

AVALIAÇÃO DA PERMEAÇÃO E DA RETENÇÃO DA CAFEÍNA ASSOCIADAS AO ULTRASSOM TERAPÊUTICO

João Alberto Tassinari¹, Laís Bresciani², Paula Bianchetti³, Claudete Rempel⁴, Bárbara Schmitt⁵, Simone Stülp⁶

Resumo: O ultrassom (US) terapêutico é empregado na prática clínica com a finalidade de promover analgesia e tratar lesões musculoesqueléticas e dos tecidos moles. A cafeína é um princípio ativo dermatológico que exerce ação no tecido adiposo subcutâneo, através da inibição da fosfodiesterase, tendo um efeito lipolítico. O objetivo deste artigo foi avaliar a permeação e a retenção da cafeína quando adicionada a um hidrogel, com e sem aplicação do US. As análises foram realizadas em uma célula de difusão vertical, com solução receptora de água e álcool etílico com proporção de 1:1, e uma biomembrana de muda de pele de cobra. Ocorreu permeação e retenção da cafeína *in vitro*, porém, quando associada ao US, a permeação foi maior. Foi concluído que há aumento na permeação e na retenção na biomembrana de cafeína com a aplicação do US terapêutico.

Palavras-chave: Ultrassom terapêutico. Cafeína. Permeação.

1 INTRODUÇÃO

O ultrassom (US) terapêutico é empregado na prática clínica há mais de 60 anos com a finalidade de promover analgesia e tratar lesões musculoesqueléticas e dos tecidos moles. É um dos recursos eletrofísicos mais utilizados na medicina regenerativa (ROBERTSON; BAKER, 2001).

A força acústica de baixa frequência também é utilizada na promoção do aumento da permeabilidade da pele, facilitando assim a permeação de macromoléculas, técnica esta denominada fonoforese ou sonoforese (KITCHEN, 2003).

É importante destacar que a onda sônica pode favorecer a liberação de ativos; o aumento do fluxo ou a retenção deste, o aumento da liberação localizada tópica ou em tecidos-alvo através da pele; ou ainda a combinação das hipóteses citadas. No entanto, essa liberação poderá promover efeitos tóxicos tanto intracelulares como extracelulares, caso não haja utilização adequada da quantidade do composto associado (ROGERO et al., 2003), ou ainda devido à ocorrência de alteração da estrutura química do composto (BIANCHETTI, et al. 2009).

1 Professor da Univates, Lajeado, RS, Brasil, tassinary@gmail.com.

2 Graduanda do curso de Química Industrial, Univates, Lajeado, RS, Brasil, laisbresciani@gmail.com.

3 Professora da Univates, Lajeado, RS, Brasil, paulab@univates.br.

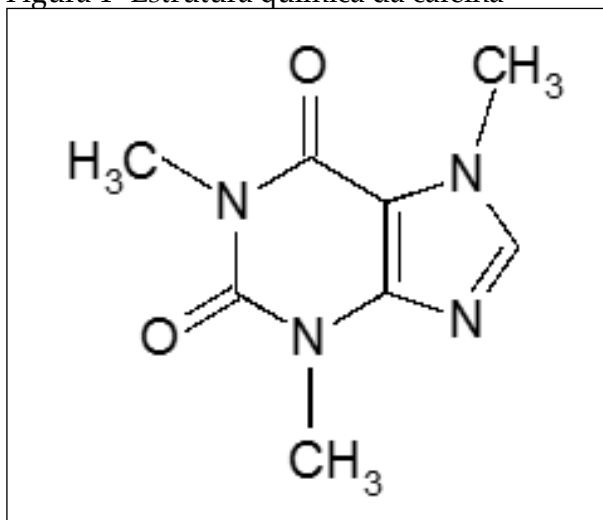
4 Professora da Univates, Lajeado, RS, Brasil, crempel@univates.br.

5 Graduanda do curso de Biomedicina, Univates, Lajeado, RS, Brasil, ba.schmit@gmail.com.

6 Professora da Univates, Lajeado, RS, Brasil, stulp@univates.br

A cafeína, caracterizada como um pó ou cristais brancos pouco solúveis em água (Figura 1), extraída da *Coffea arabica*, é umas das substâncias utilizadas associadas ao US terapêutico na técnica de fonoforese. Está entre as três metilxantinas de ocorrência natural farmacologicamente ativa e também pode ser encontrada em infusões (RANG, 2001).

Figura 1- Estrutura química da cafeína



A cafeína é um alcaloide do grupo das xantinas existente em alguns produtos alimentares como o mate, que apresenta, entre outras ações, atividade lipolítica (GOMES, 2009), e também ocasiona uma redução da espessura da hipoderme devido ao achatamento nos lóbulos de tecido adiposo (CHORILLI et al., 2005).

Em um ensaio clínico para o tratamento de pacientes com lombalgia e lombociatalgia agudas foi observada efetividade na utilização da cafeína na redução da dor lombálgica, apresentando assim ação analgésica (FILHO et al., 2006).

A cafeína é princípio ativo dermatológico que exerce ação no tecido adiposo subcutâneo, pela inibição da fosfodiesterase, apresentando assim ação lipolítica. Entretanto, para que a molécula ultrapasse a barreira córnea da pele, a principal barreira à permeação transcutânea, deve ser associada a promotores de absorção cutânea ou veiculada por lipossomas (RAMALHO; CURVELO, 2006). Pesquisa *in vitro* utilizando célula de difusão mostrou que o ultrassom acentua e acelera significativamente a permeação da cafeína através da pele. Análises histológicas da pele de suínos submetidas a diferentes tratamentos demonstraram que o ultrassom facilita a ação da cafeína, levando a uma redução significativa da espessura da hipoderme. Esta redução está relacionada a uma diminuição significativa no número de adipócitos presentes nessa região (CAMPOS, 2004).

O objetivo do trabalho foi avaliar a permeação e a retenção *in vitro* do princípio ativo cafeína, quando adicionado a hidrogel, com e sem aplicação do US terapêutico.

2 MATERIAL E MÉTODOS

Para a realização das análises foram preparadas amostras contendo cafeína 5 % adicionada a hidrogel condutor (MERCUR). As amostras foram analisadas com e sem aplicação do US terapêutico. O equipamento foi fornecido pela empresa DGM eletrônica Ltda. Os parâmetros utilizados foram:

modo contínuo, com frequência de 1 MHz, intensidade 1,0 W/cm² e tempo de 10 minutos de aplicação (FERNANDES; ALVES; SOUZA, 2003).

2.1 Análise da permeação da cafeína através da biomembrana de pele de cobra

As análises de permeação da cafeína foram realizadas em uma célula de difusão vertical sobre uma chapa agitadora (Velp Científica), com solução receptora de água e álcool etílico 99,5% (Nuclear) com proporção de 1:1.

Como barreira córnea foi utilizada uma biomembrana de muda de pele de cobra (*Boa constrictor*), por apresentar similaridade com o estrato córneo humano e facilidade de obtenção (NUNES et al., 2005), e tem por finalidade separar o compartimento doador do receptor (MOTA et al., 2008). As mudas de pele de cobra foram reidratadas por 72 horas em solução de azida sódica 0,002% em água destilada (MEGRAB; WILLIAMS; BARRY, 1995).

Em contato com a área da membrana (7,06 cm²) foi adicionado o agente acoplador hidrogel + cafeína 5 % e acima o transdutor do US terapêutico (ANTONIO, 2007; BABY et al., 2008). Após foram realizadas análises de varreduras espectrofotométricas (190 a 900 nm) de alíquotas retiradas da solução receptora após 10 minutos de exposição para a verificação da presença do substrato, com pico de absorvância máximo em 280 nm. Os resultados foram obtidos por meio da utilização de um Espectrofotômetro Cary 100 Bio UV/Vis.

Com a finalidade de determinar a concentração de cafeína permeada nas amostras analisadas a partir dos valores de absorvância obtidos, foi realizada uma curva de calibração a partir de soluções de cafeína em água e álcool etílico 1:1, com diferentes concentrações. A partir disso obteve-se a equação da reta, sendo que a curva obtida: $y = 2620.x - 0,004$ com $R = 0,976$.

2.2 Análise de retenção da cafeína

Para avaliação da retenção do princípio ativo, foram utilizadas as biomembranas de pele de cobra utilizadas na avaliação da permeação *in vitro* da cafeína sem a utilização do US, devidamente higienizadas. O excesso do agente acoplador foi removido primeiramente com água deionizada e após com álcool etílico. Em seguida as membranas foram fragmentadas e transferidas para um recipiente com solução de água deionizada e álcool etílico absoluto 99,5% (1:1). A solução foi exposta ao banho ultrassônico (Marconi, Ultrasonic Cleaner) por 40 minutos. Após foram retiradas alíquotas da solução e realizadas varreduras espectrofotométricas (190 a 900 nm) (BABY et al., 2008).

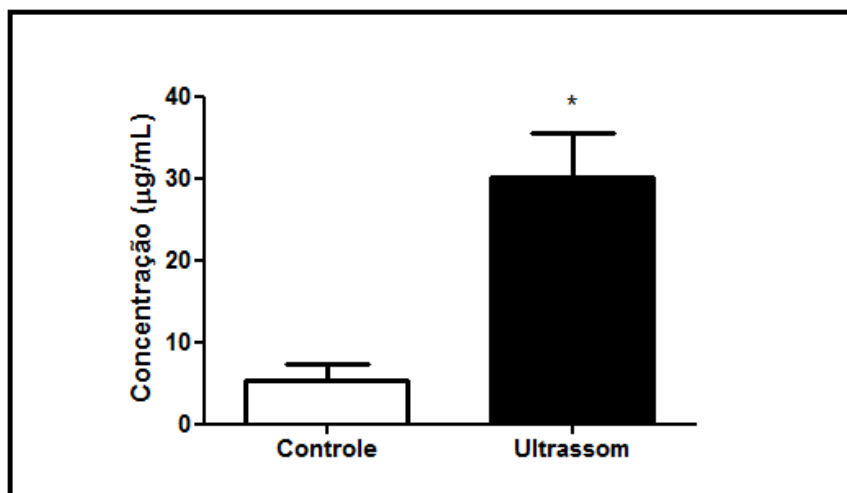
As amostras foram analisadas com e sem a aplicação do ultrassom terapêutico em triplicatas e os resultados são expressos em média \pm erro padrão da média (EPM). Na avaliação foi utilizado o teste t, com o auxílio do *software* Graphpad Prism®.

3 RESULTADOS E DISCUSSÕES

3.1 Análise de permeação da cafeína

A Figura 2 apresenta a avaliação da concentração permeada do Hidrogel + Cafeína 5 %, com e sem a aplicação do US terapêutico por 10 minutos. Verificou-se que, nas análises com a utilização do US terapêutico, há um aumento de permeação quando comparado com as análises sem aplicação do US.

Figura 2 – Concentração permeada do Hidrogel + Cafeína 5 % com e sem exposição ao US terapêutico no modo contínuo, em biomembrana de pele de cobra. Dados expressos em média \pm EPM. * $p < 0,05$ quanto ao grupo controle



Nos ensaios de permeação *in vitro* sem a aplicação do US terapêutico, a média de concentração de cafeína permeada através da biomembrana foi de 5,337 µg/mL. Para os ensaios com a aplicação do US terapêutico, a concentração média foi de 30,194 µg/mL. Houve permeação estatisticamente significativa maior no grupo que utilizou o US ($p < 0,05$) quando comparado com o grupo controle.

Os resultados apresentaram significância estatística de $p < 0,05$ avaliando o grupo controle em relação ao em que foi utilizado o US no tratamento.

Comparando os resultados encontrados com estudo realizado em Piracicaba/SP/BR (PIRES DE CAMPOS et al., 2007), observa-se que os valores estão de mesma ordem de grandeza, sendo estes dependentes da formulação que contém o princípio ativo, a membrana utilizada no estudo e o tempo de exposição.

Os resultados de permeação da cafeína *in vitro* evidenciam e corroboraram com a literatura, que sugere que inúmeros ativos são absorvidos lentamente pela pele e a vibração sonora de alta frequência tem a finalidade de acelerar esse processo (LOW, REED, 2001). Jesus et al. (2006) referem que a maioria das pesquisas tenta esclarecer o papel do ultrassom na permeação cutânea, dando ênfase para o efeito acelerador, diminuindo o tempo de aplicação do processo, mais do que aumentar a taxa de absorção. Referem ainda que os mecanismos pelos quais a fonoforese age não são muito claros, no entanto é possível verificar que o US terapêutico favorece a permeação cutânea de produtos farmacológicos e cosmeceuticos, devido aos seus efeitos térmicos e/ou mecânicos.

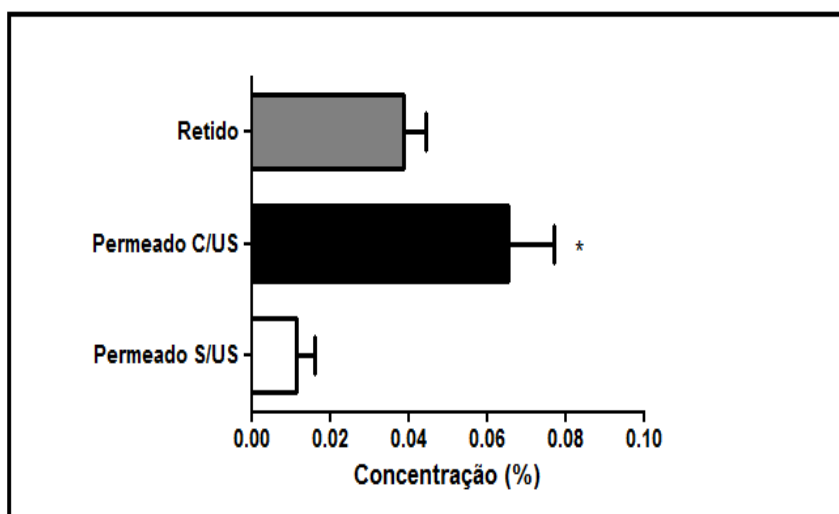
3.2 Análise de retenção da cafeína

Os resultados de permeação da cafeína *in vitro* utilizando biomembrana de muda de pele de cobra demonstraram resultados positivos principalmente quando associado à onda sônica terapêutica. No entanto, verificou-se que 17,8536 µg/mL de cafeína permaneceu retida no modelo de biomembrana. Logo, isso pode significar que há a permeação do princípio ativo durante um tempo mais prolongado, pois o ativo retido na biomembrana será permeado após o término da aplicação

do facilitador (US). Essa prática apresenta importância, pois há continuidade da permeação do ativo e assim maior tempo de ação deste no tecido-alvo, significando maior tempo de tratamento.

A Figura 3 apresenta a avaliação da concentração retida na biomembrana comparando com a concentração permeada do Hidrogel + Cafeína 5 %, com e sem a aplicação do US terapêutico por 10 minutos.

Figura 3 – Percentual permeado do Hidrogel + Cafeína 5 % com e sem exposição ao US terapêutico no modo contínuo e retido na biomembrana de pele de cobra. Dados expressos em média \pm EPM. * $p < 0,05$ quando comparado o grupo permeado com US com grupo sem US



Observa-se que a porcentagem de cafeína retida na biomembrana de pele de cobra, a partir do gel com adição de cafeína 5%, foi de 0,03867%, possibilitando que a permeação sem exposição ao US a passagem de 0,01156% do ativo para a solução receptora.

Quando aplicado o US sobre o hidrogel com adição de cafeína (5%), observou-se permeação de 0,06544% do composto. Assim, infere-se que o US terapêutico facilita a permeação do composto ativo, havendo um incremento em torno de 0,05% de cafeína na amostra em que foi utilizado o aparelho.

A relação da permeação sem a utilização do US com a retenção da cafeína na pele de cobra demonstra que há a presença do ativo na solução receptora. No entanto, sua porcentagem é menor do que a retida na biomembrana, em torno de 0,02% no tempo de 10 minutos. Isso possibilita elucidar que o ativo fica retido na membrana e possivelmente é liberado em função do tempo para a solução receptora, liberando assim cineticamente maiores quantidades de ativo na solução.

Estudos recentes de permeação cutânea da rutina tiveram resultados semelhantes. Baby et al. (2008) utilizaram muda de pele de cobra de *Crotalus durissus* como modelo de biomembrana alternativo e não evidenciaram a passagem da substância ativa para a fase receptora através do estrato córneo de *C. durissus*, porém verificaram a retenção da rutina no modelo de biomembrana. Assim, é possível constatar que a quantidade de cafeína liberada é maior que a de cafeína permeada, podendo esta diferença ser relativa à quantidade de cafeína retida na biomembrana de pele de cobra.

Montenegro e seus colaboradores (MONTENEGRO, 2007) pesquisaram a permeação cutânea da quercetina e seus ésteres de 3-oacila através da pele humana, verificando a passagem pela barreira

cutânea da quercetina. Importante relacionar que o período de tempo de realização do experimento é um fator de extrema relevância. O estudo sugere que o tempo de duração para o ensaio de difusão deve ser igual ou superior a 22 horas, pois somente a partir desse período houve a identificação e a quantificação da quercetina no fluido receptor das células de difusão utilizadas.

Logo, é de extrema importância a continuidade de estudos que relacionem a aplicação tópica da cafeína com e sem aplicação do US terapêutico, grau de permeação para a célula receptora e valores de retenção, sendo todas essas variáveis analisadas em função do tempo de contato do ativo com a biomembrana.

4 CONCLUSÃO

O estudo de permeação da cafeína permite avaliar que há aumento de permeação de cafeína para o sistema receptor devido à aplicação do US terapêutico, sendo este um aspecto positivo para aplicações fisioterapêuticas. A concentração permeada sem aplicação do US terapêutico foi de 5,337 µg/mL, sendo, com a aplicação do US terapêutico, a concentração permeada de 30,194 µg/mL. Ou seja, houve aumento de 24,857 µg/mL de cafeína permeada com a utilização do US terapêutico. No entanto, verificou-se que 17,854 µg/mL de cafeína permaneceram retidos no modelo de biomembrana. Isso pode significar que há a permeação do princípio ativo durante um tempo mais prolongado, pois o ativo retido na biomembrana será permeado após o término da aplicação do facilitador (US). Estudos posteriores são necessários para verificar se a atividade da cafeína é mantida após a ação da onda sônica, como, por exemplo, a atividade anti-inflamatória, e ainda estudos de toxicidade para avaliar possíveis ações tóxicas no organismo.

5 AGRADECIMENTOS

Ao CNPq pelo auxílio financeiro.

REFERÊNCIAS

ANTONIO, M.E.C.O. **Permeação cutânea *in vitro* como ferramenta auxiliar para o estudo de formulações semi-sólidas de cetoconazol para aplicações**. Dissertação de Mestrado. Departamento de Farmácia da Universidade Federal do Paraná – UFPR; 2007.

BABY, A.R.; HAROUTIOUNIAN FILHO, C.A.; SARRUF, F.D.; TAVANTE JÚNIOR, C.R.; PINTO, C.A.S.O.; ZAGUE, V. et al. **Estabilidade e estudo de penetração cutânea *in vitro* da rutina veiculada em uma emulsão cosmética através de um modelo de biomembrana alternativo**. Rev Bras Cienc Farm. 2008;44(2):233-248.

BIANCHETTI, P.; TASSINARY, J.A.F.; CERUTTI, D.G.U.; BARNES, D.; ETHUR, E.M.; STÜLP, S.. **Avaliação eletroquímica e espectrofotométrica de soluções de rutina submetidas a ultrassom terapêutico**. Revista Liberato. 2009;10(14):139-148.

CAMPOS, M.S.M.P. **Influencia do ultra-som na permeação cutanea da cafeina : estudo em fragmentos de pele e em adipocitos isolados de suínos**. Tese de Doutorado. Universidade Estadual de Campinas; 2004.

CHORILLI, M.; CARVALHO, L.S.; PIRES DE CAMPOS, M.S.M.; LEONARDI, G.R.; RIBEIRO, M.C.A.P.; POLACOW, M.L.O. **Avaliação Histológica da Hipoderme de Suínos Submetida a Tratamento Mesoterápico com Tiratricol, Cafeína e Hialuronidase**. Acta Farm Bonaerense. 2005;24(1):14 – 18.

- FERNANDES, M.A.L.; ALVES, G.E.S.; SOUZA, J.C.A. **Efeito do ultra-som terapêutico em tendinite experimental de eqüinos: estudo clínico, ultra-sonográfico e histopatológico de dois protocolos.** Arq Bras Med Vet Zootec. 2003;55(1).
- FILHO, R.J.G.; KORUKIAN, M.; SANTOS, F.P.E.; VIOLA, D.C.M.; PUERTAS, E.B.P.; **Ensaio clínico randomizado, duplo-cego, comparativo entre a associação de cafeína, carisoprodol, diclofenaco sódico e paracetamol e a ciclobenzaprina, para avaliação da eficácia e segurança no tratamento de pacientes com lombalgia e lombociatalgia agudas.** Acta Ortopédica Brasileira. 2006;14(1):11-16.
- GOMES, R.K. **Cosmetologia: descomplicando os princípios ativos.** São Paulo: Livraria Médica Paulista; 2009.
- JESUS, G.S.; FERREIRA, A.S.; MENDONÇA, A.C.; **Fonoforese x permeação cutânea.** Fisioterapia em Movimento. 2006;19(4): 83-88.
- KITCHEN, S. **Eletroterapia: prática baseada em evidências.** São Paulo; 2003.
- LOW, J.; REED, A. **Ultra-som terapêutico In: Eletroterapia Explicada Princípios e Prática.** 3. ed. São Paulo: Manole; 2001
- MEGRAB, N.A.; WILLIAMS, A.C.; BARRY, B.W. **Oestradiol permeation across human skin, silastic and snake skin membranes: the effects of ethanol/water co-solvent systems.** International Journal of Pharmaceutics. 1995;116:101-112.
- MONTENEGRO, L. et al. **In vitro evaluation of quercetin-3-O-acyl esters as topical prodrugs.** International Journal of Pharmaceutics. 2007;336(2):257 - 262.
- MOTA, A.C.V.; VOLPATO, N.M.; FREITAS, Z.M.F.; SANTOS, E.P. **Estudo de liberação in vitro do filtro solar p-metoxicinamato de octila incluso em lipossoma e â-ciclodextrina.** Rev Ciênc Farm Básica Apl. 2008;29(3):285-289.
- NUNES, R.S.; AZEVEDO, J.R.; VASCONCELOS, A.P.; PEREIRA, N.L. **Estudo da Padronização da Pele de Cobra Espécie - Boa constrictor - como Modelo de Estrato Córneo para Permeação de Fármacos.** Sci Plena. 2005;1(7):171-175.
- PIRES DE CAMPOS, M.S.M.; POLACOW, M.L.O.; GRANZOTTO, T.M.; SPADARI-BRATFISCH, R.C.; LEONARDI, G.R.; GGRASSI-KASSISSE, D.M. **Influence of the ultrasound in cutaneous permeation of the caffeine: in vitro study.** Pharmacologyonline. 2007;1:477-486.
- RAMALHO, A.T.; CURVELO, S. **Substâncias Cosmetologicamente Activas, Caracterização, Indicação, Eficácia e Segurança: Cafeína.** Revista Lusófona de Ciências e Tecnologias da Saúde. 2006;3(2):183-190.
- RANG, H.P. **Farmacologia Geral.** Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2001.
- ROBERTSON, V.J.; BAKER, K.G. **A Review of Therapeutic Ultrasound: Effectiveness Studies.** Physical Therapy. 2001;81(7):1339-1350.
- ROGERO, S.O.; LUGÃO, A.B.; IKEDA, T.I.; CRUZ, A.S. **Teste in vitro de Citotoxicidade: Estudo Comparativo entre Duas Metodologias.** Material Research. 2003;6(3):317-320.