

COMPORTAMENTO ELETROQUÍMICO E AVALIAÇÃO DA DIFUSÃO *IN VITRO* DO α -TOCOFEROL ASSOCIADO À IONTOFORESE

Elisa Paludo^a, Laís Bresciani^b, Maurício Hilgemann^b, João Alberto Tassinari^a e Simone Stülp^{b,*}

^aCentro de Ciências Biológicas e da Saúde, Centro Universitário UNIVATES, Av. Avelino Tallini, 171, 95900-000 Lajeado – RS, Brasil

^bCentro de Ciências Exatas e Tecnológicas, Centro Universitário UNIVATES, Av. Avelino Tallini, 171, 95900-000 Lajeado – RS, Brasil

Recebido em 26/03/2014; aceito em 10/07/2014; publicado na web em 27/08/2014

ELECTROCHEMICAL BEHAVIOR AND EVALUATION OF DIFFUSION *IN VITRO* OF ACTIVE α -TOCOPHEROL ASSOCIATED WITH IONTOPHORESIS. Iontophoresis is a method of administering substances through the skin, which uses electrical current or potential to promote transdermal delivery. We focused on α -tocopherol (vitamin E), a natural antioxidant able to reduce or block the oxidation reactions induced by free radicals in biological membranes. The aim of this study was to perform electrochemical evaluation and analysis of vertical diffusion of gel + α -tocopherol undergoing iontophoresis. The results showed a reduction in peak current at 0.78 V of α -tocopherol molecules when subjected to iontophoresis, increasing the diffusion and degradation of the system.

Keywords: iontophoresis; α -tocopherol; electrochemical analysis.

INTRODUÇÃO

Nas últimas décadas, em função de alterações ambientais, como a depleção de ozônio,¹ a exposição solar, e por consequência, a incidência à radiação UV, têm aumentado na superfície terrestre. Em decorrência desse efeito, danos ao organismo,² à pele, envelhecimento precoce e fotoenvelhecimento têm sido relatados, sendo que, em alguns casos, sua relação com efeitos radiculares é comprovada.³

Com o intuito de inibir ou amenizar efeitos do fotoenvelhecimento, tratamentos^{3,4} têm sido utilizados como prevenção ou atenuação dos efeitos da exposição à radiação UV/solar. Dentre estes tratamentos, podem ser citados o uso de fotoprotetores, de compostos reativos com o oxigênio, além de aplicações de laser, toxinas botulínicas, dentre outras.

Antioxidantes têm sido utilizados como tratamento do fotoenvelhecimento,⁴ sendo que as Vitaminas C e E merecem destaque em estudos e aplicações *in vivo*, em medicamentos e preparações cosméticas. Em relação à Vitamina E, esta pode atuar como antioxidante e pró-oxidante,⁵ sendo a ação pró-oxidante inibida pela ação da Vitamina C, atuando como co-antioxidantes.

Naturalmente, a Vitamina E compreende oito diferentes formas,⁶ dentre elas o α e o δ -tocopherol. Na Figura 1 tem-se a estrutura do α -tocopherol, um dos compostos da Vitamina E.⁷

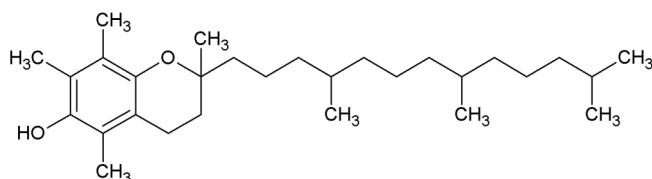


Figura 1. Estrutura química do α -tocopherol

A ação do α -tocopherol, isoladamente ou associado a outros compostos,⁸ tem demonstrado efeitos positivos em relação à proteção à

exposição solar e proteção de doenças, incluindo o câncer,⁸ sendo importante destacar o sinergismo existente entre os antioxidantes α -tocopherol e ácido ascórbico.⁹

Ainda, a busca por novos sistemas promotores de permeação permite otimizar a entrega dérmica de compostos que muitas vezes são suscetíveis à degradação¹⁰ devido a variações de temperatura, de concentração de oxigênio, dentre outros, sendo a vitamina E um composto passível de degradação em função de variações ambientais.¹¹

Dentre os promotores de permeação, pode-se destacar a iontopforese,¹² que consiste na aplicação de potencial ou corrente elétrica, por meio de eletrodos (cátodo e ânodo), associado a fármacos ou compostos de interesse, de forma tópica, na pele,¹³ por exemplo.

Diante do exposto, o objetivo do presente trabalho foi realizar estudos da liberação e permeação do α -tocopherol, quando adicionado a um hidrogel, com e sem a aplicação de iontopforese, além de avaliar, por meio eletroquímico, possíveis reações de oxidação ocorridas após a aplicação do material. A importância deste trabalho reside na avaliação da promoção, por parte da iontopforese, do aumento de liberação (facilitador) e permeação do antioxidante α -tocopherol para o meio, em ensaios *in vitro*, investigando possíveis alterações estruturais ocorridas no princípio ativo, em função da corrente aplicada pela utilização da iontopforese.

PARTE EXPERIMENTAL

Reagentes e preparo das amostras

Para a realização das análises, foram preparadas amostras contendo α -tocopherol (SIGMA-ALDRICH®, grau de pureza $\geq 96\%$) 1% em massa em meio hidrogel condutor de hidroxietilcelulose 2% manipulado em farmácia de manipulação.

Comportamento eletroquímico do α -tocopherol

Utilizou-se a técnica de voltametria cíclica para o estudo do comportamento eletroquímico do princípio ativo α -tocopherol, com e sem a aplicação de iontopforese. Os voltamogramas cíclicos foram

*e-mail: stulp@univates.br

registrados na faixa de potenciais de -0,3 a +1,2 V em uma velocidade de varredura de 10 mV s⁻¹. Todas as medidas foram realizadas em um sistema de 3 eletrodos, em que um fio de platina era o contraeletrodo e um fio de prata revestido com cloreto de prata era usado como referência. Como eletrodo de trabalho, utilizou-se uma placa de platina, com área superficial de 0,385 cm². As medidas foram realizadas em um potenciostato/galvanostato PGSTAT128N (AUTOLAB/Ecochemie), sendo que todos os experimentos foram realizados à temperatura ambiente em meio de gel hidroxietilcelulose. Todas as análises eletroquímicas foram realizadas em triplicata.

Análise de liberação e permeação *in vitro* do α -tocoferol em sistema de difusão vertical

As análises de liberação e permeação do α -tocoferol foram realizadas em uma célula de difusão vertical tipo Franz, com solução receptora de hexano P.A (Nuclear). A utilização desta solução receptora justifica-se pela necessidade de solubilidade adequada do princípio ativo no meio receptor,¹⁴ sendo o α -tocoferol lipofílico.^{15,16} Este sistema continha uma membrana de acetato de celulose (Sartorius Stedim Biotech com porosidade de 0,45 μ m) e biomembrana de muda de pele de cobra (*Boa constrictor*), cedida pelo Museu de Ciências Naturais da Univates. Ressalta-se, ainda, que as mudas de pele de cobra foram reidratadas por 48 h em solução aquosa de azida sódica 0,0002%.¹⁷ A área exposta de ambas as membranas foi de 7,06 cm², sendo este valor utilizado na determinação do fluxo (J) de liberação para consequente determinação do coeficiente de permeabilidade no estado estacionário (K_p) versus a concentração de α -tocoferol do compartimento doador (C_{doador}) conforme Equação 1.¹⁸

$$K_p = J/C_{\text{doador}} \quad (1)$$

A referida membrana tem como finalidade separar o compartimento doador do receptor, ou seja, formar uma barreira não interferente entre os fluidos.

A célula de difusão foi introduzida em banho termostatizado a 37 °C, simulando a temperatura corporal. Em contato com a membrana foi adicionado o agente acoplador, gel hidroxietilcelulose + α -tocoferol 1% em massa. As alíquotas da célula de difusão foram retiradas em tempos de 0, 2, 6 e 10 minutos. Posteriormente, foram realizadas avaliações espectrofotométricas (190 a 990 nm), com pico de absorbância máximo em 275 nm, para a verificação da presença do substrato na solução receptora.¹⁹ Os resultados foram obtidos por meio da utilização de um espectrofotômetro Perkin Elmer UV/VIS Spectrometer Lambda 25. Para a determinação da concentração liberada e permeada das amostras analisadas, foi construída uma curva de calibração a partir de soluções de α -tocoferol nas seguintes concentrações: 0,09054 μ mol L⁻¹, 0,36277 μ mol L⁻¹, 0,725546 μ mol L⁻¹ e 1,4510 μ mol L⁻¹. A partir da concentração liberada também foi possível determinar o fluxo de liberação do α -tocoferol por hora para calcular o coeficiente de permeabilidade (K_p).

Aplicação da iontoforese *in vitro*

A aplicação de iontoforese *in vitro* foi realizada com o auxílio de um equipamento de iontoforese clínico (AF5 Tone Derm), acoplado ao sistema de difusão vertical, em banho termostatizado a 37 °C em sistema de dupla camisa, conforme Figura 2, na qual está representada a célula utilizada, o posicionamento dos eletrodos, bem como a imersão em banho com temperatura controlada. Os eletrodos utilizados nas aplicações *in vitro* foram de carbono grafite (0,5 cm²) e os parâmetros seguiram as prescrições da literatura para a prática clínica:²⁰ frequência de 600 Hz, corrente de 200 μ A e tempos de aplicação de

0, 2, 6 e 10 minutos, em sistemas contendo gel de hidroxietilcelulose e gel de hidroxietilcelulose/ α -tocoferol.

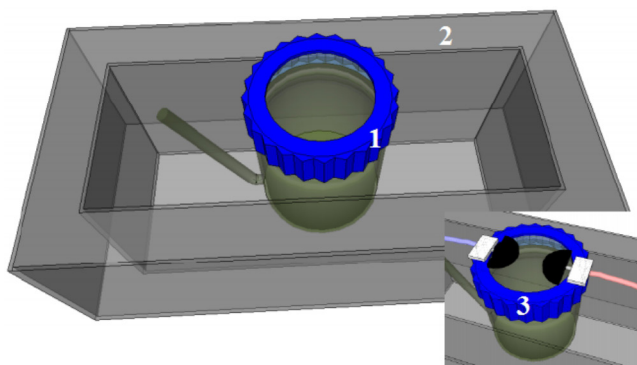


Figura 2. Sistema utilizado nos experimentos de liberação e permeação, com célula de difusão (1), em banho (2) a 37 °C; no detalhe (3) aplicação de corrente por meio de eletrodos de carbono (iontoforese)

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Comportamento eletroquímico do α -tocoferol em sistemas associados à iontoforese

Inicialmente, obteve-se os voltamogramas cíclicos do gel de hidroxietilcelulose com e sem a adição de 1% em massa de α -tocoferol (Figura 3).

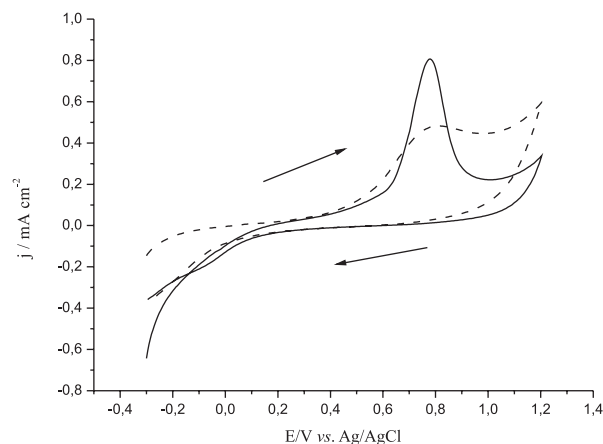


Figura 3. Voltamogramas cíclicos do gel de hidroxietilcelulose (linha tracejada), e este acrescido de α -tocoferol 1% (linha contínua), $v = 10$ mV/s

Com base na avaliação da Figura 3, verifica-se que o sistema contendo somente o gel de hidroxietilcelulose apresenta um comportamento eletroquimicamente ativo, com pico de oxidação irreversível em 0,80 V, o que é característico de sistemas contendo parabeno,²¹ em específico o metilparabeno que é um constituinte do hidrogel estudado, sendo utilizado como conservante antimicrobiano. Com a adição de α -tocoferol, há o aumento da corrente anódica em função de sua oxidação. Aliado a isto, observa-se uma leve diminuição no valor do potencial de pico quando comparado ao gel de hidroxietilcelulose apenas.^{22,23} Assim, o potencial de pico de oxidação do sistema é deslocado para 0,78 V em função da presença do α -tocoferol, concordante com outros estudos realizados,²³ que obtiveram pico de oxidação do α -tocoferol em potenciais de 0,75 V.

Desta forma, verifica-se que ambos compostos, metilparabeno e α -tocoferol, oxidam-se em potenciais bastante próximos, com deslocamento de potencial de pico para potenciais mais negativos,

quando da adição de α -tocoferol, e consequente aumento da corrente de pico, sendo que quando há somente hidrogel, uma banda de oxidação é observada e quando da adição de α -tocoferol observa-se o aparecimento de um pico de oxidação bem definido.

Posteriormente, testou-se o efeito da iontoforese sobre o sistema. Assim, obteve-se os voltamogramas cíclicos do gel de hidroxietilcelulose com a adição de α -tocoferol 1% em massa após a aplicação da iontoforese nos tempos de 0, 2, 6 e 10 minutos (Figura 4), sendo que a amostra analisada é a do compartimento doador. Com base na Figura, é possível tecer alguns comentários sobre a atividade eletroquímica do α -tocoferol em meio hidrogel condutor após a aplicação de corrente elétrica. Com o uso da iontoforese, verifica-se o decréscimo da altura dos picos de oxidação em função do tempo de aplicação, assim como o deslocamento do pico para potenciais mais positivos até os primeiros seis minutos.

Como esperado, o sinal de corrente do α -tocoferol decai com o tempo, já que parte dele é permeado através da membrana em função da aplicação da iontoforese, sendo este resultado esperado em sistemas que simulam a liberação e permeação do ativo. No entanto, não se verifica tal efeito ao se analisar a carga que passa através do sistema, observando-se um valor quase constante em torno de $0,24 (\pm 0,01) \times 10^{-3} \text{ C cm}^{-2}$, independente do tempo de aplicação estudado. De fato, analisando a Figura 4, observa-se uma diminuição da altura do pico e seu consequente alargamento. Acredita-se que parte do α -tocoferol está sendo degradada pela ação da iontoforese, e que seu produto de degradação esteja sendo oxidado no eletrodo de platina num potencial muito próximo ao do α -tocoferol. Zhang e col.,²⁴ mostram que na oxidação do α -tocoferol até a sua respectiva quinona, há a formação de quatro intermediários, sendo que a iontoforese pode ser a responsável pela formação de tais intermediários. Ainda, após 6 e 10 minutos de aplicação de iontoforese, há o aparecimento de um pequeno pico de redução em torno de $-0,1 \text{ V}$ nas amostras submetidas à aplicação de corrente, o que evidencia que há a oxidação do α -tocoferol a outros intermediários, inclusive a α -tocoferil quinona, com consequente redução deste à α -tocoferol em $-0,1 \text{ V}$. Outros trabalhos^{24,25} também mostram esta redução, sendo que o valor do potencial de oxidação e redução é dependente do meio e do eletrodo utilizado. Em relação à carga relativa ao pico de redução, em $-0,1 \text{ V}$, para o tempo de 6 minutos tem-se $8,49 \times 10^{-4} \text{ C cm}^{-2}$, e para o tempo de 10 minutos, $16,98 \times 10^{-4} \text{ C cm}^{-2}$, indicando o aumento da quantidade de espécie reduzida para este tempo de aplicação de iontoforese.

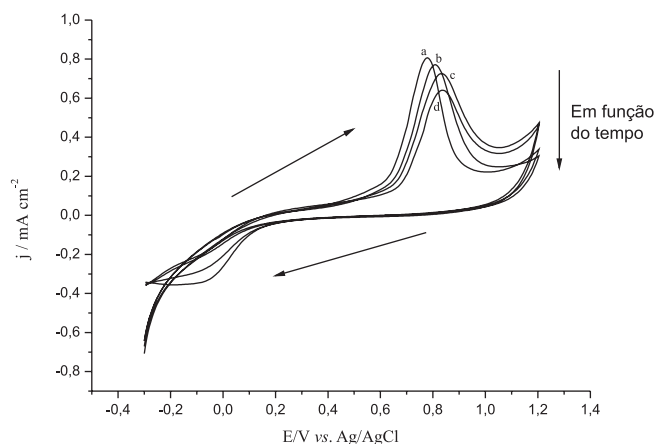


Figura 4. Voltametria cíclica de eletrodo de platina em sistema contendo gel de hidroxietilcelulose acrescido de α -tocoferol 1% em massa nos diferentes tempos estudados: a: 0 min, b: 2 min, c: 6 min e d: 10 min, $v = 10 \text{ mV/s}$

Para verificar se o alargamento dos picos da Figura 4 não se devia ao próprio sinal eletroquímico do gel de hidroxietilcelulose, ao invés

de um possível produto de oxidação do α -tocoferol, registrou-se os voltamogramas cíclicos do gel após a aplicação da iontoforese por 0, 2, 6 e 10 minutos. Os voltamogramas indicam que o alargamento dos picos não se deve ao gel, uma vez que o sinal de oxidação do metilparabeno presente no gel decai em quase toda a sua totalidade após 10 minutos de aplicação (Figura 1S – Material suplementar). Consequentemente, o deslocamento do pico de oxidação, assim como o seu alargamento, se devem à presença de um subproduto da oxidação do α -tocoferol.

Determinação da quantidade liberada de α -tocoferol em sistemas de difusão vertical

Após a avaliação eletroquímica, foram realizados experimentos de liberação em sistemas de difusão vertical, com o intuito de se avaliar variações no coeficiente de permeabilidade em sistemas com e sem aplicação de iontoforese. Ainda, para análise dos resultados em termos de concentração, foi construída curva de calibração a partir de soluções de α -tocoferol, sendo que, por meio destes valores, obteve-se a equação da reta, e a curva obtida foi: $y = -0,00202 + 547,36573.x$, com coeficiente de correlação $R = 0,97385$.

A Figura 5 apresenta as curvas da quantidade liberada de α -tocoferol dos ensaios de difusão sobre a membrana de acetato de celulose, de sistemas com e sem aplicação de iontoforese. Os resultados obtidos com membrana de acetato de celulose indicam que o fluxo de partículas é proporcional ao gradiente de concentração.

Para a obtenção dos parâmetros de liberação no sistema analisado, utilizou-se a segunda lei de Fick, seguindo-se o modelo de dose infinita, em que o gradiente de concentração é constante e, consequentemente, a concentração de fármaco do compartimento doador também o será.²⁶

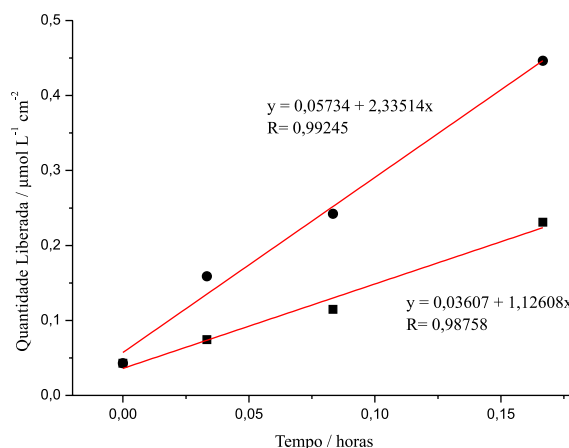


Figura 5. Quantidade liberada de α -tocoferol em função do tempo (horas) em sistemas de difusão vertical contendo gel de hidroxietilcelulose/ α -tocoferol controle (■) e associado à iontoforese (●)

Os resultados de fluxo a partir dos ensaios de liberação sem e com a aplicação de iontoforese foram, respectivamente, de $1,13 \mu\text{mol L}^{-1} \text{ cm}^{-2} \text{ h}^{-1}$ e $2,33 \mu\text{mol L}^{-1} \text{ cm}^{-2} \text{ h}^{-1}$. Estes resultados demonstram que a liberação é aumentada cerca de 105% quando da aplicação de iontoforese ao sistema.

Comparando estes valores de liberação encontrados com outro trabalho publicado¹⁶ tem-se que, em meio gel de hidroxietilcelulose, após 10 min, obteve-se a liberação de $0,45 \mu\text{mol cm}^{-2}$ de α -tocoferol, enquanto que no trabalho publicado a liberação foi de aproximadamente $7,23 \mu\text{mol cm}^{-2}$ em meio de microemulsão óleo/água, sendo o meio extremamente importante na liberação do ativo, bem como na manutenção de sua estrutura e propriedades.²⁷ A escolha do gel de

hidroxiethylcelulose, como veículo no presente trabalho, justifica-se por este ser adequado para a aplicação de iontoforese, possuindo características condutoras e viscosidade adequada. Cabe ressaltar que características reológicas, bem como alterações de constituição do meio e pH, alteram a liberação dos sistemas.^{28,29}

A partir dos resultados de fluxo, foram calculados os coeficientes de permeabilidade para o grupo controle e para o grupo com aplicação de iontoforese.

Na Figura 6, tem-se os coeficientes de permeabilidade do α -tocoferol sobre a membrana de acetato de celulose sem (controle) e com aplicação de iontoforese.

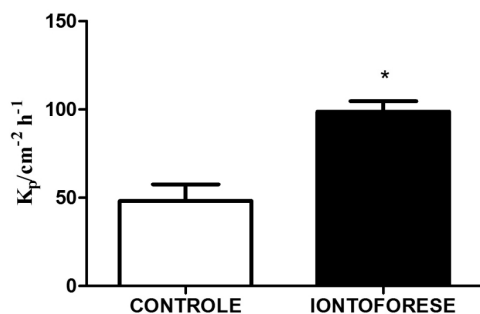


Figura 6. Coeficiente de permeabilidade do α -tocoferol sobre a membrana de acetato de celulose em sistemas controle e com aplicação de iontoforese

A partir dos resultados obtidos, tem-se que o coeficiente de permeabilidade do α -tocoferol sem e com aplicação de iontoforese foi, respectivamente, $48,15 \text{ cm}^2 \text{h}^{-1}$ e $98,81 \text{ cm}^2 \text{h}^{-1}$, apresentando diferença significativa, aplicando teste t com intervalo de confiança de 95% ($t = 4$; $p = 0,01$).

Ainda, com base neste resultado, verifica-se que a aplicação de iontoforese *in vitro* promove o aumento do fluxo e do coeficiente de permeabilidade do α -tocoferol em meio gel de hidroxiethylcelulose,

Determinação da permeação *in vitro* de α -tocoferol em biomembrana de *Boa constrictor*

Após a realização dos ensaios de liberação, foram realizados experimentos de permeação do α -tocoferol, em células de difusão vertical, com biomembranas de *Boa constrictor*, em grupo controle e após aplicação de iontoforese. Na Figura 7 tem-se a média e o desvio padrão da concentração permeada do princípio ativo sem e com a aplicação de iontoforese, nos tempos 2 e 10 min. Estes tempos utilizados nesta avaliação justificam-se por serem, respectivamente, o menor e o maior tempo de aplicação de iontoforese utilizados nos estudos de difusão (lei de Fick).

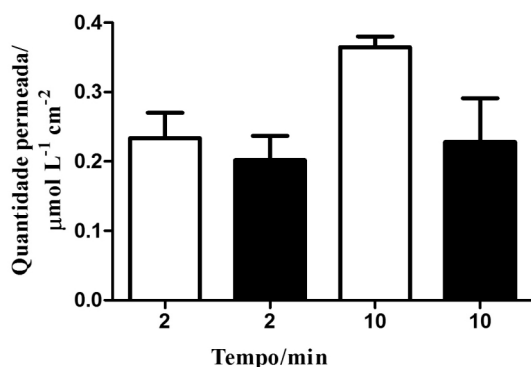


Figura 7. Quantidade permeada do α -tocoferol sem (■) e com (□) aplicação de iontoforese, nos tempos 2 e 10 min

Avaliando os resultados apresentados na Figura 7, verifica-se que para o grupo controle há uma tendência de aumento da permeação, porém não há diferença significativa para os tempos 2 e 10 minutos, aplicando teste t com intervalo de confiança de 95%. Este fato pode ser devido à utilização de biomembranas neste estudo, que não possuem uniformidade em termos de espessura, simulando *in vitro* a não uniformidade do estrato córneo humano. Ainda, cabe ressaltar que a muda de pele de cobra *Boa constrictor* possui similaridade em termos de propriedades de absorção de água, composição lipídica e de permeação.^{17,30} Nos ensaios de permeação de α -tocoferol para o tempo de 2 minutos foi de $0,23 \pm 0,03 \mu\text{mol L}^{-1} \text{cm}^{-2}$, e para o tempo de 10 minutos foi de $0,36 \pm 0,02 \mu\text{mol L}^{-1} \text{cm}^{-2}$, apresentando diferença significativa para intervalo de confiança de 95% ($t = 3$; $p = 0,02$). Já quando comparado o tempo 10 minutos para o grupo controle e após a aplicação de iontoforese, têm-se em termos percentuais médios, 60% de aumento de permeação, indicando, portanto, que a aplicação de iontoforese promove um aumento de permeação, principalmente em maiores tempos de aplicação de corrente.

Ainda, comparando os resultados de quantidade permeada de α -tocoferol em biomembrana de muda de pele de cobra com trabalhos publicados na literatura, que estudam a permeação do ativo, verifica-se que, para estudos em pele de orelha de coelho,²⁷ após 1 hora de ensaio de permeação tem-se que a quantidade permeada de Vitamina E foi de $6,96 \mu\text{mol cm}^{-2}$. Já em estudos de permeação na epiderme de orelha de suíno,¹⁶ após 6 horas de experimento houve a permeação e retenção de $4,16 \mu\text{mol L}^{-1} \text{cm}^{-2}$. Estes resultados são compatíveis com os obtidos no presente estudo, considerando-se que o tempo máximo de permeação avaliado foi de 10 minutos, indicando que em tempos maiores há uma tendência de aumento da quantidade permeada, e que a iontoforese atua como promotora desta permeação.

CONCLUSÃO

Os resultados obtidos demonstraram, a partir de técnicas eletroquímicas, que há uma tendência de degradação do α -tocoferol com o incremento do tempo de aplicação da iontoforese. Sugere-se então que a iontoforese, em frequência de 600 Hz e corrente de 200 μA , tem a capacidade de oxidar parte do princípio ativo analisado. Por outro lado, por meio dos ensaios de liberação e permeação, verifica-se que com a aplicação de iontoforese há um incremento de liberação e permeação de α -tocoferol para o meio receptor. Desta forma, a associação de α -tocoferol e iontoforese é indicada para a prática clínica, considerando a ação antioxidante deste princípio ativo.

MATERIAL SUPLEMENTAR

No material suplementar, disponível em <http://quimicanova.sbq.org.br> na forma de arquivo PDF, com acesso livre, encontram-se os voltamogramas do gel de hidroxiethylcelulose com e sem a aplicação de iontoforese, sobre eletrodo de platina (Figura 1S).

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem ao CNPq pelo auxílio financeiro concedido.

REFERÊNCIAS

- http://ozone.unep.org/Assessment_Panels/EEAP/eeap-report2010.pdf, acessada em Agosto 2014.
- Hiramoto, K.; Kobayashi, H.; Yamate, Y.; Ishii, M.; Satoc, T.; Inoue, M.; *Contact Lens & Anterior Eye* **2013**, *36*, 28.

3. Wlaschek, M.; Tantcheva-Poo' r, I.; Naderi, L.; Ma, W.; Schneider, L. A.; Razi-Wolf, Z.; Schüller, J.; Scharffetter-Kochanek, K.; *J. Photochem. Photobiol., B* **2001**, *63*, 41.
4. Rabe, J. H.; Mamelak, A. J.; McElgunn, P. J. S.; Morison, W. L.; Sauder, D. N.; *J. Am. Acad. Dermatol.* **2006**, *55*, 1.
5. Carr, A. C.; Zhu, B.-Z.; Frei, B.; *Circ. Res.* **2000**, *87*, 349.
6. Zingg, J.-M.; *Mol. Aspects Med.* **2007**, *28*, 400.
7. Guinaz, M.; Milagres, R. C. R. M.; Pinheiro-Sant' ana, H. M.; Chaves, J. B. P.; *Quim. Nova* **2009**, *32*, 2098.
8. Burke, K. E.; Clive, J.; Combs, G. F.; Nakamura, R. M.; *J. Am. Acad. Dermatol.* **2003**, *49*, 458.
9. Eberlein-König, B.; Placzek, M.; Przybilla, B.; *J. Am. Acad. Dermatol.* **1998**, *38*, 45.
10. Kaur, I. P.; Kapila, M.; Agrawal, R.; *Ageing Res. Rev.* **2007**, *6*, 271.
11. Sabliov, C. M.; Fronczek, C.; Astete, C. E.; Khachatryan, M.; Khachatryan, L.; Leonardi, C.; *J. Am. Oil Chem. Soc.* **2009**, *86*, 895.
12. Prausnitz, M. R.; *Adv. Drug Delivery Rev.* **1996**, *18*, 395.
13. Naik, A.; Kalia, Y. N.; Guy, R. H.; *Pharm. Sci. Technol. Today* **2000**, *3*, 318.
14. United States Food and Drug Administration (US-FDA); Guidance for Industry, Nonsterile Semisolid Dosage Forms, 1997.
15. Rigotti, A.; *Mol. Aspects Med.* **2007**, *28*, 423.
16. Rozman, B.; Zvonar, A.; Falson, F.; Gasperlin, M.; *AAPS PharmSciTech* **2009**, *10*, 54.
17. Nunes, R. S.; Azevedo, J. R.; Vasconcelos, A. P.; Pereira, N. L.; *Sci. Plena* **2005**, *1*, 171.
18. Netz, P. A.; Ortega, G. G.; *Fundamentos de Físico-Química: uma abordagem conceitual para as ciências farmacêuticas*, 1ª ed., Artmed: Porto Alegre 2002.
19. Rios, M. D. G.; Penteado, M. D. V. C.; *Quim. Nova* **2003**, *26*, 10.
20. Banga, A. K.; Bose, S.; Ghosh, T. K.; *Int. J. Pharm.* **1999**, *179*, 1.
21. Gil, E. S.; Andrade, C. H.; Barbosa, N. L.; Braga, R. C.; Serrano, S. H. P.; *J. Braz. Chem. Soc.* **2012**, *23*, 565.
22. Diaz, T. G.; Merás, I. D.; Cabanillas, A. G.; Franco, M. F. A.; *Anal. Chim. Acta* **2004**, *511*, 231.
23. Barus, C.; Wetz-Torond, F.; Brunel, Y.; Gros, P.; *Int. J. Electrochem. Sci.* **2012**, *7*, 5429.
24. Tian-Yi, Z.; Shi-Min, Z.; *Anal. Chim. Acta* **1995**, *309*, 111.
25. Benle, L.; Lin, D.; Chunhua, C.; Baoen, S.; *Acta Phys.-Chim. Sin.* **1989**, *5*, 499.
26. Silva, J. A.; Santana, D. P.; Bedor, D. G. C.; Borba, V. F. C.; Lira A. A. M.; Egito, E. S. T.; *Quim. Nova* **2009**, *32*, 1389.
27. Cassano, R.; Trombino, S.; Muzzalupo, R.; Tavano, L.; Picci, N.; *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **2009**, *72*, 232.
28. Hodsdon, A. C.; Mitchell, J. R.; Davies, M. C.; Melia, C. D.; *J. Controlled Release* **1995**, *33*, 143.
29. Chorilli, M.; Zague, V.; Scarpa, M. V.; Leonardi, G. R.; *Rev. Elettronica Farm.* **2007**, *4*, 52.
30. Dutra, C.; Bianchetti, P.; Stülp, S.; *Sci. Plena* **2013**, *9*, 107202.