

Iontoforese associada ao princípio ativo ácido ascórbico: Avaliação de difusão vertical “*in vitro*”

G. Sinigaglia²; L. Bresciani¹; J. A. F. Tassinary², E. Périco²; S. Stülp¹

¹ Centro de Ciências Exatas e Tecnológicas, Centro Universitário UNIVATES, 95900-000, Lajeado – RS, Brasil

² Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Centro Universitário UNIVATES, 95900-000, Lajeado – RS, Brasil

stulp@univates.br

(Recebido em 13 de dezembro de 2013; aceito em 02 de abril de 2014)

A iontoforese é um método de incremento de permeação de substâncias pela pele com a utilização de corrente contínua. Neste estudo, será abordado o princípio ativo ácido ascórbico, que possui efeitos fisiológicos importantes na pele, tais como a sua atividade antioxidante; é um importante cofator da produção de colágeno pelos fibroblastos e ainda atua como inibidor da melanogênese, proporcionando um clareamento de manchas. Foram realizadas aplicações de iontoforese *in vitro* em gel com hidroxietilcelulose associada ao princípio ativo ácido ascórbico 5% nos tempos de 0, 2, 5 e 10 minutos, sendo realizados para um grupo com aplicação da corrente e um grupo controle. A liberação, permeação e fluxo do ácido ascórbico foram avaliados por difusão vertical *in vitro* utilizando-se a célula do tipo Franz com membrana de acetato de celulose e biomembrana de muda de pele de cobra. Pode se observar que houve um incremento da liberação e fluxo do ácido ascórbico quando comparada à difusão passiva. O fluxo de ácido ascórbico através da membrana de acetato de celulose sem a aplicação de iontoforese foi de $5,1594 \mu\text{mol L}^{-1}\text{cm}^2 \text{h}^{-1}$ e com a aplicação da iontoforese o fluxo de ácido ascórbico aumentou para $16,7132 \mu\text{mol L}^{-1}\text{cm}^2 \text{h}^{-1}$. Já em termos de permeação, os valores de fluxo de ácido ascórbico obtidos foram de $1,8167 \mu\text{mol L}^{-1}\text{cm}^2 \text{h}^{-1}$ e $1,4516 \mu\text{mol L}^{-1}\text{cm}^2 \text{h}^{-1}$, para sistemas com e sem incidência de iontoforese, respectivamente, indicando que a iontoforese promove o incremento da permeação do princípio ativo ácido ascórbico.

Palavras- chave: iontoforese, ácido ascórbico, difusão

Iontophoresis associated with ascorbic acid: Evaluation of *in vitro* vertical diffusion

Iontophoresis is a method for increasing permeation of substances through skin using direct current. In this work, was studied the active ascorbic acid, which has important physiological effects on the skin, such as its antioxidant activity, is an important cofactor in the production of collagen by fibroblasts and also acts as an inhibitor of melanogenesis, providing a whitening of stains. Experiments were held *in vitro* iontophoresis and gel with hydroxyethylcellulose associated with ascorbic acid 5% during 0, 2, 5 and 10 minutes, in a group with current application and a control group. The release, permeation and flow of ascorbic acid in vertical diffusion was evaluated *in vitro* using a Franz cell, cellulose acetate membrane and *Boa constrictor* biomembrane. It can be seen that there was an increased release and flow ascorbic acid when compared to passive diffusion. The flow of ascorbic acid through the cellulose acetate membrane without the application of iontophoresis was $5.1594 \mu\text{mol L}^{-1}\text{cm}^2 \text{h}^{-1}$ and with application of iontophoresis, the flow of ascorbic acid increased to $16.7132 \mu\text{mol L}^{-1}\text{cm}^2 \text{h}^{-1}$. In terms of permeation, in the biomembrane, the flow was $1.8167 \mu\text{mol L}^{-1}\text{cm}^2 \text{h}^{-1}$ and $1.4516 \mu\text{mol L}^{-1}\text{cm}^2 \text{h}^{-1}$, in control system and in system with iontophoresis, respectively, indicating that iontophoresis promotes an increase on acid ascorbic permeation.

Keywords: iontophoresis, ascorbic acid, diffusion

1. INTRODUÇÃO

A pele é uma barreira mecânica que serve como proteção ao organismo, evitando a perda de líquidos, a entrada de micro-organismos e também a permeação de substâncias do exterior. A camada mais superficial da pele, a epiderme, é constituída de cinco camadas, das quais a que oferece maior resistência à permeação é a mais superficial delas, a camada córnea, também

chamada estrato córneo¹. Uma forma de incrementar a permeabilidade cutânea é a iontoforese. Este recurso terapêutico é utilizado há algum tempo, existem relatos da sua utilização desde o século XVIII. A iontoforese é um método de administração de substâncias pela pele com a utilização de corrente contínua. Esse método é também chamado de ionização, iontopenetração, dieletrólise e dieletroforese².

Há um interesse crescente na obtenção de um aumento de permeação de fármacos e compostos ativos através da pele porque, dessa forma, seria possível diminuir os efeitos colaterais gerados pelas vias clássicas (endovenosa e oral). Neste estudo, será abordado o princípio ativo ácido ascórbico, que possui efeitos fisiológicos na pele, como a sua atividade antioxidante, é também um importante cofator da produção de colágeno pelos fibroblastos e ainda atua como inibidor da melanogênese, proporcionando assim um clareamento de manchas³. O ácido ascórbico é um composto natural, encontrado em frutas cítricas e vegetais, e é amplamente pesquisado tanto farmacologicamente quanto para o desenvolvimento de novas drogas e produtos tópicos. É usado diretamente como agente terapêutico, além de matéria-prima para a síntese ou modelos de compostos farmacologicamente ativos. Assim, as plantas medicinais, as preparações fitofarmacêuticas e os produtos naturais isolados, contendo a vitamina C, são pesquisados e utilizados em todo o mundo e, dessa forma, representam um mercado que movimentará bilhões de dólares, tanto em países industrializados quanto em desenvolvimento⁴. Em termos práticos, a aplicação tópica de ácido ascórbico mostrou elevar de modo significativo os níveis cutâneos desta substância com a associação da iontoforese, em ensaios realizados *in vivo* em pele de ratos. O tratamento com ácido ascórbico tópico pode funcionar como fotoprotetor biológico de amplo espectro, retardando de forma significativa os danos causados pela radiação ultravioleta (UVA). A radiação UVA atinge preferencialmente as camadas mais profundas da pele (quando comparada à ultravioleta B - UVB). Como a exposição à radiação UVA resulta em alterações no fotoenvelhecimento, tal proteção é altamente desejável⁵.

Pode-se enfatizar que a promoção de permeação de fármacos pela pele através da corrente contínua pode levar à maior eficácia da liberação de ativos; ao aumento do fluxo ou retenção do mesmo; ao aumento da liberação localizada, tópica ou dos tecidos alvo através da pele; ou ainda à combinação das hipóteses citadas. Dessa forma, o objetivo deste estudo é a investigação e mensuração de permeação e liberação do ácido ascórbico 5% frente à aplicação de iontoforese *in vitro* para que, assim, possa ser avaliada a real eficácia do seu emprego terapêutico.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

Para a realização das análises foram preparadas amostras contendo ácido ascórbico (SIGMA-ALDRICH, grau de pureza $\geq 98\%$) 5% em meio gel hidroxietilcelulose (2%) manipulado em farmácia de manipulação. Este gel é utilizado para produzir formulações com diferentes viscosidades e sua capacidade de dissolução não é afetada pela presença de íons no sistema⁶.

As amostras foram analisadas com e sem a aplicação da iontoforese. O equipamento (Modelo AF5 da empresa Tone Derm) foi fornecido pelo laboratório do curso de Estética e Cosmética da Univates. O eletrodo utilizado nas análises é de carbono e os parâmetros foram: frequência de 600 Hz, intensidade 200 μA (calculada pela área do eletrodo de 0,4 cm^2) e tempos de 0, 2, 5 e 10 min de aplicação (Figura 1). Os tempos utilizados neste estudo estão de acordo com a prática clínica utilizada nos procedimentos de iontoforese *in vivo*, conforme literatura relacionada a esta área⁷.

As análises de liberação do ácido ascórbico foram realizadas em uma célula de difusão vertical tipo Franz, com solução receptora de água deionizada e álcool etílico 99,5% (Nuclear®) com proporção de 1:1, contendo uma membrana de acetato de celulose (Sartorius Stedim Biotech com porosidade de 0,45 μm e área de 7,06 cm^2) com a finalidade de separar o compartimento doador do receptor, ou seja, formar uma barreira não interferente a um fluido denominado receptor⁸. A célula de difusão foi introduzida em banho termostatizado (MA-184

MARCONI) à 37°C, simulando a temperatura corporal. Em contato com a membrana foi adicionado o agente acoplador, gel hidroxietilcelulose + ácido ascórbico 5%, conforme Figura 1.

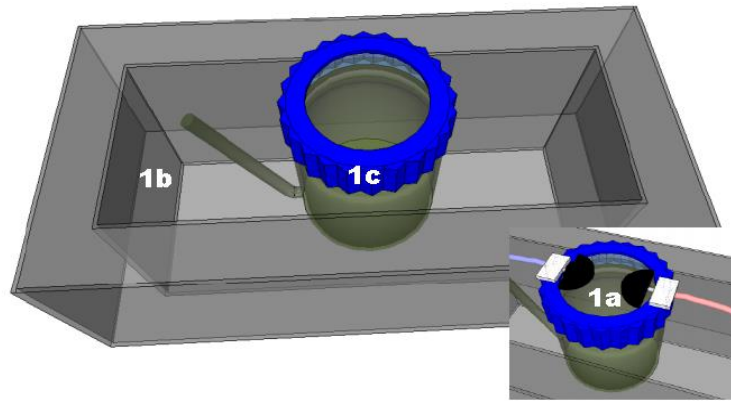


Figura 1: Aplicação da iontoforese “in vitro”: **1a**- Aplicação da iontoforese, eletrodos de carbono sobre o gel com hidroxietilcelulose e ácido ascórbico a 5%. **1b**- banho termostatizado a 37°C. **1c**-célula do tipo Franz com solução receptora água+ álcool 1:1.

Na avaliação da liberação, foram realizadas análises de varreduras espectrofotométricas (190 a 990 nm) de alíquotas retiradas da célula de difusão a cada 0, 2, 5 e 10 minutos, com e sem aplicação da iontoforese, para a verificação da presença do substrato na solução receptora. Os resultados foram obtidos através de um espectrofotômetro PerkinElmer UV/VIS Spectrometer Lambda 25. Os tempos de análise foram determinados em função de procedimentos da prática clínica.

Plotou-se os valores de absorvância obtidos no espectrofotômetro UV/Vis no comprimento de onda próximos a 250 nm para o ácido ascórbico em função das concentrações percentuais: $1,25 \times 10^{-4}$, $6,25 \times 10^{-5}$, $3,125 \times 10^{-5}$, $1,5625 \times 10^{-5}$ e $7,812 \times 10^{-6}$. Através destes valores obteve-se a curva de calibração e por meio desta foi possível determinar a concentração liberada para cada amostra analisada. A partir da concentração liberada também foi possível determinar o fluxo de liberação do ácido ascórbico em função do tempo.

Já os ensaios de permeação seguiram o procedimento acima descrito, utilizando nestas determinações biomembranas de muda de pele de cobra *Boa constrictor*, previamente hidratada⁹.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os testes “in vitro” permitem avaliar alguns fenômenos que ocorrem entre a aplicação do produto e o efeito de modo rápido e sem interferência de fatores biológicos, apesar de não simular a membrana biológica¹⁰. O método aprovado pela agência americana Food and Drug Administration (FDA) para testes de permeação e dissolução de preparações tópicas utiliza célula de difusão de Franz, que tem como maior vantagem a aplicabilidade das leis de Fick na sua forma mais simples¹¹.

Nos ensaios de liberação com membrana de acetato de celulose, através de varredura na faixa espectral (190-900 nm) foram considerados os valores próximos a 250 nm como a região de absorbância máxima, conforme se pode ver na Figura 2.

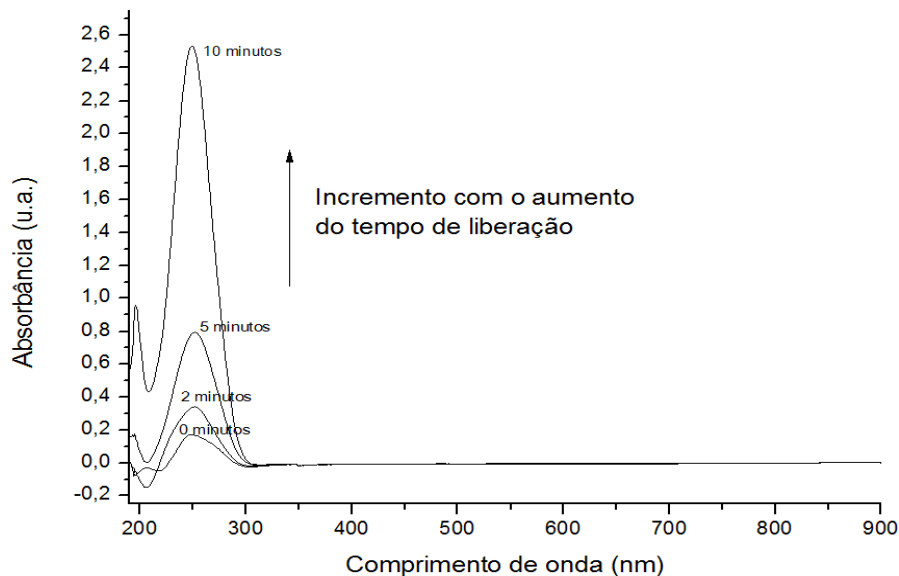


Figura 2: Varredura espectrofotométrica dos ensaios de difusão/liberação do ácido ascórbico 5%/gel com hidroxietilcelulose em $t = 0, 2, 5$ e 10 minutos, com aplicação de iontoforese

Os dados de absorbância apresentados na Figura 2 foram convertidos em dados de concentração por meio da utilização da curva analítica obtida ($y = -0,00174 + 1447,09603 \cdot x$, $R = 0,9984$). A difusão pode ser vista como um processo no qual a concentração tende a se igualar em todos os pontos do sistema com o passar do tempo. A análise da variação da concentração difundida através do tempo representadas nas figuras 3 e 4, baseada nas leis de Fick. O fluxo é definido, então, como a quantidade de massa (m) que passa através de uma área unitária (A) perpendicular à direção do fluxo (o fluxo é um vetor) por unidade de tempo (t)¹². As Figuras 3 e 4 representam a curva de liberação *in vitro* realizadas com membrana de acetato de celulose sem e com a aplicação de iontoforese, respectivamente.

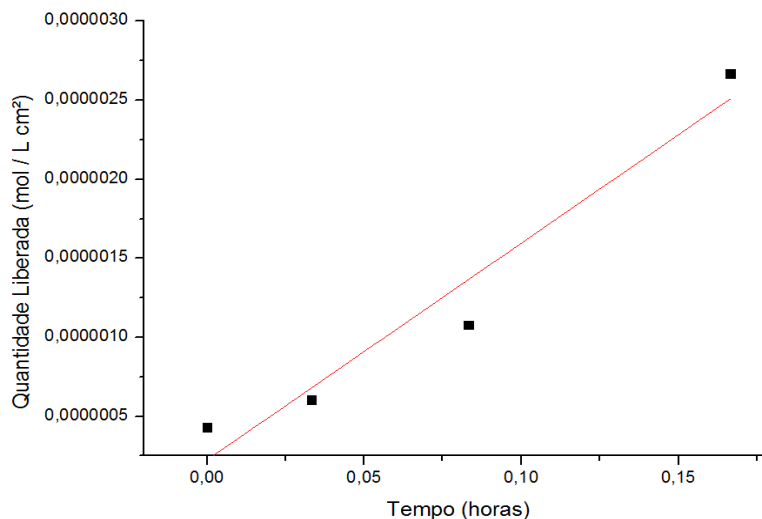


Figura 3: Liberação do ácido ascórbico nos tempos de 0, 2, 5 e 10 minutos sobre membrana de acetato de celulose, sem a aplicação de iontoforese in vitro.

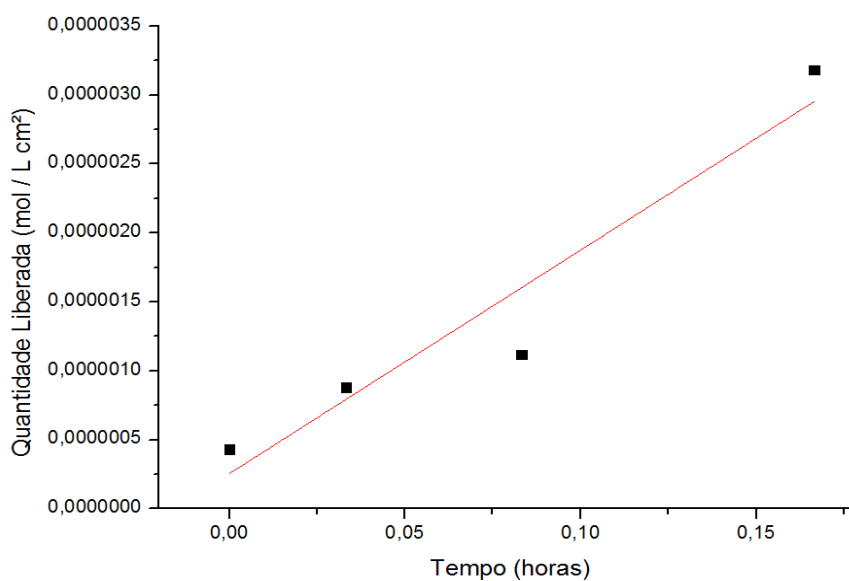


Figura 4: Liberação do ácido ascórbico nos tempos de 0, 2, 5 e 10 minutos sobre membrana de acetato de celulose, com aplicação de iontoforese in vitro

A partir das curvas apresentadas nas Figuras 3 e 4 é possível realizar a análise do fluxo de difusão pela área da membrana de acetato de celulose utilizada. O fluxo de ácido ascórbico através da membrana de acetato de celulose aumentou em função do tempo com a aplicação de iontoforese, como pode ser observado mais claramente na Figura 5.

Estes resultados corroboram com a literatura, na qual se percebe o incremento da liberação de ativos à medida que aumenta o tempo de exposição da corrente. Através do cálculo obtido com a construção da equação da reta do gráfico de liberação pode se afirmar que o fluxo de ácido ascórbico através da membrana de acetato de celulose sem a aplicação de iontoforese foi de $5,1594 \mu\text{mol L}^{-1}\text{cm}^{-2} \text{h}^{-1}$ e com a aplicação da iontoforese o fluxo de ácido ascórbico aumentou para $16,7132 \mu\text{mol L}^{-1}\text{cm}^{-2} \text{h}^{-1}$, sendo que estes resultados apresentaram variação com significância estatística ($p > 0,05$).

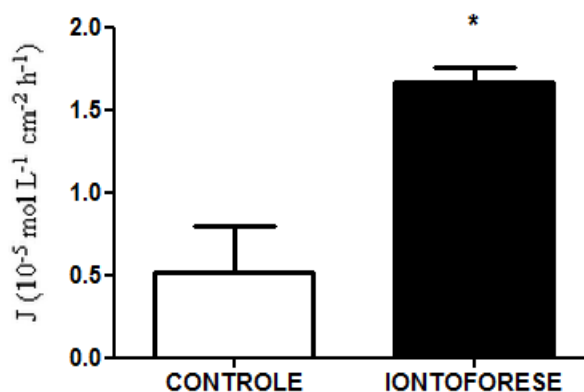


Figura 5: Gráfico comparativo do fluxo de ácido ascórbico 5% associado a gel com hidroxietilcelulose através da membrana de acetato de celulose, sem e com aplicação de iontoforese “in vitro”

Já para sistemas com biomembrana de pele de cobra, que simulam o estrato córneo humano, o fluxo obtido, para sistemas com e sem aplicação de iontoforese foi de $J = 1,8167 \mu\text{mol L}^{-1}\text{cm}^{-2} \text{ h}^{-1}$ e $1,4516 \mu\text{mol L}^{-1}\text{cm}^{-2} \text{ h}^{-1}$, respectivamente.

Comparando estes resultados com estudos prévios publicados¹³, verifica-se que em estudos associando iontoforese e ácido ascórbico, em pele de ratos⁵, somente 0,3% do princípio ativo estudado permeou, em associação à iontoforese, sendo que neste estudo os parâmetros estudados foram 10 V por 20 segundos e avaliação da quantidade de ácido ascórbico após 4 horas. Ainda, cabe mencionar que a pele de ratos possui pouca similaridade com a pele humana¹⁴, justificando o presente estudo onde a biomembrana de pele de cobra simula com maiores detalhes o estrato córneo humano. Já em outro trabalho publicado, onde o princípio ativo estudado foi o fosfato ascorbil-sódico, que devido as suas alterações estruturais, apresenta maior estabilidade em comparação ao ácido ascórbico¹⁵, para o tempo de aplicação de 30 minutos, aproximadamente 10% do princípio ativo foi difundido, em membranas celulósicas hidrofílicas¹⁶.

A permeação aumentada através da corrente elétrica dependerá do campo elétrico gerado e da duração da aplicação da iontoforese. Essa afirmação corrobora os achados no estudo, pois, à medida que aumentou o tempo de aplicação da iontoforese, aumentou a liberação de ácido ascórbico para o meio receptor¹⁷.

Pode-se citar, por exemplo, que a aplicação da corrente elétrica ocasionou uma queda na resistência da pele. Na pesquisa realizada por Oh et al.¹⁸, a mudança ocorreu em todas as aplicações realizadas, inclusive, nos 10 primeiros segundos do início do fluxo de corrente, o que seria uma justificativa para o comportamento do ativo ácido ascórbico após a aplicação da iontoforese.

O estrato córneo submetido à iontoforese tem a sua hidratação aumentada. Assim, a sua resistência à passagem da corrente diminui. Correntes de baixa frequência geram uma desestabilização do estrato córneo apenas no local onde são aplicadas¹⁹. Djabri et al.²⁰ confirmam que a utilização de mecanismos de corrente elétrica de baixa intensidade para a transferência transdermal de fármacos é eficaz, uma vez que a liberação ocorre de forma gradual e sem desconforto para o paciente.

Del Rio-Sancho et al.²¹ avaliaram o fluxo transdérmico do cloridrato de memantina, bem como sua permeação através de membrana de orelha de suíno, utilizando a célula de difusão vertical de Franz, e afirmam que a quantidade de fármaco retida aumentou logaritmicamente à

medida que aumenta o fluxo transdérmico da substância. Os autores citados obtiveram 0,559 mg/cm² na difusão passiva e 1,58 mg/cm² com a utilização da iontoforese, estes no período de 1 hora. A importância desse achado é justificada, pois o efeito reservatório poderia levar a uma acumulação do fármaco no estrato córneo quando aplicado topicamente sem a presença da iontoforese.

Ainda, um estudo realizado por Tomoda et al.²² afirma que a utilização combinada de fármaco cumarina 6 em forma de nanopartículas e iontoforese pode oferecer muitos benefícios, já que houve um aumento significativo de permeação quando comparado à difusão passiva.

4. CONCLUSÃO

O estudo realizado corrobora o que a literatura apresenta, uma vez que o aumento de liberação do ativo ácido ascórbico ocorreu de forma progressiva, conforme o aumento de tempo de exposição à corrente elétrica gerada pela iontoforese. O fluxo de ácido ascórbico através da membrana de acetato de celulose sem a aplicação de iontoforese foi de 5,1594 $\mu\text{mol L}^{-1}\text{cm}^2 \text{h}^{-1}$ e com a aplicação da iontoforese o fluxo de ácido ascórbico aumentou para 16,7132 $\mu\text{mol L}^{-1}\text{cm}^2 \text{h}^{-1}$. Já em termos de permeação, os valores de fluxo de ácido ascórbico obtidos foram de 1,8167 $\mu\text{mol L}^{-1}\text{cm}^2 \text{h}^{-1}$ e 1,4516 $\mu\text{mol L}^{-1}\text{cm}^2 \text{h}^{-1}$, para sistemas com e sem incidência de iontoforese, respectivamente.

5. AGRADECIMENTOS

Agradecemos ao Centro Universitário Univates e ao CNPq, pelo auxílio financeiro.

-
1. Guirro ECO, Guirro RRJ. *Fisioterapia Dermato-funcional*. 3. ed. São Paulo: Manole, 2002.
 2. Borges FS. *Dermato-funcional: modalidades terapêuticas nas disfunções estéticas*. São Paulo: Phorte, 2006.
 3. Dalcin KB, Schaffazick SR, Guterres SS. Vitamina C e seus derivados em produtos dermatológicos: aplicações e estabilidade. *Caderno de Farmácia*. 2003; vol. 19, n. 2: 52-60.
 4. Lima ALS, Lima KSC, Coelho MJ, Silva JM, Godoy RLO, Pacheco S. Avaliação dos Efeitos da Radiação Gama nos Teores de carotenóides, Ácido Ascórbico e Açúcares do Fruto Buriti do Brejo (*Mauritia flexuosa* L.). *Acta Amazônica*. 2009 set.; vol. 39, n. 3: 649-654.
 5. Ebihara M, Akiyama M, Ohnishi Y, Tajima S, Komata K, Mitsui Y. Iontophoresis promotes percutaneous absorption of L-ascorbic acid in rat skin. *Journal of Dermatological Science*. 2004 set.; vol. 32, n. 3: 217-222.
 6. Guo JH, Skinner GW, Harcum WW, Barnum PE. Pharmaceutical applications of naturally occurring water-soluble polymers. *Pharm. Sci. Technol. Today*. 1998 set.; vol. 1, n. 6: 254-261.
 7. Prentice WE, Araujo MAQ. *Modalidades terapêuticas em medicina esportiva*. 4. ed. São Paulo: Manole, 2002.
 8. Mota ACV, Volpato NM, Freitas ZMF, Santos EP. Estudo de liberação in vitro do filtro solar p-metoxicinamato de octila incluso em lipossoma e β -ciclodextrina. *Rev. Ciênc. Farm. Básica Apl.* 2008 set/dez.; vol. 29, n.3: 285-289.
 9. Dutra C, Bianchetti P, Stülpe S. Avaliação da difusão e permeação cutânea in vitro de acetato de hidrocortisona tópica comercial. *Scientia Plena*. 2013 out.; vol. 9, n. 10: 107202-1-7.
 10. Sato MEO, Gomara F, Pontarolo R, Andrezza IF, Zaroni M. Permeação cutânea In Vitro do ácido kójico. *Rev Bras Cienc Farm.* 2007 abr/jun.; vol. 43, n. 2: 195-203.

11. FDA guidance for Industry: dissolution testing of immediate release solid oral dosage forms, August 1997; extended release solid oral dosage forms: development, evaluation and application of in vitro/in vivo correlations, September 1997.
12. Netz PA, Ortega GG. Fundamentos de físico-química: uma abordagem conceitual para as ciências farmacêuticas. Porto Alegre: Artmed, 2002.
13. Kogan A, Garti N. Microemulsions as transdermal drug delivery vehicles. *Advances in Colloid and Interface Science*. 2006 nov.; vol. 123, n. 1: 369-385.
14. Gallarate M, Carlotti ME, Trotta M, Bovo S. On the stability of ascorbic acid in emulsified systems for topical and cosmetic use. *International Journal of Pharmaceutics*. 1999 out.; vol. 188, n. 2: 233-241.
15. Chorilli M, Tamascia P, Rossim C, Salgado HRN. Ensaios biológicos para avaliação de segurança de produtos cosméticos *Rev Ciênc Farm Básica Apl*. 2009 jan/abr.; vol. 30, n. 1: 19-30.
16. Spiclin P, Homar M, Zupančič-Valant A, Gašperlin M. Sodium ascorbyl phosphate in topical microemulsions. *International Journal of Pharmaceutics*. 2003 abr., vol. 256, n. 1-2: p. 65-73.
17. Li SK, Zhang Y, Zhu H, Higuchi WI, White HS. Influence of asymmetric donor – receiver ion concentration upon transcleral iontophoretic transport. *Journal of Pharmacological Science*. 2005 abr., vol. 94, n. 4: 847-860.
18. Oh S, Guy RH. Effects of iontophoresis on the electrical properties of human skin in vivo. *International Journal of Pharmaceutics*. 1995 set.; vol. 124, n. 1: 137-142.
19. Li SK, Molokhia SA, Jeong EK. Assessment of subconjunctival delivery with model ionic permeants and magnetic resonance imaging. *Pharmaceutical Research*. 2004 dez.; vol. 21, n. 12: 2175-2184.
20. Djabri A, Guy RH, Delgado-Charro MB. Transdermal iontophoresis of ranitine: an opportunity in paediatric drug therapy. *International Journal of Pharmaceutics*. 2012 out.; vol. 435, n. 1: 27-32.
21. Del Rio Sancho S, Serna-Jiménez CE, Calatayud-Pascual MA, Balaguer-Fernández C, Femenía-Font A, Merino V, López-Castellano A. Transdermal absorption of memantine - Effect of chemical enhancers, iontophoresis, and role of enhancer lipophilicity. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. 2012 set.; vol. 82, n. 1: 164-170.
22. Tomoda, K, Terashima H, Suzuki K, Inagi T, Terada H, Makino K. Enhanced transdermal delivery of indomethacin loaded PLGA nanoparticles by iontophoresis. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. 2011 dez.; vol. 88, n. 2: 706-710.