

Quantificação de Ácido Kójico em Estudos de Permeação *in vitro*

Robson V.M. OLIVEIRA¹, Mitsuko T. OHARA²,
Marcos M. GONÇALVES¹ & Marta M.D.C. VILA^{1*}

¹ Curso de Farmácia, Universidade de Sorocaba, Rodovia Raposo Tavares km 92,5,
18023-000, Sorocaba, SP, Brasil.

² Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo,
Av. Lineu Prestes, Bloco 13A, Butantã, Cidade Universitária, São Paulo, SP, Brasil.

RESUMO. A eficácia de substâncias clareadoras, como o ácido kójico (AK), pode ser avaliada, em relação à capacidade de penetração, através de estudos de permeação, que necessitam de métodos de quantificação específicos. Neste trabalho, desenvolveu-se método espectrofotométrico para a quantificação do AK em solução salina. O comprimento de onda de máxima absorção foi 268 nm e a curva de calibração, apresentou-se linear na faixa de 0,05 a 4,00 µg/mL. O limite de detecção e quantificação foram 0,06 e 0,18 µg/mL, respectivamente. A precisão foi de 2,3 a 5,3% intra-dia, 1,6 a 5,4% inter-dia e exatidão de 98 a 101%.

SUMMARY. "Quantification of Kojic Acid *in vitro* Permeation Studies". The pigmentation-lowering agents efficacy, like kojic acid (KA), can be evaluated according to its penetration capacity, by permeation studies that need specific quantification methods. In this work, a spectrophotometric method have been developed for KA quantification in saline solution. The wave length of maximum absorbance was 268 nm and calibration curve was linear from 0.05 to 4.00 µg/mL. Detection and quantification limits were 0.06 and 0.18 µg/mL respectively. The precision was 2.3 to 5.3% intraday, 1.6 to 5.4% interday, and the accuracy was 98 to 101%.

INTRODUÇÃO

O ácido kójico (AK) é uma substância de origem natural, obtida a partir de processos fermentativos por fungos *Aspergillus* e *Penicillium*¹⁻⁶, amplamente utilizada como aditivo em alimentos e como ativo despigmentante em produtos de uso tópico^{1,7-9}. O AK é denominado quimicamente como 5-hidroxi-2-(hidroximetil)piran-4-ona, 5-hidroxi—hidroximetil-β-pirona, 5-hidroxi-2-(hidroximetil)-4H-piran-4-ona, ou hidroximetil-5-hidroxi-γ-pirona^{10,11}, sendo pertencente ao grupo dos ácidos fenólicos, com duas hidroxilas e, deste modo, dois prótons ionizáveis^{11,12} cuja fórmula estrutural está representada na Figura 1.

O mecanismo de ação dos clareadores envolve a inibição do processo enzimático-oxidativo da melanogênese, o desenvolvimento de atividade melanotóxica e degradação dos melanosomas. O mecanismo de ação do AK ocorre por inibição da melanogênese, através da quelatação

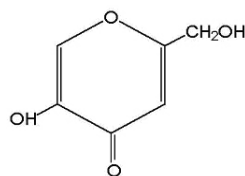


Figura 1. Fórmula estrutural do ácido kójico.

de íons Cu²⁺ necessários à atividade da enzima tirosinase^{8,13}.

Os produtos contendo clareadores são aplicados na pele para o tratamento de manchas hiperclorônicas devido à produção aumentada do pigmento melanina. A eficácia desses produtos está relacionada à capacidade de penetração dos princípios ativos, avaliada por métodos *in vitro* e *in vivo*.

Na determinação da capacidade de penetração empregando-se métodos *in vitro*, utilizam-se sistemas formados por dois compartimentos separados entre si por uma membrana semi-permeável, denominados células de di-

PALAVRAS-CHAVE: Ácido kójico, Espectrofotométrico, Estudos de permeação *in vitro*.

KEY-WORDS: Kojic acid, *In vitro* permeation studies, Spectrophotometry.

* Autor a quem correspondência deve ser enviada. E-mail: mmvila@terra.com.br

fusão ou de Franz ¹⁴. Em um compartimento aplica-se a formulação ou solução saturada do ativo, e no outro, um fluido capaz de manter a estabilidade da membrana e de solubilizar a substância em análise. A avaliação da penetração é efetuada através da quantificação de substâncias presentes em amostras retiradas do fluido receptor em intervalos de tempo regulares e determinação de curvas de liberação (quantidade em função do tempo) e parâmetros como fluxo (quantidade liberada por área de membrana pelo tempo) e permeabilidade (área de membrana permeada pelo tempo). Nesses estudos, o método de quantificação da substância em análise deve ser especificamente desenvolvido e validado, tendo-se em vista as condições experimentais tais como tipo de fluido receptor (composição, pH), temperatura, luz e duração do ensaio.

Na literatura são descritos alguns métodos para a análise do AK, entre os quais, métodos eletroquímicos ^{7,9}, cromatográficos, sobretudo a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) ^{3,15-17}, enzimáticos ¹⁸, imuno-enzimáticos ¹⁹ e espectrofotométricos ^{20,21}.

Métodos eletroquímicos, como o desenvolvido por Shih & Zen ⁹ embora de baixo custo e de fácil manuseio e com adequado limite de detecção (0,17 mM), podem sofrer interferência na presença de íons.

Os métodos cromatográficos ^{3,15-17} têm sido amplamente citados na análise de AK devido à excelente sensibilidade, entretanto a utilização de técnicas cromatográficas exige procedimentos pré-analíticos como extração, purificação pré-concentração, que muitas vezes tornam os procedimentos laboriosos.

Métodos imuno-enzimáticos ^{3,19} e enzimáticos ¹⁸ também têm sido aplicados na determinação de AK. São métodos que geralmente apresentam grande especificidade, no entanto, o uso de substâncias altamente purificadas, como as enzimas, pode elevar o custo analítico.

Métodos espectrofotométricos, em geral, podem sofrer interferências dos componentes como observado no trabalho de Gomara *et al.* ²⁰. Deste modo, Correr *et al.* ²¹ desenvolveram um método espectrofotométrico empregando processo de calibração multivariada para a eliminação de interferência advinda de matrizes.

O objetivo deste trabalho foi o desenvolvimento de um método analítico quantitativo que permitisse análise direta e uso de aparatos simples para a determinação de AK oriundo de ensaios de permeação *in vitro*, usados para ob-

tenção de valores de concentração necessários para os cálculos dos parâmetros de avaliação da penetração.

MATERIAL E MÉTODOS

O método proposto foi adaptado do trabalho de Majmudar *et al.* ¹⁵, procedeu-se à seleção do comprimento de onda ultravioleta, em seguida a construção da curva de calibração e a validação. Todos os reagentes utilizados foram de grau analítico e as soluções preparadas com água destilada e filtradas em membranas de 0,45 µm de porosidade. As soluções de AK foram mantidas a aproximadamente 15 °C, por período inferior a 8 h, em solução salina, pH 5.

O método de avaliação do poder de penetração do AK foi efetuado utilizando-se células de difusão vertical marca LOGAN modelo SDFC VTC-200, com membranas selecionadas e lavadas, obtidas a partir de mudas de pele de cobra *Crotalus durissus terrificus*, acopladas entre o compartimento doador e o receptor, sendo este preenchido com solução salina mantida a 34±2 °C e agitação de 100 rpm. As membranas foram pré-tratadas com solução aquosa de álcool isopropílico e propilenoglicol durante 1 h, e em seguida, após enxágüe com água destilada, receberam 1 mL da solução saturada AK. A partir daí e em intervalos de tempo subsequentes de 1,5 h foram retiradas alíquotas de 0,5 mL do compartimento receptor para quantificação espectrofotométrica do AK.

Soluções utilizadas

- Solução salina: cloreto de sódio 0,9% m/v.
- Solução despigmentante: AK 3,9% m/v.
- Solução para varredura no espectro (seleção do comprimento de onda): solução salina contendo 10 µg/mL de AK.
- Soluções para construção da curva de calibração: soluções salina contendo 0,05; 0,10; 0,20; 0,40; 0,60; 0,80; 1,00; 2,00 e 4,00 µg/mL de AK.
- Soluções aquosas de álcool isopropílico 71,25% e propilenoglicol 3,75% para pré-tratamento das membranas de muda de pele de cobra.

Curva de calibração

Para obtenção da curva de calibração foram feitas medidas de absorvância utilizando 6 replicatas de soluções padrão de AK de concentração entre 0,05 a 4,00 µg / mL com leitura em 268 nm. Determinou-se a equação da reta, o valor do coeficiente de correlação linear, desvio padrão e linearidade.

Parâmetros analíticos

Os parâmetros analíticos do método foram estipulados segundo critério descrito na norma RE nº 899 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) ²², com avaliação dos parâmetros linearidade, limite de detecção (LD), limite de quantificação (LQ), precisão e exatidão, observando-se as condições experimentais do estudo de permeação.

Para avaliação da linearidade da curva de calibração procedeu-se à comparação de variâncias ²³⁻²⁵, através do cálculo da razão entre as médias quadráticas da regressão (MQR) e médias quadráticas dos resíduos (MQR), e comparação com o valor da distribuição *F* tabelado, para o grau de confiança desejado (95%) com 1 e 7 graus de liberdade.

Com os valores de absorvância obtidos para 6 replicatas no intervalo de concentração de 0,2 a 1,0 µg/mL foram obtidos valores médios para cada concentração e seus desvios-padrão. A partir desses valores, calcularam-se o valor de absorvância médio da faixa de concentrações e também o desvio padrão médio (DP_{médio}), utilizados para a obtenção dos parâmetros limites de detecção (LD) e quantificação (LQ), através da relação entre esse valor e a inclinação (*a*) que foi obtida na reta de regressão (*y = ax + b*), usando o fator multiplicador apropriado ²², expresso nas equações [1] e [2].

$$LD = (DP_{m\u00e9dio} \times 3) / a \quad [1]$$

$$LQ = (DP_{m\u00e9dio} \times 10) / a \quad [2]$$

A precisão, expressa pela porcentagem do coeficiente de variação (CV%), foi calculada pela equação [3], a partir dos valores de concentração média e desvio-padrão (DP), sendo cada valor obtido através de três determinações em triplicata das concentrações teóricas (alta, média e baixa). Além disso, essas nove determinações foram efetuadas três vezes, sendo todas no mesmo dia e em dias diferentes, permitindo-se assim a análise das variações intra-dia e inter-dia, respectivamente. Os valores de concentração teórica utilizados foram de 0,2, 1,0 e 2,0 µg/mL de AK.

$$CV\% = (DP \times 100) / Conc. \text{ Média} \quad [3]$$

A exatidão, calculada pela equação [4], expressa a relação entre o valor médio obtido e o valor teórico calculado para cada uma das três concentrações (alta, média e baixa), equivalentes a 0,2, 1,0 e 2,0 µg/mL de AK.

$$Exatidão = (Valor \text{ médio obtido} \times 100) / Valor \text{ teórico} \quad [4]$$

Parâmetros de avaliação da penetração

Com os valores de absorvância obtidos nos vários intervalos de tempo de coleta de 0 até 22,5 h, efetuou-se o cálculo das concentrações de AK (µg) no fluido receptor para cada uma das quatro replicatas, e calculadas as médias das concentrações. Esses valores médios de concentração foram divididos pelo valor da área de membrana utilizada obtendo-se a quantidade liberada por área (µg/cm²). A curva de liberação da concentração de AK foi construída relacionando-se os valores de quantidade liberada por área pelo tempo (h), e determinada a reta de regressão e sua equação. O parâmetro fluxo (µg/cm²/h) foi estimado a partir do coeficiente angular da reta, e a permeabilidade (cmx10⁻⁴/h), pela divisão desse coeficiente pela concentração da solução de AK aplicada na membrana ²⁶.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A seleção do comprimento de onda foi feita por varredura do espectro de ultravioleta na faixa compreendida entre 200 a 350 nm com a finalidade de verificar qual o comprimento de onda de maior absorvância para a solução de AK 3,9% p/v em solução salina. Na Figura 2, pode-se verificar a presença de dois picos de absorção máxima de radiação ultravioleta, em 216 e 268 nm, para a solução de AK avaliada.

Embora o pico de absorção tenha sido menor para o comprimento de onda equivalente a

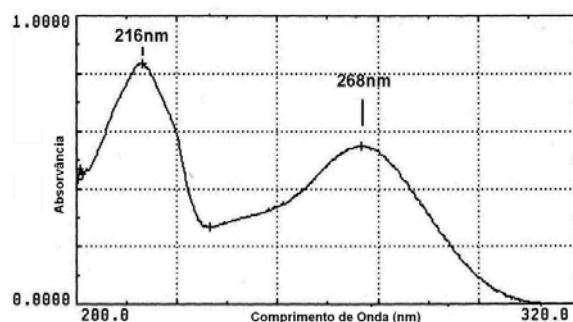


Figura 2. Espectro de absorção da radiação ultravioleta na solução de AK 10 µg/mL em solução salina.

268 nm, este foi selecionado porque apresenta maior seletividade de absorção em relação aquele de 216 nm, em que pode ocorrer absorção de interferentes como o cloreto de sódio, metilparabeno ²⁰, queratina e os outros contaminantes provenientes das membranas. Além dis-

so, esses possíveis interferentes, eventualmente lixiviados da muda de pele de cobra, foram eliminados através de tratamento prévio das membranas e também se procedeu à filtração das amostras em filtros de ésteres de celulose com 0,4 µm de porosidade, como comprovado através das análises realizadas com o branco. O comprimento de onda selecionado de 268 nm está próximo daqueles utilizados por Majmudar *et al.*¹⁵, Burdock *et al.*³ e Gomara *et al.*²⁰, em seus métodos de análise, respectivamente, 254, 267 e 269 nm.

A curva de calibração foi construída observando-se a faixa de concentração a ser detectada em experimentos de permeação do despigmentante. Empregou-se maior número de determinações para minimizar o erro devido à incerteza na estimativa da concentração, já que é um fator de influência²³. A reta de calibração obedece a equação: $y = 0,0579x - 0,0017$, onde, y = absorvância; x = valor da concentração de AK, em µg/mL e o coeficiente de correlação $r = 0,9973$.

Na análise da linearidade obtida, a razão das médias quadráticas da regressão pelas médias quadráticas dos resíduos, foi igual a 1304,4, sendo aproximadamente 180 vezes maior que o valor de F tabelado ($F_{\text{tab}} 1,7 = 5,59$), indicando linearidade da reta obtida.

Segundo Barros Neto *et al.*²⁵, a adequada linearidade pode ser confirmada quando se obtém uma razão de pelo menos 10 vezes o valor de F tabelado. Além disso, o coeficiente de correlação linear de 0,9973 também indica boa correlação entre os valores de concentração utilizados (0,05 a 4,00 µg/mL) e a absorvância.

Os parâmetros analíticos do método proposto considerados foram: limite de detecção e de quantificação, exatidão e precisão. Gomara *et al.*²⁰ no desenvolvimento de um método espectrofotométrico de quantificação de AK estudaram pH, temperatura de amostras e tempo de armazenamento como parâmetros de robustez. Estes autores verificaram que o AK não sofre influência do pH do meio em valores inferiores a 7 devido ao baixo grau de ionização. Além disso, as amostras de AK apresentaram-se estáveis até 8h, em temperatura não superior a 35 °C. No presente trabalho, foram respeitadas as condições adequadas para quantificação.

Os limites de detecção e de quantificação foram calculados considerando-se a faixa inferior da curva de calibração (concentrações de 0,20; 0,40; 0,60; 0,80 e 1,00 µg/mL) contemplando valores a serem obtidos nos experimentos de di-

fusão, para o qual o método foi desenvolvido. Foram obtidos os limites de detecção e de quantificação equivalentes a 0,06 e 0,18 µg/mL, respectivamente. Quando se compara o limite de detecção com valores obtidos da literatura em métodos que empregam a CLAE^{15,16,19} verifica-se que o método proposto apresenta resultados próximos. Outros métodos, além da CLAE também apresentaram limite de detecção adequado, como exemplo, o trabalho de Shih¹⁷ que analisou o AK proveniente de formulações, obteve o limite de detecção de 20 µg e o método eletroquímico proposto por Shih & Zen⁹ para a determinação do AK veiculado em formulações, que apresentou limite de detecção inferior ao proposto, equivalente a 0,17 µM (0,024 µg/mL).

A precisão foi calculada através do coeficiente de variação com os dados referentes às variações intra-dia e inter-dia (Tabela 1). A diferença entre os valores de coeficiente de variação intra-dia e inter-dia poder ser decorrente da forma de armazenamento e reconstituição da solução-mãe de AK, utilizada na execução do experimento, sendo esta sempre armazenada em geladeira e reconstituída com auxílio de banho de ultra-som até verificada completa dissolução. Nos experimentos intra-dia, o armazenamento ocorreu por no máximo 12 h, e naquelas inter-dia, por até 36 h.

Para a obtenção da precisão procedeu-se à repetição do método para concentrações pré-estabelecidas (ou teóricas), várias vezes no mesmo dia e também em dias diferentes, e calculou-se a média e desvio-padrão em relação às concentrações determinadas (ou calculadas). Esse parâmetro estima a dispersão das medidas, que incluem as variabilidades tanto decorrentes dos equipamentos e das condições nas quais foram utilizados, quanto dos operadores. Como o procedimento envolvido no método inclui diversas etapas, possíveis fontes de variação podem ser oriundas de pesagem da amostra, das diluições volumétricas e do instrumento analítico, embora as operações tivessem sido padronizadas e efetuadas sempre pelo mesmo analista. Para o método proposto, a precisão obtida esteve compreendida na faixa de 2,3 a 5,3%, para o coeficiente de variação intra-dia, e na faixa de 1,6 a 5,4%, para o coeficiente de variação inter-dia (Tabela 1). Somente os valores correspondentes às menores concentrações estiveram ligeiramente superiores aos padrões propostos pela literatura especializada, que estipula o máximo de 5%²¹. Contudo, segundo Cuadrado e

(n=9)	Concentração Teórica (µg/mL)		
	0,2	1,0	2,0
Dados de variação Intra-dia			
Concentração Média (µg/mL)	0,1961	1,0123	1,9607
Desvio-padrão	0,0104	0,0329	0,0441
CV% Intra-dia	5,3	3,3	2,3
Dados de variação Inter-dia			
Concentração Média (µg/mL)	0,1994	1,0017	1,9681
Desvio-padrão	0,0107	0,0159	0,0519
CV% Inter-dia	5,4	1,6	2,6
Exatidão			
Concentração Média (µg/mL)	0,1969	1,0121	1,9603
Desvio-padrão	0,0397	0,0622	0,0743
Exatidão (%)	98	101	98

Tabela 1. Valores de concentração média, desvio-padrão e coeficientes de variação (CV%) intra-dia, inter-dia e exatidão para o AK das soluções de concentrações teóricas de 0,2, 1,0 e 2,0 µg/mL (n = 9).

Forn ²⁷, o critério de aceitabilidade para precisão de bioensaios corresponde a $\pm 15\%$ do valor da concentração teórica para as concentrações baixa, média e alta, e desse modo, o método pode ser considerado preciso.

A exatidão do método espectrofotométrico foi calculada relacionando-se os valores determinados das médias de absorvância para as concentrações teóricas de 0,2, 1,0 e 2,0 µg/mL. Para o método proposto, obteve-se a exatidão entre 98 e 101% (Tabela 1), compatíveis com aqueles preconizados ou citados pela literatura especializada, entre $100 \pm 2\%$ ^{20,28}.

Os valores de concentração de AK foram utilizados para construção da curva de liberação do AK, que é utilizada para se avaliar o poder de penetração do AK nas membranas utilizadas nos experimentos (Figura 3). A equação da reta obtida apresentou a equação $y = 1,9194x + 1,7176$, com coeficiente de correlação igual a 0,9991. O parâmetro fluxo médio obtido foi igual a 1,919 µg/cm²/h, e estima a quantidade de AK que consegue atravessar a área da membrana em relação ao tempo. Nas membranas utilizadas, quando se aplicaram soluções de AK a 39 mg/mL, a permeabilidade média foi igual a $0,492 \text{ cm} \times 10^{-4}/\text{h}$.

CONCLUSÃO

O método proposto mostrou-se adequado para a quantificação do AK por espectrofotometria no ultravioleta a 268 nm, em solução salina nas concentrações acima de 0,18 µg/mL na faixa

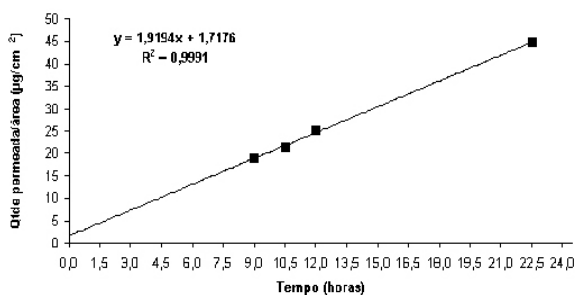


Figura 3. Curva de liberação, equação da reta e coeficiente de correlação do AK obtidos nos ensaios de difusão (n=4).

de 0,20 a 4,00 µg/mL, com as vantagens do uso de aparelhagem simples, de baixo custo. Além disso, o método desenvolvido foi adequado para a determinação dos parâmetros indicadores do poder de penetração do AK *in vitro*.

Agradecimentos. Ao Departamento de Produção e Controle de Fármacos e Medicamentos da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo, onde este trabalho foi realizado.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Dowd, P.F. (1988) *Pestic. Biochem. Physiol.* **32**: 123-34.
2. Wei, C. I., T.S. Huang, S.Y. Fernando & K. T. Chung (1991) *Toxicol. Lett.* **59**: 213-20.
3. Burdock, G. A., M. G. Soni, M. G. & I. G. Carabini (2001) *Regul. Toxicol. Pharmacol.* **33**: 80-101.

4. Futamura T., M. Okabe, T. Tamura, K. Toda, T. Matsunobu, T. & Y.S. Park (2001) *J. Biosci. Bioeng.* **3**: 272-6.
5. Nohynek, G.J., D. Kirkland, D. Marzin, H. Toutain, C. Lecler-Ribaud & H. Jinnai (2004) *Food Chem. Toxicol.* **42**: 93-105.
6. Zborowski, K., R. Grybos & L.M. Proniewicz (2003) *J. Mol. Struct.* **630**: 87-100.
7. Vachakova, A., J. Bransova, J. Brtko, M. Uher & L. Novotny (1996) *Neoplasma* **43**: 265-9.
8. Cabanes, J., S. Chazarra & F. Garcia-Carmona (1994) *J. Pharm. Pharmacol.* **46**: 982-5.
9. Shih, Y. & J. Zen (1999) *Electroanalysis* **11**: 229-33.
10. Lokaj, J., J. Kozisek, B. Koren, M. Uher & V. Vrabec (1991) *Acta Crystallogr., Sect. C: Cryst. Struct. Commun.* **1**: 193-4.
11. "The Merck Index: an encyclopedia of chemicals, drugs, and biomedical" (2001) 13th ed. Merck & Co, Whitehouse Station, págs. 131, 440, 951.
12. Maeda, K. (1997) *Fragrance J.* **25**: 10-8.
13. Son, S.M., K.D. Moon, C. Lee (2001) *Food Chem.* **73**: 23-30.
14. Franz, T.J., P.A. Lehman & E.L. McGuire (1993) "In vivo methods for the assessment of percutaneous absorption in man", en Zats, J.L. "Skin Permeation: fundamentals and application", Weaton, Allured, Vol. 2, págs 73-92.
15. Majmudar, G., G. Jacob, Y. Laboy, & L. Fisher (1998) *J. Cosmet. Sci.* **49**: 361-7.
16. Huang, S. C., C.C. Lin, M.C. Huang & K.C.J. Wen (2004) *Food Drug Anal.* **12**: 13-8.
17. Shih, Y (2001) *J. AOAC Inter.* **84**: 1045-9.
18. Streffer K., H. Kaatz, C.G. Bauer, A. Makower, T. Schulmeister, F.W. Scheller, M.G. Peter & U. Wollernberger (1998) *Anal. Chim. Acta* **362**: 81-90.
19. Nakajima, M., I. Shinoda, Y. Fukuwatari & H. Hayasawa (1998) *Pigm. Cell Res.* **11**: 12-7.
20. Gomara, F. L., C.J. Correr, M.E.O. Sato & R. Pontarolo (2004) *Ars Pharm.* **45**: 145-153.
21. Correr, C.J., G. Cordeiro, J. Gaspareto, P. Peralta-Zamora & R. Pontarolo (2005) *Acta Farm. Bonaerense* **24**: 416-20.
22. Brasil, Agência Nacional de Vigilância Sanitária (2003) Resolução RE nº 899 de 29 de maio de 2003. Diário Oficial da União, Brasília.
23. Pimentel, M.F. & B. Barros Neto (1996) *Quim. Nova* **19**: 268-77.
24. Chui, Q.S.H., R. Zucchini & J. Lichtig (2001) *Quim. Nova* **24**: 374-80.
25. Barros Neto, B., I.S. Scarminio & R.E. Bruns (2003) "Como fazer experimentos: pesquisa e desenvolvimento na ciência e na indústria", Unicamp, Campinas, págs 201-49.
26. Narishetty, S.T.K. & R. Panchagnula (2004) *J. Control. Release* **95**: 367-79.
27. Cuadradro, J.A.P. & M.P. Forn (2001) "Validación de métodos analíticos". Asociación Española de Farmacéuticos de la Industria, Barcelona, pág. 230.
28. Shabir, G.A. (2003) *J. Chromatogr. A* **987**: 57-66.