-ALA (1% w/w) *in vitro* skin permeation study was carried out in the presence of oleic acid (OA) in different concentrations (2.5%, 5.0% and 10.0% w/w) using porcine ear skin. The *in vitro* 5-ALA flux through the skin as well as its retention in the [epidermis+ dermis] after 12 hs were increased (~ 2.4 and 2 times) respectively, using 10.0% w/w OA compared to the control 5-ALA (1% w/w) in PG solution. *In vivo* studies of 5-ALA-induced PpIX accumulation were carried out with 1.0% 5-ALA formulations at different concentrations of OA, using healthy mice skin. The amount of PpIX determined after 4h by chemical extraction from the tissue, was significantly increased with the formulations containing OA 5.0 % w/w (1.8 times) and 10.0% w/w (2.16 times) compared to the control. 5-ALA formulations containing 5.0% or 10.0% w/w OA were evaluated for the PpIX accumulation by non-invasive technique, using an optical fibre probe for the spectrofluorometric measurement, 4 hours after application. In this case, 5.0% and 10.0% w/w OA concentrations could increase the PpIX induced by 5-ALA, 3.5 and 5.6 times respectively, compared to the control. Then, the formulation 1.0% 5-ALA + 10.0% OA was submitted to the PpIX kinetic study, showing increased fluorescence at the time interval 30 min to 8 hs after application, compared to the control. We can conclude that 10% w/w OA probably has facilitated the 5-ALA skin permeation, leading to a higher 5-ALA conversion to PpIX and then, a higher photosensitizer accumulation in a short time after formulation application, compared to the control. The *in vitro* and *in vivo* results showed the potentiality of formulations containing OA for optimizing the 5-ALA cutaneous delivery and *in vivo* PpIX accumulation in the skin.

“A ignorância gera mais freqüentemente confiança do que o conhecimento: são os que sabem pouco, e não aqueles que sabem muito, que afirmam de uma forma tão categórica que este ou aquele problema nunca será resolvido pela ciência”. (Charles Darwin)