

# **Efeito do microagulhamento na retenção e permeação de ácido ascórbico em sistema de difusão vertical**

## **Microneedling effect on ascorbic acid release and permission in a vertical dysfunction system**

Camila Antunes<sup>1</sup> e João Alberto Fioravante Tassinari<sup>2</sup>.

<sup>1</sup>Centro Universitário Univates, Lajeado, RS, Brasil,  
<camilaantunes.ft@gmail.com>.

<sup>2</sup>Centro Universitário Univates, Lajeado, RS, Brasil,  
<tassinari@gmail.com>.

### **Resumo**

*Estudos demonstram que a administração transdérmica de princípios ativos terapêuticos oferecem muitas vantagens, pois utilizam a pele como via de entrada para substâncias que proporcionem benefícios em função de seus compostos. Sendo assim, justifica-se o interesse e o crescimento de pesquisas que visam a descobrir formas de quantificar e potencializar a permeação de substâncias na pele. O microagulhamento é uma dessas técnicas utilizadas recentemente, pois tem como objetivo a criação de microrupturas na pele, penetrando suas barreiras. O ácido ascórbico é um ativo farmacológico que, quando associado à técnica de microagulhamento, possui ação antioxidante, formadora de colágeno e inibidora da melanogênese. Sendo assim, o objetivo deste estudo foi verificar e analisar a retenção e permeação do Ácido Ascórbico 5%, associado ao microagulhamento em sistema de difusão vertical. Os resultados mostraram que as micropuncturas são efetivas no que diz respeito a ampliar a retenção do ativo em todas as camadas da pele no tempo de 30 minutos, entretanto, a permeação foi maior no grupo tratado em relação ou controle no tempo de 15 minutos.*

**Palavras-chave:** Ácido Ascórbico, Técnicas In Vitro, Microagulhamento.

### **Abstract**

*Studies demonstrate that the transdermal administration of therapeutic active ingredients offer many advantages once the skin is used as a gateway for substances that provide benefits depending on their compounds. This may justify the interest and the growth of researches that seek to discover ways to quantify and potentiate the permeation of substances in the skin. Microneedling is one of the techniques recently used since it aims to create microruptures in the skin, penetrating its barriers. Ascorbic acid is a pharmacological active that associated with the microneedle technique, has antioxidant, collagen-forming and melanogenesis inhibiting action. The objective of this study was, therefore, to verify and analyze the retention and permeation of 5% Ascorbic Acid associated to microneedling in a vertical dysfunction system. The results showed that micropunctures are effective in increasing the retention of the active in all the layers of the skin in the time of 30 minutes, however, the permeation was greater in the treated group in relation or control in the time of 15 minutes.*

**Keywords:** Ascorbic Acid, In Vitro Techniques, Microneedling.

## **1 Introdução**

A membrana cutânea e as estruturas anexas são os dois principais componentes do sistema tegumentar. A membrana cutânea, também conhecida como pele, é composta pela epiderme e, logo abaixo, a derme. Em seguida encontramos a hipoderme, a qual separa o tegumento dos tecidos e órgãos. A epiderme é subdividida em camada córnea, camada lúcida e granulosa. No estrato córneo na qual são encontrados os queratinócitos (MARTINI et al., 2013).

Dentre as inúmeras funções atribuídas ao sistema tegumentar na atualidade, destaca-se a possibilidade de constituir-se como via de entrada para substâncias terapêuticas. Entretanto, a eficiência na liberação, retenção e permeação através dessas camadas da pele podem ser percebidas como barreiras na entrega dos princípios ativos até o tecido alvo. Pensando nisso, estão sendo desenvolvidas diversas estratégias que venham a promover tal entrega com êxito, como, por exemplo, a iontoforese, a fonoforese, a eletroporação e o microagulhamento (BANGA, 2009).

Os pesquisadores Orentreich e Orentreith foram os pioneiros na pesquisa sobre a utilização de agulhas com o intuito de estimular a produção de colágeno. Atualmente tem sido proposta a utilização de microagulhas, gerando micropuncturas que atingem a derme, gerando sangramento, estímulo inflamatório e consequente produção de colágeno. A indução percutânea de colágeno (IPC) inicia com o atravessamento da barreira cutânea, visando a dissociação dos queratinócitos. Isto resulta na liberação de citocinas como a interleucina, o que gera vasodilatação dérmica e migração de queratinócitos para restaurar o dano (BAL, et al., 2008; FERNANDES, 2006).

A partir desta lesão controlada, investigações também tem demonstrado que a referida técnica pode ser usada no que diz respeito a ampliar a permeação transdérmica de princípios ativos (LIMA, et al., 2015)

O ácido ascórbico é estudado por ser precursor de processos químicos, biológicos e fisiológicos. Dentre os seus papéis no organismo, podemos relacionar suas ações com o sistema imune, formação de colágeno, absorção de ferro, entre outros. Este é um composto natural, que pode ser encontrado em frutas cítricas e vegetais (LIMA, ET AL., 2009).

Sendo assim, o objetivo deste estudo foi verificar e analisar a retenção e permeação do Ácido Ascórbico 5%, associado ao microagulhamento em sistema de disfunção vertical.

## **2 Metodologia**

Os ensaios experimentais foram realizados *in vitro* a partir de uma célula de difusão tipo Franz, sendo que as amostras utilizadas para a análise foram obtidas a partir do gel de hidroxietilcelulose associado ao princípio ativo ácido ascórbico 5%. O microagulhamento foi aplicado em biomembrana de pele de suíno sobreposto à referida célula, que posteriormente recebeu o ativo para avaliação de permeação e retenção nos tempos de 15 e 30 minutos.

## 2.1 Aplicação do microagulhamento *in vitro*

O aparelho de microagulhamento (FIGURA 1/A) utilizado para a pesquisa foi fornecido pela empresa Molior Ltda., sendo este de 0,50 milímetros. Cabe ressaltar que nos grupos tratados com microagulhamentos o rolo foi transpassado sobre a pele de suíno por 10 vezes, imediatamente antes da aplicação do ácido ascórbico, em diferentes direções (FIGURA 1/B), sendo elas na horizontal, vertical e diagonal direita e esquerda, conforme descrito por Doddaballapur (2009).



FIGURA 1/A: Aparelho de microagulhamento

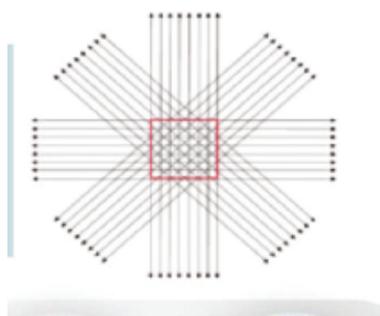


FIGURA 1/B: Direções da aplicação do microagulhamento

## 2.2 Análise da permeação do ácido ascórbico

O estudo da permeação do ácido ascórbico foi realizado a partir de uma célula de difusão vertical tipo Franz (FIGURA 2), com solução receptora seguindo os preceitos do FDA (*Food and Drug*

*Administration*), com água e álcool etílico 99,5% (Nuclear) 1:1. Com a finalidade de separar o meio doador do receptor, utilizou-se uma pele suína previamente preparada. É importante enfatizar que esta célula esteve em banho termostático, com água aquecida a 37°C, a fim de simular a temperatura corpórea; após, ela foi disposta sobre um agitador mecânico, pois dentro do compartimento receptor foi colocado um agitador magnético a fim de manter a homogeneidade da amostra.

Foram realizadas análises com e sem aplicação da técnica de microagulhamento, a partir de varreduras espectrofotométricas 190 a 990 nm, nos tempos de 15 e 30 minutos, em triplicata. A absorção do composto ocorre no comprimento de onda próximo a 254 nm como a região de absorbância máxima. Os ensaios foram obtidos por meio de um espectrofotômetro Cary 100 Bio UV/Vis.

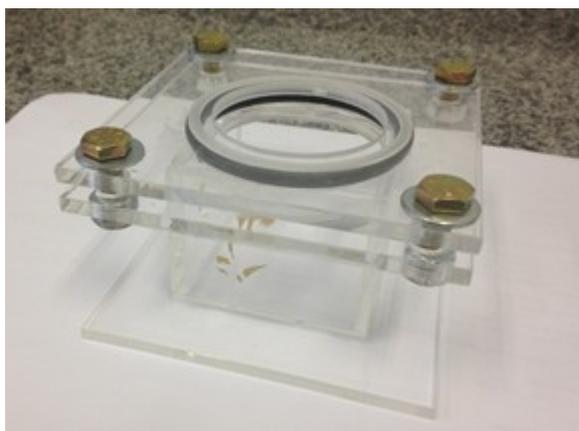


FIGURA 2: célula de difusão vertical tipo Franz

### **2.3 Análise de retenção ácido ascórbico através da biomembrana de pele de suíno**

Para detectar a retenção *in vitro* do ácido ascórbico foram utilizados os mesmos parâmetros da espectrofotometria supracitados, bem como respeitados os mesmos tempos e sistemática de difusão vertical.

No caso de retenção na epiderme, utilizou-se o sistema de 12 fitas de 3 cm de comprimento e 1 cm de largura, sendo que a primeira foi descartada e as outras 11 foram utilizadas para a realização da análise. Todas foram posicionadas no mesmo local, no qual há simulação de um processo de “depilação” para a retirada do extrato córneo. As fitas foram colocadas em um Becker, ao qual se misturou uma solução de 4 ml de metanol com água, posicionado no agitador magnético para manter a homogeneidade da amostra e, por fim expor, a um banho termostático com água aquecida a 37°C, durante 30 minutos (DE ROSA, ET AL., 2000).

Ainda na avaliação de retenção na derme e na epiderme, as amostras foram separadas e colocadas em distintos Beckers. Também se adicionou uma solução de 4 ml de metanol com água, que

em seguida foi posicionada sobre o agitador magnético e exposta ao banho termostatizado com água a temperatura corporal de 37°C, durante 30 minutos.

## 2.4 Procedimentos para análise dos dados

Os resultados foram expressos em média “±” de erro padrão da média (EPM). Para os parâmetros com dois grupos, foi utilizado o teste de *t* de *Student*. Em todos os casos os resultados foram considerados estatisticamente significativos quando  $p < 0,05$ . Todas as análises foram realizadas utilizando o *software* SPSS (*Statistical Package for the Social Sciences*) versão 18.0.

## 3 Resultados

Os resultados serão apresentados e discutidos seguindo a lógica da anatomia do sistema tegumentar, iniciando pela retenção no extrato córneo e seguindo pelo restante da epiderme e a derme, até chegar às análises de retenção.

Acompanhando a metodologia descrita, comparamos, em um primeiro momento, a retenção do ácido ascórbico no estrato córneo. Os resultados da figura 3 mostraram que não existe diferença em termos de retenção no extrato córneo no tempo de 15 minutos, entretanto, em 30 minutos o microagulhamento ampliou de 0,026 mg.L<sup>-1</sup> para 0,35 mg.L<sup>-1</sup> a retenção do ácido ascórbico.

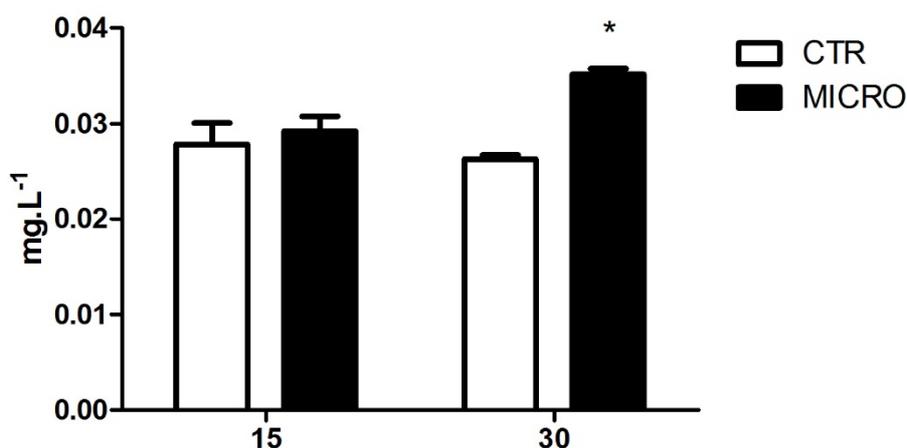


Figura 3 - Análise da retenção de ácido ascórbico no extrato córneo com e sem a utilização do microagulhamento nos tempos de 15 e 30 minutos. Dados expressos em ± SEM. \*  $p < 0,05$  vs controle.

O estrato córneo é parte mais externa da pele. Teoricamente, para que as substâncias terapêuticas cheguem ao seu tecido alvo, elas devem ultrapassar o estrato córneo e chegar com facilidade às estruturas adjacentes, ou seja, nas demais camadas da epiderme (basal, espinhosa e granulosa). Neste sentido, avaliamos a retenção do ácido ascórbico nestas estruturas com tempos de 15 e 30 minutos. Comparando o grupo microagulhamento com o grupo de controle, os resultados mostraram que a técnica foi efetiva apenas no tempo de 30 minutos, na qual a retenção do ativo foi de 0,11 mg.L<sup>-1</sup> para 0,23 mg.L<sup>-1</sup>.

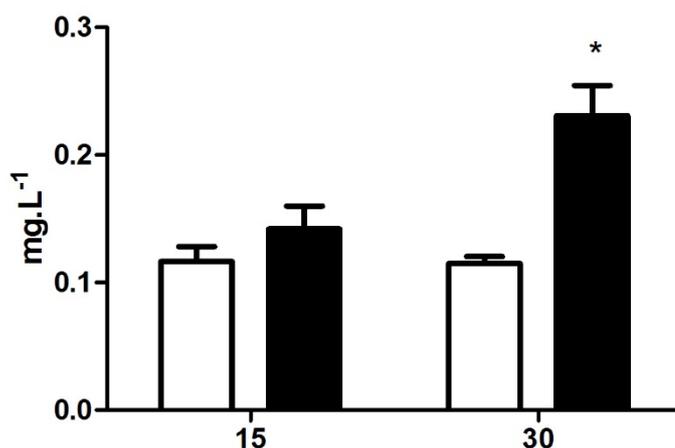


Figura 4 - Análise da retenção do ácido ascórbico na epiderme com e sem a utilização do microagulhamento nos tempos de 15 e 30 minutos. Dados expressos em  $\pm$  SEM. \*  $p < 0,05$  vs controle.

Um dos sítios alvos terapêuticos do ácido ascórbico é a derme, uma vez que o ativo tem atividade antioxidante, que se configura um papel importante da produção de colágeno por atuar como inibidor da melanogênese. Além disso, essa camada da pele é a última barreira para que as substâncias possam efetivamente permear. Avaliamos a retenção da molécula em estudo na derme; os resultados, conforme figura 5, seguiram a lógica dos demais ensaios de retenção supracitados, nos quais o tempo de 30 minutos proporcionou retenção média de 0,14 mg.L<sup>-1</sup> no grupo controle e de 0,29 mg.L<sup>-1</sup> no grupo tratado.

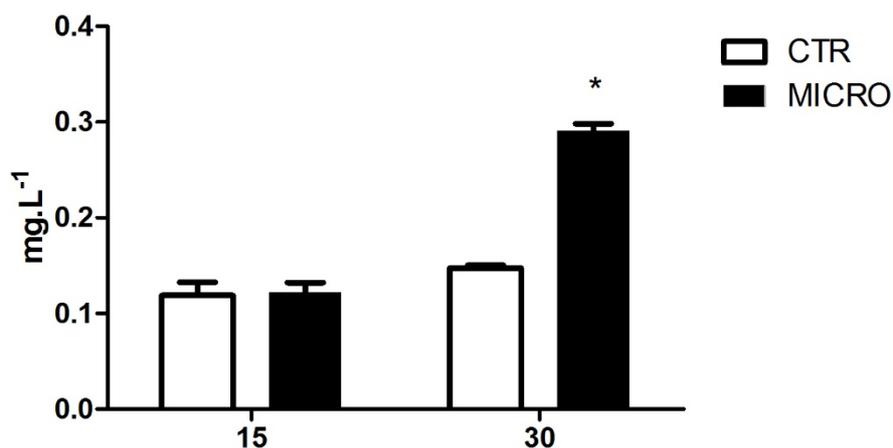


Figura 5 - Análise da retenção do ácido ascórbico na derme com e sem a utilização do microagulhamento nos tempos de 15 e 30 minutos. Dados expressos em  $\pm$  SEM. \*  $p < 0.05$  vs controle.

Por fim, avaliamos a permeação do ácido pela pele. Os resultados desta análise (FIGURA 5) mostraram que o microagulhamento foi eficaz em 15 minutos, quando o grupo de controle teve permeação de  $0,002 \text{ mg.L}^{-1}$  e no grupo tratado de  $0,004 \text{ mg.L}^{-1}$ , contudo, a mesma diferença não se manteve em 30 minutos.

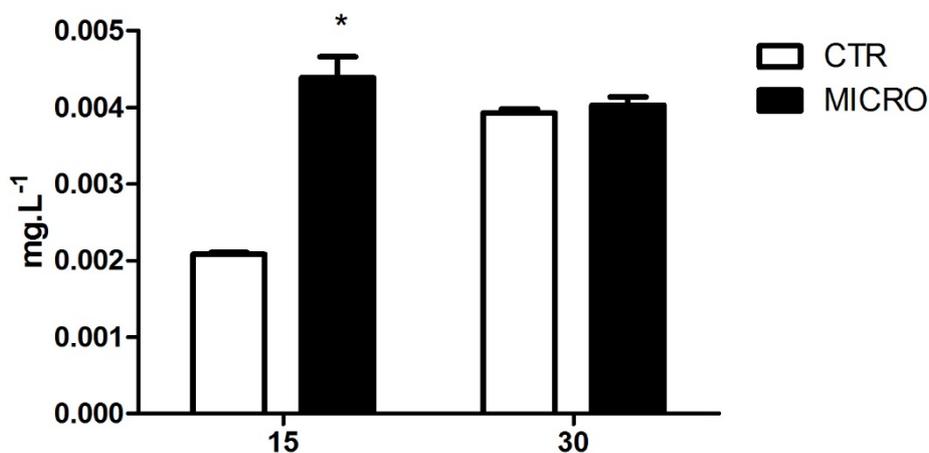


Figura 5 - Análise da permeação do ácido ascórbico com e sem a utilização do microagulhamento nos tempos de 15 e 30 minutos. Dados expressos em  $\pm$  SEM. \*  $p < 0.05$  vs controle.

Acreditamos que nossos resultados estão amparados em estudos que caracterizam as agulhas como recursos que têm a capacidade gerar, no sistema tegumentar, múltiplas micropuncturas longas o suficiente para atingir a derme, sendo estas capazes de facilitar a veiculação de ativos como, por exemplo, o retinol e a vitamina C (LIMA, ET AL., 2013). Cabe ressaltar que pontos obscuros se fazem presentes

nesta pesquisa, não existindo amparo na literatura para discutir o resultado não significativo de permeação em 30 minutos do ácido ascórbico no grupo tratado, uma vez que esta diferença se fez presente no tempo inicial. Sendo assim, mais investigações são necessárias, ampliando principalmente os tempos de análise.

### **Considerações Finais**

Os resultados demonstraram, que neste modelo experimental, o microagulhamento tem a capacidade de ampliar a retenção do ácido ascórbico no estrato córneo, na epiderme e na derme no tempo de 30 minutos após a aplicação da técnica em 97%, 209%, 207% respectivamente. Contudo, ainda se pode evidenciar, que a micropuntura tem a competência de ampliar a permeação do ativo para o meio receptor no tempo de 15 minutos quando comparado com o grupo controle em 200%, sendo que, esta diferença de incremento não se manteve no tempo de 30 minutos. Ressaltamos, que mais estudos devem ser realizados, no sentido de ampliar o entendimento do real efeito do microagulhamento na permeação e retenção do ácido ascórbico, principalmente a partir de maiores tempos de avaliação.

## Referências

- ALEXANDER A, et al. Approaches for breaking the barriers of drug permeation through transdermal drug delivery. *J. Control Release*. 2012;164(1):26-40.
- ALVES, N. C. Penetração de ativos na pele: revisão bibliográfica. *AMAZÔNIA: SCIENCE & HEALTH*, v. 3, n. 4, p. 36-43, 2015.
- ANDEGA, S.; KANIKKANNAN, N.; SINGH, M. Comparison of the effect of fatty alcohols on the permeation of melatonina between porcine and human skin. *Journal of Controlled Release*, v. 77, n. 1, p. 17-25, 2001.
- AUSTRIA, R., et al., Stability of Vitamin C Derivatives in Solution and Topical Formulations. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, v. 15, p. 795-801, 1997.
- MARTINI, F, et al. Anatomia e fisiologia humana. 1º ed. São Paulo: PEARSON, 2013.
- BAL, S. M., et al. In vivo assessment of safety of microneedle arrays in human skin. *Eur J of Pharm Sci*. v. 3, n. 35, p. 193-202, 2008.
- BANGA AK. Transdermal and intradermal delivery of therapeutic agents – application of physical technologies. New York: CRC Press; 2011.
- CHUNG, J. H.; et al. Regulations of Collagen Synthesis by Ascorbic Acid, Transforming Growth Factor- $\beta$  and Interferon- $\gamma$  in Human Dermal Fibroblasts Cultured in Three Dimensional Collagen Gel are Photoaging and Aging-Independent. *J. Dermatol. SCI.*, v. 15, p. 188-200, 1997.
- DA CUNHA, M. G., et al. Histological changes of collagen types after different modalities of dermal remodeling treatment: a literature review, *Surg Cosmet Dermatol*. v. 7, n. 4. p. 285-92, 2015.
- DALCIN, K. B., et al. Vitamina C e seus derivados em produtos dermatológicos: aplicações e estabilidade. *Caderno de farmácia – UFRGS*, v. 19, n. 2, p. 69-79, 2003.
- DE ROSA, F. S. et al. In vitro skin permeation and retention of 5-aminolevulinic acid ester derivatives for photodynamic therapy. *Journal of Controlled Release*, v. 89, p. 261 - 269, 2003.
- 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.
- ELDER, D. E. Histopatologia da Pele. 10º ed. Rio de Janeiro, 2011
- FABROCCINI G., FARDELLA N. Acne scar treatment using skin needling. *Clin Exp Dermatol*. v. 8, n. 34, p. 874-9, 2009.
- FERNANDES, D. Minimally invasive percutaneous collagen induction. *Oral Maxillofac Surg Clin North Am*. v. 1, n. 17, p. 51-63, 2006..
- FLYNN, T. C. et al. Topical Revitalization of Body Skin. *Eur. Acad. Dermatol. Venereol.*, v. 14, p. 280-284, 2000)
- GALLARATE, M., et al. On the Stability of Ascorbic Acid in Emulsified Systems for Topical and Cosmetic Use. *Int. J. Pharm.*, v. 188, p. 233-241, 1999.
- KALLURI H, BANGA AK. Transdermal delivery of proteins. *AAPS PharmSciTech*. 2011;12(1):431-41.

- LIMA, A. L. S., et al. Avaliação dos Efeitos da Radiação Gama nos Teores de carotenóides, Ácido Ascórbico e Açúcares do Fruto Buriti do Brejo (*Mauritia flexuosa* L.). *Acta Amazônica*. v. 39, n. 3: 649-654, 2009.
- LIMA, E. V. A., et al. Microneedling experimental study and classification of the resulting injury . *Surg cosmet Dermatol*. v. 5 (2), p. 110-114, 2013.
- LUPI, O.; BOLEIRA, M. *Dermatologia Fundamental*. 1 ed. Rio de Janeiro, 2013.
- PROW, T. W., et al. Nanoparticles and microparticles for skin drug delivery. *Adv Drug Deliv Rev*. 2011;63(6):470-91.
- SATO, M. E., et al. Permeação cutânea in vitro do ácido kójico. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*, v. 43, n. 2, 2007.
- SILVA, J. A., et al. Administração cutânea de fármacos: desafios e estratégias para o desenvolvimento de formulações transdérmicas. *Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada*, v. 31, n. 3, p. 125-131, 2010
- SINGH, A. et al. Microneedling: Advances and widening horizons. *Indian Dermatol Jornal*, v. 7, p. 244-54, 2016.
- SOARES, Margarida et al. Permeação cutânea: desafios e oportunidades. *Journal of Basic and Applied Pharmaceutical Sciencies*, v. 36, n. 3, 2016.
- SCHMOOK, F.P., et al. Comparison of human skin or epidermis models with human and animal skin in *in-vitro* percutaneous absorption. *Int. J. Pharm.*, Amsterdam, v.215, n.1/2, p.51-56, 2001.
- SPICLIN, P., et al. Stability of Ascorbyl Palmitate in Topical Microemulsions. *Int. J. Pharm.*, v. 222, p. 271-279, 2001.
- ZHANG, L., et al. Electroporation-Mediated Topical Delivery of Vitamin C for Cosmetic Applications. *Bioelectrochem. Bioenerg.*, v. 48, p. 453-461, 1999.
- WU, D., et al. Permeation of sumatriptan succinate across human skin using multiple types of self-dissolving microneedle arrays fabricated from sodium hyaluronate. *Journal of drug targeting*, p. 1-7, 2016.