

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

SEILA TOLENTINO

**DESENVOLVIMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE NANOPARTÍCULAS
POLIMÉRICAS CARREGADAS COM FOSFATO DE CLINDAMICINA PARA
TRATAMENTO TÓPICO DA ACNE VULGAR**

BRASÍLIA
2019

SEILA TOLENTINO

**DESENVOLVIMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE NANOPARTÍCULAS
POLIMÉRICAS CARREGADAS COM FOSFATO DE CLINDAMICINA PARA
TRATAMENTO TÓPICO DA ACNE VULGAR**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade de Brasília, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas

Orientador: Prof. Dr. Guilherme Martins Gelfuso

BRASÍLIA

2019

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de ensino, estudo ou pesquisa, desde que citada a fonte.

TT649d Tolentino, Seila
Desenvolvimento e caracterização de nanopartículas poliméricas carregadas com fosfato de clindamicina para tratamento tópico da acne vulgar / Seila Tolentino; orientador Guilherme Martins Gelfuso. -- Brasília, 2019. 70 p.

Dissertação (Mestrado - Mestrado em Ciências Farmacêuticas) -- Universidade de Brasília, 2019.

1. nanopartículas poliméricas. 2. fosfato de clindamicina. 3. acne vulgaris. I. Martins Gelfuso, Guilherme, orient. II. Título.

AGRADECIMENTOS

À Universidade de Brasília, em especial ao Laboratório de Tecnologia de Medicamentos, Alimentos e Cosméticos (LTMAC), por permitir essa importante oportunidade.

Ao meu orientador Prof. Dr. Guilherme Martins Gelfuso pela oportunidade e confiança. Por acreditar no diálogo e no ensino;

Aos professores Prof. Dr. Marcílio Sérgio Soares Cunha-Filho, Prof. Dr^a. Taís Gratieri e novamente ao Prof. Dr. Guilherme Martins Gelfuso pelo exemplo de garra e coragem com que levam a missão a eles confiada.

Às colegas de bancada que se tornaram amigas, Mairinha e Geisinha, por fazerem meus dias serem mais leves. Pela receptividade, companheirismo, ensinamentos, paciência, cuidado e atenção.

Aos colegas de laboratório, em especial, Paula Martins, Ludmila Alvim, Ricardo Nunes, Maira Teixeira, Ana Clara, Mikaela, Wanessa Quintão, Fernando Pires de Sá, Giselly Almeida, Ana Christina, Stefania, Felipe Queiroz, Breno Matos pela leveza e presteza em ajudar e ensinar.

Aos demais colegas de laboratório que chegaram posteriormente, ou que já seguiram seus caminhos, pela contribuição e atenção.

Ao Laboratório de Microscopia do Instituto de Biologia da Universidade de Brasília pelo auxílio na obtenção das fotomicrografias eletrônicas de varredura, em especial à técnica Ingrid pela paciência e colaboração.

A querida amiga e colega Adriana Silva Oliveira, que me incentivou a continuar os estudos na minha área de formação e de coração. Que me ajudou a encarar esse sonho que as vezes parecia tão distante.

Aos gestores do Ministério da Saúde, em especial à coordenadora Mirna Poliana, pelo incentivo e compressão durante todo esse período em que muitas vezes tive que alterar o horário de trabalho para desenvolver atividades acadêmicas;

Aos amigos e colegas tecnologistas Daiane de Souza, Zênia Maciel, Kleber Barros e Maíra Carneiro pelo incentivo e exemplo, que muitas vezes renovaram as minhas forças para continuar;

Aos parceiros de jornada do Ministério da Saúde, especialmente, Adriana Silva, Ana Paula Neves, Ana Luiza Vivan, Maria José Carneiro, Flavia Albuquerque, Flávia Martins, Pedro Henrique, Ronaldo Nogueira, Gabriela Oliveira, Elber Pietroni, Carlos Alberto Aguilera, Flávio Oliveira, Rafaela Barcelos, Thânia Maura, Sacha Cristina, Tatiana Carla, Vanessa Malaspina, Flávia Martins, Bárbara Luiza pela compressão e incentivo.

Aos amigos que cultivei até esse ponto da minha jornada, em especial Alessandra Souza, Alessandra Rosa, Henrique Mendes, César Rodrigues, Fernanda Martins, Beatriz Oliveira, Lindiana Ribeiro, Tullio Gomes, Anna Claudia Santos, Daniel Hillesheim pela compreensão e incentivo.

Ao querido Antonio Neto e família pelo incentivo, paciência, carinho, ajuda de sempre.

Aos meninos desta família, Natã, Josué, Guilherme, Valter Neto, Felipe, Sullivan e Lédison, por me darem asas e renovarem minhas forças.

Às mulheres da minha vida, a minha tia Zeca que é a nossa fonte de amor puro e leveza, a minha irmã Selma que é quem começou toda essa história saindo de casa, acreditando e provando que a menina alfabetizada na “roça” poderia alcançar voos mais altos (essa vitória vai pra você mana!).

À minha doce Belinha, minha companheira de escrita até altas horas da noite.

Ao meus pais, que apesar da pouca escolaridade, me incentivaram e abriram mão de seus sonhos para que eu pudesse realizar os meus. À minha amada mãe Luzia, fonte de coragem, força, fé, perseverança, cuidado, carinho, compressão e amor e ao meu pai Valter, que partiu antes de me ver realizar este sonho. Sei que, de onde estiver, estará orgulhoso!

E por fim... e mais importante, à Deus que me iluminou, me deu força, sabedoria, me capacitou, sustentou, enxugou as minhas lágrimas e me correjou nos braços quando eu não conseguia mais caminhar.

RESUMO

TOLENTINO, S. Desenvolvimento e caracterização de nanopartículas poliméricas carregadas com fosfato de clindamicina para tratamento tópico da acne vulgar. Brasília, 2019. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas). Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade de Brasília, Brasília, 2019.

A *acne vulgaris* é uma doença inflamatória crônica da unidade pilosebácea. Como bactérias têm papel importante no desencadeamento dessa condição, o uso de antibióticos tópicos é útil no controle da doença. No entanto, a efetividade e segurança desse tipo de formulação seria aumentado com a penetração seletiva do fármaco nas estruturas foliculares. O objetivo deste trabalho foi desenvolver, caracterizar e avaliar nanopartículas poliméricas contendo fosfato de clindamicina (CDM) com o intuito de direcionar e controlar a liberação do fármaco para as unidades pilosebáceas e assim servirem como nova alternativa terapêutica tópica para acne. Foram desenvolvidas duas nanopartículas com polímeros diferentes, quitosana e ácido hialurônico, de cargas opostas, positiva e negativa, respectivamente (NP-QS-CDM-3 e NP-AH-CDM-4). As nanopartículas foram obtidas variando-se a proporção de polímero em relação ao reticulante a fim de melhorar sua eficiência de encapsulação. Os sistemas foram então caracterizados, determinando-se o diâmetro hidrodinâmico médio, índice de polidispersividade (PDI), potencial zeta, eficiência de encapsulação e morfologia. As NP-QS-CDM-3 foram esféricas, apresentaram diâmetro médio igual a $417,4 \pm 9,0$ nm (PDI de $0,46 \pm 0,05$), potencial zeta igual a $+27,7 \pm 0,9$ mV, e foram capazes de encapsular $43,7 \pm 1,9$ % de CDM, enquanto as NP-AH-CDM-4, também esféricas, apresentaram diâmetro médio de $362,0 \pm 18,7$ nm (PDI de $0,46 \pm 0,02$), potencial zeta igual a $-30,2 \pm 2,7$ mV e encapsularam $50,4 \pm 0,6$ % de CDM. Ensaios de liberação *in vitro* demonstraram similaridade entre o perfil de liberação do fármaco a partir das duas nanopartículas. Estudos de permeação *in vitro* foram então conduzidos realizando-se ou não uma simulação de obstrução sebácea que ocorre em pele acneica. Os ensaios revelaram a importância da via folicular para a permeação cutânea de CDM, uma vez que quando as estruturas da pele foram tapadas com uma resina, houve alteração significativa na penetração do fármaco em outras camadas da pele. Além disso foi observado que a CDM encapsulada na NP-AH-CDM-4 consegue penetrar no folículo piloso mesmo na condição de obstrução sebácea, o que favoreceria a utilização da formulação no tratamento tópico da doença. Por fim, ensaios *in vitro* de HET-CAM revelaram que ambos os sistemas não apresentaram potencial irritativo para a pele. Portanto, os sistemas desenvolvidos – especialmente NP-AH-CDM-4 – possuem potencial para o tratamento tópico mais efetivo da acne vulgaris.

Palavras-chave: Nanopartículas poliméricas, fosfato de clindamicina, acne vulgaris.

ABSTRACT

TOLENTINO, S. Development and characterization of polymeric nanoparticles loading clindamycin phosphate for topical treatment of acne vulgaris. Brasília, 2019. Dissertation (Master's Degree in Pharmaceutical Sciences). Faculty of Health Sciences, University of Brasília, Brasília, 2019.

Acne vulgaris is a chronic inflammatory disease of the pilosebaceous unit. Because bacteria play an important role in triggering this condition, the use of topical antibiotics is helpful in controlling the disease. However, the effectiveness and safety of this kind of formulation would be increased with selective drug penetration into the follicular structures. The objective of this work was to develop, characterize and evaluate clindamycin phosphate (CDM) loaded in polymeric nanoparticles in order to target and control drug release to the pilosebaceous units and thus serve as a new topical alternative therapy for acne. Two nanoparticles with different polymer with opposite charges (chitosan and hyaluronic acid) were developed (NP-QS-CDM-3 and NP-AH-CDM-4). Nanoparticles were obtained by varying the ratio of polymer to crosslinker in order to improve their encapsulation efficiency. The systems were then characterized by determining the average hydrodynamic diameter, polydispersity index (PDI), zeta potential, encapsulation efficiency and morphology. The NP-QS-CDM-3 were spherical, had an average diameter of 417.4 ± 9.0 nm (PDI of 0.46 ± 0.05), zeta potential of $+27.7 \pm 0.9$ mV, were capable of encapsulating $43.7 \pm 1.9\%$ of CDM, while the spherical NP-AH-CDM-4 had a mean diameter of 362.0 ± 18.7 nm (PDI of 0.46 ± 0.02), zeta potential equal to -30.2 ± 2.7 mV and encapsulated $50.4 \pm 0.6\%$ CDM. In vitro release assays demonstrated similarity between the drug release profile from the two nanoparticles. In vitro permeation studies were then conducted whether or not a simulation of sebaceous obstruction occurring in acne skin was performed. The trials revealed the importance of the follicular pathway for CDM skin permeation, since when the skin structures were covered with a resin, there was a significant change in drug penetration into other skin layers. In addition, it was observed that CDM encapsulated in NP-AH-CDM-4 can preferentially penetrate the hair follicle even in the condition of sebaceous obstruction, which would favor the use of the formulation in the topical treatment of the disease. Finally, in vitro assays of HET-CAM revealed that both systems had no skin irritant potential. Therefore, developed systems - especially NP-AH-CDM-4 - have the potential for more effective topical treatment of acne vulgaris.

Keywords: Polymeric nanoparticles, clindamycin phosphate, acne vulgaris.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 Estrutura da pele e seus anexos.	4
Figura 2 Representação esquemática das possíveis vias de penetração cutânea: (A) via de penetração intercelular, em torno dos corneócitos, (B) via de penetração intracelular através dos corneócitos, (C) via de penetração folicular.....	6
Figura 3 Representação da produção alterada de sebo no quadro de acne vulgaris.	7
Figura 4 Estrutura molecular do fosfato de clindamicina (CDM) (Massa molecular: 504,96 g mol ⁻¹ e Log P: 0,57).	9
Figura 5 Estrutura molecular da quitosana (A) e do tripolifosfato de sódio (B).....	12
Figura 6 Estrutura molecular do ácido hialurônico (A) e da poliarginina (B).	13
Figura 7 Representação do processo de remoção da pele da orelha de suínos..	18
Figura 8 Representação da técnica de tape-stripping diferencial e os métodos de extração testados para a recuperação de fosfato de clindamicina (CDM) das camadas da pele.. ..	19
Figura 9 Representação do preparo das nanopartículas de quitosana com a etapa de sonicação após o gotejamento do reticulante. QS: quitosana; CDM: fosfato de clindamicina; TPP: tripolifosfato; NP: nanopartícula.....	22
Figura 10 Representação do preparo das nanopartículas de quitosana com a etapa de sonicação durante o gotejamento do reticulante. QS: quitosana; CDM: fosfato de clindamicina; TPP: tripolifosfato; NP: nanopartícula.	23
Figura 11 Representação do preparo das nanopartículas de ácido hialurônico. AH: ácido hialurônico; CDM: fosfato de clindamicina; NP: nanopartícula.....	24
Figura 12 Representação do protocolo de eficiência de encapsulação (EE) por método indireto..	26
Figura 13 Célula tipo Franz modificada.....	27
Figura 14 Esquema de processamento da pele sebácea	28
Figura 15 Representação esquemática da avaliação <i>in vitro</i> do potencial irritativo das nanopartículas.	29
Figura 16 Cromatogramas representativos de CLAE do fosfato de clindamicina (CDM), estrato córneo (EC), folículos pilosos (FP) e pele remanescente (PR) obtidos seguindo o método estabelecido com detecção UV (200 nm).....	31
Figura 17 Curva analítica obtida pela análise de uma triplicata de fosfato de clindamicina por HPLC nas concentrações de 2,0; 5,0; 7,0; 10,0; 15,0 e 20,0 µg/mL, comprovando a linearidade do método.Equação da reta: $y = 21400x + 730,47$, $r = 0,9989$	32

- Figura 18** A: Análises de DSC de fosfato de clindamicina (CDM), quitosana e mistura física.
B: Análises de DSC de fosfato de clindamicina (CDM), ácido hialurônico (AH) e mistura física. 35
- Figura 19** A: Análises de TG de fosfato de clindamicina (CDM), quitosana e mistura física.
B: Análises de TG de fosfato de clindamicina (CDM), ácido hialurônico (AH) e mistura física. 35
- Figura 20** Gráfico de distribuição do tamanho de partícula, onde A: NP-QS-CDM-3 e B: NP-QS-CDM-4. Demonstração de como estão distribuídas as populações, em relação ao diâmetro, das nanopartículas. 39
- Figura 21** Aparência das amostras após adição do agente reticulante (poliarginina) na solução contendo o polímero (ácido hialurônico). A: gotejamento sob agitação magnética; B: gotejamento sob sonicação; C: gotejamento sob agitação magnética e sonicação posterior. 40
- Figura 22** Microscopia eletrônica de varredura (MEV) das nanopartículas A: NP-QS-CDM-3 e B: NP-AH-CDM-4. Microscopia eletrônica por Transmitância (MET) das nanopartículas A: NP-QS-CDM-3 e B: NP-AH-CDM-4. 42
- Figura 23** Perfis de liberação das nanopartículas NP-QS-CDM-3 e NP-AH-CDM-4 em comparação da formulação comercial Adacne Clin[®], contendo a mesma concentração de fármaco. 43
- Figura 24** Quantidade permeada de fármaco na pele de suínos sem processamento. EC: estrato córneo; FP: folículo piloso; PR: pele remanescente. ($p < 0,05$) 44
- Figura 25** permeação da pele tratada com sebo. A: quantificação da permeação das nanopartículas NP-QS-CDM-3, NP-AH-CDM-4 e formulação comercial (Adacne Clin[®]) no estrato córneo (EC); B: quantificação da permeação das nanopartículas NP-QS-CDM-3, NP-AH-CDM-4 e formulação comercial (Adacne Clin[®]) no: folículo piloso (FP) e C: quantificação da permeação das nanopartículas NP-QS-CDM-3, NP-AH-CDM-4 e formulação comercial (Adacne Clin[®]) na pele remanescente (PR). ($p < 0,05$) 45
- Figura 26** Quantificação da clindamicina nas camadas da pele com folículos selados após 24 horas de permeação; EC: estrato córneo; PR: pele remanescente. ($p < 0,05$) 46
- Figura 27** Quantificação da clindamicina nas camadas da pele tratada com sebo e com folículos selados após 24 horas de permeação; EC: estrato córneo; PR: pele remanescente. ($p < 0,05$) 47
- Figura 28** Direcionamento folicular da formulação comercial (Adacne Clin[®]) e das nanopartículas (NP-QS-CDM-3 e NP-AH-CDM-4) em pele intacta e pele sebácea. 48

Figura 29 Sequência ilustrativa das imagens do ensaio de HET-CAM demonstrando o efeito dos controles positivo (NAOH 1 M), negativo (NaCl 0,9%) e nas nanopartículas NP-QS-CDM-3 e NP-AH-CDM-4 e formulação comercial na membrana cório-alantoide após 30 segundos, 2 minutos e 5 minutos.	49
---	----

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Concentração dos componentes das nanopartículas e métodos de preparo	24
Tabela 2 - Classificação final das nanopartículas considerando a pontuação cumulativa quanto ao grau de irritabilidade no HET-CAM	30
Tabela 3 - Avaliação do método de extração de fosfato de clindamicina das camadas de pele estudadas (EC, estrato córneo; FP, folículos pilosos; PR, pele remanescente).....	33
Tabela 4 - Solubilidade do fosfato de clindamicina.....	34
Tabela 5 - Caracterização das nanopartículas alterando a proporção de polímero em relação ao fármaco.....	36
Tabela 6 - Caracterização das nanopartículas de quitosana alterando a proporção de reticulante em relação ao polímero e mantendo a proporção de fármaco.....	37

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

ANOVA	Análise de variância unidirecional
CAM	Membrana cório-alantóide
CDM	Clindamicina
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
CM	Concentração mensurada
CT	Concentração teórica
CV	Coefficiente de variação
DrTG	Primeira derivada do TGA
DSC	Calorimetria Exploratória Diferencial,
EE	Eficiência de encapsulação
FDA	<i>Food and drug administration</i>
HA	Ácido Hialurônico
HEPES	Ácido N-2- hidroxietilpiperazina-N'-2-etanosulfônico
HET-CAM	Ensaio de membrana cório-alantoide de ovos de galinha embrionados
ICH	<i>International Conference on Harmonization</i>
LD	Limite de detecção
LQ	Limite de quantificação
NP	Nanopartículas
PCDT	Protocolo clínico e diretrizes terapêuticas
PDI	Índice de polidispersividade
PLA	Poli arginina
PR	Pele remanescente
TR	Tempo de retenção
TGA	Termogravimetria
TPP	Tripolifosfato de Sódio
UV	Ultravioleta

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DA LITERATURA.....	3
2.1 Pele.....	3
2.2 Acne Vulgaris.....	6
2.3 Opções de medicamentos tópicos para tratamento da acne	7
2.4 Fosfato de clindamicina	8
2.5 Nanotecnologia	10
2.6 Polímeros utilizados no preparo de nanopartículas.....	11
2.6.2. Ácido Hialurônico	13
3. OBJETIVOS	15
3.1 Objetivo geral.....	15
3.2 Objetivos específicos	15
4. MATERIAL E MÉTODOS	16
4.1 Material	16
4.2 Ensaio de pré-formulação.....	17
a) Desenvolvimento da metodologia analítica	17
i. Condições cromatográficas	17
ii. Extração dos fármacos das camadas da pele de suínos.....	18
iii. Validação do método.....	19
iv. Seletividade	19
v. Linearidade.....	20
vi. Precisão	20
vii. Exatidão.....	20
b) Solubilidade do fosfato de clindamicina	21
c) Estudos de compatibilidade.....	21
i. Calorimetria de varredura diferencial	21
ii. Análise termogravimétrica (TGA)	21
4.3 Desenvolvimento de nanopartículas.....	22
4.3.1 Nanopartículas de quitosana.....	22
4.4.2 Nanopartículas de ácido hialurônico	23
4.4.3 Caracterização das nanopartículas (quitosana e ácido hialurônico).....	25
i. Diâmetro hidrodinâmico	25
ii. Potencial zeta	25

iii.	pH.....	25
iv.	Morfologia.....	25
v.	Eficiência de encapsulação.....	26
4.4	Estudos <i>in vitro</i> de liberação de fosfato de clindamicina a partir das nanopartículas..	27
4.5	Avaliação <i>in vitro</i> da penetração cutânea de fosfato de clindamicina a partir das nanopartículas ..	28
4.6	Avaliação <i>in vitro</i> do potencial irritativo das nanopartículas de QS e AH (HET-CAM) ..	29
4.7	Análise estatística.....	30
5.	RESULTADOS E DISCUSSÃO ..	31
5.1	Ensaio de pré-formulação ..	31
a)	Metodologia analítica.....	31
i.	Seletividade ..	31
ii.	Linearidade.....	32
iii.	Precisão ..	32
iv.	Exatidão/Recuperação.....	33
b)	Solubilidade do fosfato de clindamicina ..	33
c)	Estudo de compatibilidade ..	34
5.2	Desenvolvimento das nanopartículas ..	36
5.2.1	Nanopartículas de quitosana.....	36
5.2.2	Nanopartículas de ácido hialurônico ..	39
5.2.3	pH.....	41
5.2.4	Morfologia.....	42
5.3	Ensaio <i>in vitro</i> de liberação ..	43
5.4	Estudo <i>in vitro</i> de permeação através da pele de suínos ..	44
5.5	Avaliação <i>in vitro</i> do potencial irritativo das nanopartículas de QS e AH (HET-CAM) ..	48
6.	CONCLUSÃO ..	50
	REFERÊNCIAS ..	52

1. INTRODUÇÃO

A *acne vulgaris* é uma doença inflamatória crônica que afeta as unidades pilosebáceas da pele. Seu aparecimento é resultado do aumento do sebo induzido por produção aumentada de andrógenos, da alteração da queratinização da pele, e da inflamação gerada pela colonização bacteriana das estruturas pilosebáceas localizadas principalmente na face, pescoço e peito (1). A principal espécie bacteriana causadora da acne é a *Propionibacterium acnes* (2).

Dentre as consequências da instalação da doença, estão as cicatrizes faciais que afetam até 20% dos adolescentes (3). A acne também pode persistir na idade adulta, inclusive com efeitos prejudiciais à autoestima da pessoa (4). No entanto, o que exatamente desencadeia a acne e como o tratamento afeta o curso da doença ainda permanecem incertos (3).

Embora o tratamento para a acne ainda não seja um consenso, existem medicamentos orais e tópicos que reduzem o curso da maioria das lesões. A isotretinoína de uso oral é a terapia mais eficaz e é usada precocemente em doenças graves, embora seu uso seja muito limitado por causar teratogenicidade e outros efeitos adversos importantes, como depressão (5). O tratamento com contraceptivos orais é muitas vezes indicado para mulheres e podem gerar bons resultados (1). Os antibióticos orais são geralmente indicados para casos moderados e graves ou aqueles casos em que lesões acneicas recobrem uma grande superfície do corpo. Eles atuam inibindo o crescimento de *Propionibacterium acnes* e conseqüentemente na síntese de agentes inflamatórios liberados por ela. Entretanto, a ação sistêmica desses fármacos também é acompanhada de reações adversas indesejáveis, como colite pseudomembranosa, discrasias sanguíneas, náusea, diarreia, distensão e desconforto abdominais (1,6,7).

A terapia tópica, que tende a reduzir ou eliminar muito dos efeitos adversos dos fármacos utilizados oralmente, também é indicada, mas é restrita a casos mais moderados da doença ou como tratamento adjuvante de casos mais graves (8). De fato, quando usados em combinação, formulações contendo peróxido de benzoíla, retinóides e antibióticos, podem controlar a acne leve a moderada (1). O principal motivo para o insucesso absoluto da terapia tópica da acne está no fato de não haver uma formulação que promova a liberação do fármaco no seu local de ação em concentrações efetivas e de maneira controlada ao longo do dia (8).

Dessa forma, uma formulação tópica ideal para o tratamento da acne seria aquela que proporcionasse uma liberação direcionada do fármaco para as unidades pilosebáceas após a aplicação, que mantivesse essa concentração do fármaco nessas estruturas pelo maior período possível e que tivesse em sua composição pouco ou nenhum conteúdo graxo para impedir que o quadro acneico fosse piorado. Nesse sentido, os sistemas nanoparticulados têm sido bastante estudados na modulação da liberação tópica de substâncias, pois dependendo de sua natureza e composição podem promover um aumento da absorção folicular do fármaco que encapsulam, de modo que essas estruturas atuem como um reservatório de fármaco, promovendo a sua liberação de forma sustentada (9).

Em vista disso, este trabalho propôs a nanoestruturação do fosfato de clindamicina utilizando como alternativas de matrizes poliméricas a quitosana e o ácido hialurônico, para servir como nova formulação efetiva para o tratamento tópico da acne. A hipótese aqui testada foi a de que essas nanopartículas, a depender de seu tamanho, a sua natureza e a carga superficial, direcionariam o fármaco ao local de ação e seriam capazes de sustentar a sua liberação por períodos mais longos após a aplicação do produto (9), além de poderem constituir formulações livres de lipídeos.

A clindamicina foi selecionada para o estudo por ser um dos agentes antibióticos mais utilizados para tratamento tópico da acne, mas que possui características físico-químicas que restringem sua penetração cutânea, como alta solubilidade aquosa (150 mg/mL) e baixo coeficiente de partição ($\log P = 0,57$) (10). A quitosana e o ácido hialurônico foram selecionados como matrizes poliméricas para o preparo das nanopartículas por apresentarem uma combinação de propriedades químicas e biológicas muito atrativas, como fácil manuseio, biodegradabilidade, biocompatibilidade e bioadesividade (11,12), além de terem cargas opostas em condições fisiológicas.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Pele

A função da pele é proteger o corpo contra influências indesejadas do meio externo, além de evitar a perda de água, possuir funções imunológicas e sensoriais, regular a temperatura do corpo e sintetizar a vitamina D (13). A principal barreira que confere esse papel de proteção da pele é a sua camada mais externa, o estrato córneo. Subjacente ao estrato córneo está a epiderme viável (50–100 μm de espessura), responsável pela geração do estrato córneo (14).

A epiderme viável consiste em várias camadas. De dentro para fora, essas camadas são o estrato basal, o estrato espinhoso e o estrato granuloso (14). A epiderme é uma camada em constante renovação, no qual uma perda de células da superfície do estrato córneo (descamação) é equilibrada pelo crescimento celular na epiderme inferior. Dessa forma, exibem várias características baseadas no seu grau de diferenciação. A mais imatura dessas células, chamada queratinócitos basais, formam o estrato basal e são ligados à derme por hemidesmossomas (13). A primeira camada consiste em células cuboidais ligeiramente retangulares que compõem o estrato basal, também chamado de células basais. Alguns dos queratinócitos dessa camada fornecem uma população de *stem cells* que se dividem para produzir células transientes (15). Nesta camada, as células destinadas à camada proliferativa com diferenciação terminal eventualmente desfazem sua conexão com o hemidesmossoma na junção dérmico-epidérmica, saindo da camada basal movendo-se para cima em direção à superfície epidérmica. À medida que as células se tornam cada vez mais diferenciadas, eles começam a se achatar no plano da epiderme, ligando-se firmemente uma às outras por desmossomas (16).

As células epidérmicas tornam-se mais alongadas à medida que se aproximam da superfície da pele. A camada próxima à externa é conhecida como estrato granuloso, devido à abundância de grânulos de queratina. As células mais externas do estrato granuloso secretam corpos lamelares, que formam o complexo lipídico de barreira, que retém a umidade do corpo, e protege contra microorganismos patógenos (14). As células na parte externa se combinam com o complexo lipídico para formar o estrato córneo, entrando na etapa final da diferenciação. Nessa etapa, os queratinócitos passam por mudanças profundas em sua estrutura, resultando em corneócitos, que são células mortas planas cercadas por camadas de proteínas densamente reticuladas, como filagrina e queratina, enquanto os filamentos intermediários perdem simultaneamente todos as suas

organelas citoplasmáticas, incluindo o núcleo. O estrato córneo (ou camada cornificada) cria uma barreira física para o exterior (13).

A derme é uma camada subjacente à epiderme, que é constituída por densa rede de tecido conjuntivo que possui entre 0,5 e 5 mm de espessura e contempla componentes celulares como fibroblastos, mastócitos, plasmócitos, linfócitos e células dendríticas dérmicas, além de denso colágeno e fibras elásticas produzidas por fibroblastos cutâneos. A derme conecta os tecidos, dão tenacidade à pele e fornece proteção estrutural para músculos e órgãos esqueléticos subjacentes. Conta ainda com vasos sanguíneos, canais linfáticos e nervos sensoriais. Por fim, possui anexos epidérmicos, também denominados de anexos cutâneos, que são estruturas inseridas na derme (17), como ilustra a Figura 1.

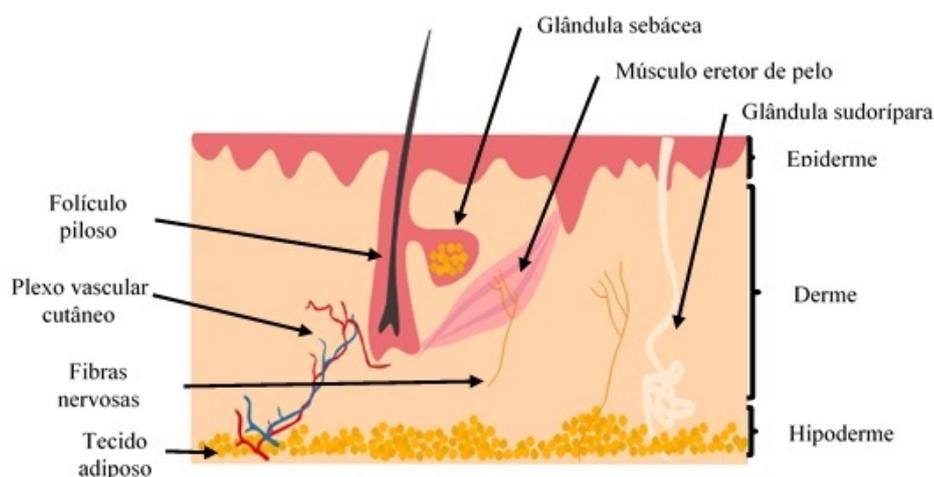


Figura 1. Estrutura da pele e seus anexos.

A unidade pilossebácea é um anexo cutâneo que compreende, como característica anatômica geral, o folículo piloso, suas glândulas sebáceas associadas e o músculo eretor de pelo. Essa unidade passa por ciclos de vida constantemente (18). O folículo piloso começa na superfície da epiderme e pode se estender até a derme para produção dos pelos terminais (19). O pelo tem papel importante na termorregulação, no isolamento físico, na sensibilidade aos estímulos nocivos e na comunicação social. No embrião em desenvolvimento, a morfogênese do folículo piloso é regulada por interações epiteliais e mesenquimais que ocorrem em quase todos os órgãos (20). Existem três segmentos importantes nos folículos pilosos: o infundíbulo, o istmo e o segmento inferior (que inclui o bulbo) (19,21).

Os folículos capilares variam consideravelmente em tamanho e forma, dependendo da sua localização, mas todos eles têm a mesma estrutura básica. As células

da matriz, em rápida proliferação no bulbo capilar produzem a haste capilar, cujo volume - o córtex - é composto por filamentos intermediários específicos do cabelo e proteínas associadas. O pigmento na haste capilar é produzido por melanócitos intercalados entre as células da matriz. À medida que as células da matriz se diferenciam e se movem para cima, os melanócitos são comprimidos e canalizados para forma final pela bainha rígida da raiz interna, cujas dimensões e curvatura determinam a forma do cabelo (18).

O folículo piloso é basicamente dividido na região entre a epiderme da superfície e a entrada do ducto da glândula sebácea (infundíbulo), a região entre a inserção do músculo eretor de pelo e o ducto da glândula sebácea (istmo), a região entre inserção do músculo eretor de pelo e bulbo (folículo inferior), e a porção mais baixa do folículo (raiz do cabelo ou bulbo) (22).

As glândulas sebáceas são um apêndice do folículo piloso, localizado acima da protuberância e do músculo eretor de pelo e logo abaixo do orifício da haste capilar na superfície da pele. O principal papel da glândula é gerar sebócitos terminalmente diferenciados, que produzem lipídios e sebo. Quando os sebócitos se desintegram, liberam esses óleos dentro do canal para lubrificação e proteção contra infecções bacterianas (15).

A hipoderme é a terceira camada mais interna da pele composta por adipócitos. Estes são organizados em lóbulos de gordura, que são separados uns dos outros por septos fibrosos. Essa camada conduz os principais feixes neurovasculares e linfáticos que suprem e drenam a pele e sua espessura varia de acordo com o estado nutricional do indivíduo (13).

Conforme citado anteriormente, uma das principais funções da pele é proteger o corpo contra influências indesejadas do meio ambiente. Nesse sentido, a principal barreira da pele está localizada em sua camada mais externa, o estrato córneo, rica em regiões lipídicas. Por formar uma única estrutura contínua, as substâncias aplicadas à pele sempre precisam passar por essas regiões. Portanto, esse é um obstáculo para a administração tópica de medicamentos (23). Dessa forma, os fármacos podem atravessar a barreira do estrato córneo por três vias, a via intercelular, na qual a substância se difunde contornando os corneócitos; a via transcelular, na qual o fármaco atravessa diretamente os corneócitos e a matriz intercelular intermediária; ou por rotas alternativas em que eles podem ser absorvidos pelas estruturas capilares, glândulas sebáceas ou sudoríparas (Figura 2) (24–26).

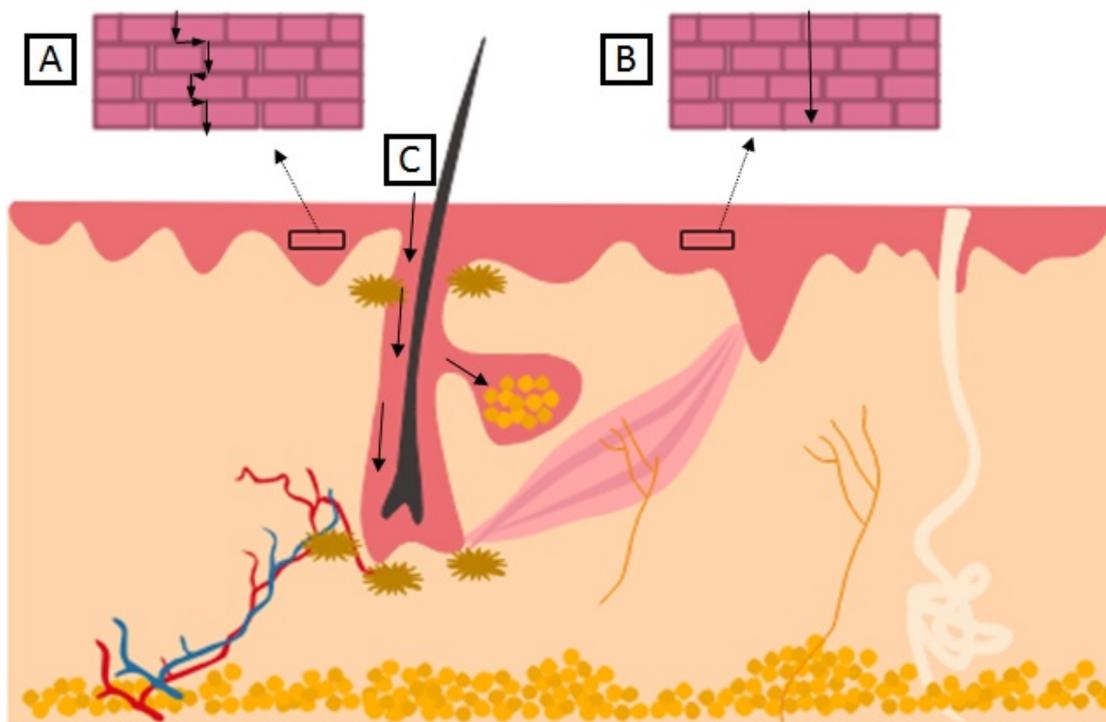


Figura 2. Representação esquemática das possíveis vias de penetração cutânea: (A) via de penetração intercelular, em torno dos corneócitos, (B) via de penetração intracelular através dos corneócitos, (C) via de penetração folicular.

Algumas características dos fármacos que podem favorecer a penetração e permeação através do estrato córneo são: possuir baixa massa molecular; possuir alta lipofilicidade, mas também uma certa hidrofiliicidade para não ficar completamente retida no estrato córneo; além das condições da pele na qual serão aplicadas e também a concentração na formulação, para garantir uma atividade termodinâmica que favoreça sua difusão (28).

2.2 Acne Vulgaris

A acne vulgaris é uma doença que acomete as unidades pilosebáceas da pele, que, como mencionado anteriormente, é formada pelo folículo capilar associado a uma glândula sebácea (29). As características clínicas da acne incluem seborreia (excesso de sebo), lesões não inflamatórias (comedões abertos e fechados), lesões inflamatórias (pápulas e pústulas), e vários graus de cicatrizes. A distribuição da acne corresponde à maior densidade de unidades pilosebáceas, que estão na face, pescoço, parte superior do peito, ombros e costas (1). A formação das lesões de acne passa por vários processos como alteração dos mediadores inflamatórios liberados na pele, alteração do processo de queratinização, que leva a formação de comedões, aumento ou produção alterada de

sebo, sob efeito androgênico e colonização folicular por *P. acnes* (1), conforme o esquema que está apresentado na Figura 3.

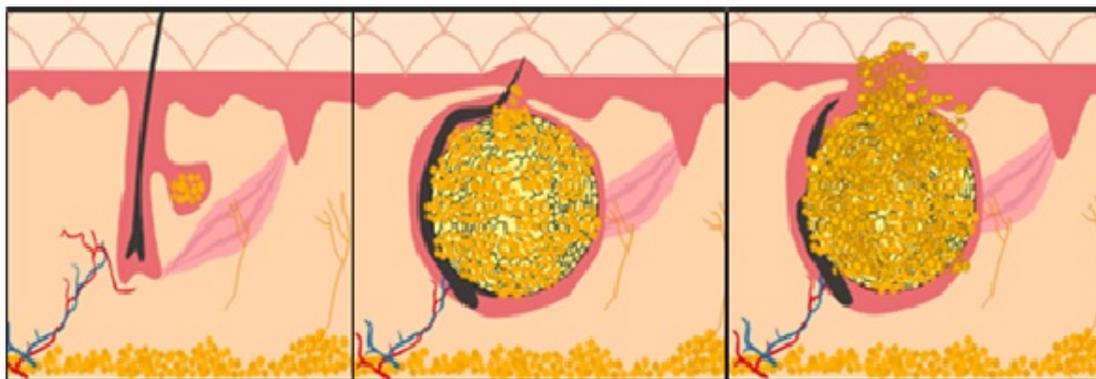


Figura 3. Representação da produção alterada de sebo no quadro de acne vulgaris.

Os folículos pilosebáceos possuem um ambiente anaeróbico e rico em lipídios, que é propício para o crescimento de microcomedões. Ademais, a presença de *P. acnes* aumenta diretamente a lipogênese, a liberação de ácidos graxos livres, e altera a queratinização folicular, estimulando a resposta inflamatória por meio da ativação de sinais metabólicos que regulam positivamente a imunidade inata e adaptativa (30). Além disso, cepas únicas de *P. acnes* com diferentes perfis de resistência colonizam diferentes unidades pilosebáceas e ativam as proteínas transmembrânicas de tipo I em queratinócitos e macrófagos, induzindo à inflamação (31).

Atualmente há um grande número de possíveis tratamentos para a acne. Dentre os tratamentos orais estão os antibióticos, que são geralmente reservados para pacientes com casos mais graves e que não respondem à terapia tópica; contraceptivos, pois o estrogênio suprime a atividade das glândulas sebáceas; e a isotretinoína, que é a medicação mais eficaz, resultando em cura clínica em cerca de 85% dos casos. No entanto, esta última está ligada a quadros de queilite (inflamação de uma ou ambas comissuras da boca), pele seca, hemorragia nasal, infecção secundária, piora temporária das lesões, sensibilidade fotográfica, lipídios séricos aumentados, risco aumentado de colite ulcerosa e teratogenicidade (32).

2.3 Opções de medicamentos tópicos para tratamento da acne

Dentre os tratamentos tópicos disponíveis para a acne estão as formulações contendo o peróxido de benzoila que, apesar de eficaz, causa uma irritação local inicial (1,6).

Os retinoides (tretinoína, adapaleno, tazaroteno), que possuem ação na queratinização anormal e também são anti-inflamatórios, também são bastante indicados, mas o uso é limitado para pacientes grávidas e exigem cuidados para mulheres em idade fértil. O uso tópico de retinóides também podem causar reações locais e aumentar a sensibilidade da pele à luz ultravioleta (1).

Por fim, os antibióticos, que possuem ação direta nos *P. acnes* e reduzem a inflamação, são bastante utilizados em formulações tópicas e nessa classe de medicamentos estão incluídos o fosfato de clindamicina, a eritromicina e a tetraciclina (32).

De acordo com as diretrizes de cuidados para o manejo da acne vulgar publicado pelo *Journal of the American Academy of Dermatology*, em 2016, o tratamento com antibióticos tópicos, como a clindamicina e a eritromicina, recebeu recomendação A, que seria aquela baseada em evidências consistentes e de boa qualidade em pacientes assistidos. Já a evidência foi classificada usando uma escala de 3 pontos com base na qualidade da metodologia utilizada (como teste de controle randomizado, controle de caso, coorte prospectivo / retrospectivo, série de casos etc.) e o foco geral do estudo (isto é, diagnóstico, tratamento / prevenção / triagem ou prognóstico). Nesse caso, o nível das evidências foi classificado em I e II. Sendo o nível I classificado como evidência de boa qualidade em pacientes assistidos e nível II como evidência limitada. Ainda de acordo com a referida diretriz, a escolha da terapia tópica pode ser influenciada pela idade do paciente, local do envolvimento, extensão, gravidade da doença e preferência do paciente (6).

As terapias tópicas podem ser usadas como monoterapia, combinação com outros agentes tópicos ou em combinação com agentes orais tanto no controle inicial, como na manutenção (7).

2.4 Fosfato de clindamicina

O fosfato de clindamicina (7(S)-cloro-7-desoxilincomicina) é um antibiótico sistêmico que foi produzido pela primeira vez em 1966. Trata-se de um derivado da lincomicina obtido por substituição química do 7(R)-grupo hidroxila por um substituinte 7-cloro (33,34). A alteração proporciona várias vantagens em relação ao composto original, como melhor absorção no trato gastrointestinal, maior eficiência contra cocos gram-positivos aeróbicos e ampliação do espectro de ação, que incluiu muitas bactérias

gram-positivas e gram-negativas anaeróbicas e protozoários, como *Toxoplasma sp.* e espécies de *Plasmodium sp* (33).

A clindamicina liga-se à subunidade 50S ribossômica da bactéria e inibe a sua síntese proteica. Essa inibição altera a superfície bacteriana de forma a facilitar a fagocitose e a morte intracelular (35). Além disso, mesmo em concentrações sub-inibitórias, a clindamicina pode potencializar a opsonização e a fagocitose (36).

Esse fármaco encontra-se disponível nas formas de cloridrato, palmitato e fosfato. Entretanto, o sal cloridrato e a composição do veículo podem afetar a extensão da absorção, que pode chegar a níveis sistêmicos e, por esse motivo, para acne, o éster fosfato é o mais indicado, minimizando a absorção sistêmica e diminuindo os efeitos colaterais por resultar em menor absorção transdérmica do fármaco e dessa forma diminuir a ocorrência de efeitos colaterais indesejados (37). Além disso, a aplicação tópica permite a administração da clindamicina diretamente em seu local de ação. Verifica-se, contudo, que o éster fosfato é um pró-fármaco que não possui atividade antibacteriana *in vitro*; dessa forma ele precisa ser hidrolisado na forma ativa. Essa ativação *in vivo* é realizada pela ação das fosfatases presentes na pele (38,39).

O fosfato de clindamicina é descrito como um pó branco ou quase branco, higroscópico, inodoro ou praticamente inodoro e com sabor amargo. É livremente solúvel em água, ligeiramente solúvel em álcool desidratado, muito ligeiramente solúvel em acetona e praticamente insolúvel em clorofórmio, benzeno e éter. Apresenta massa molecular de $504,96 \text{ g mol}^{-1}$, fórmula molecular $\text{C}_{18}\text{H}_{34}\text{ClN}_2\text{O}_8\text{PS}$, LogP 0,57, pKa de 6,9 e pH entre 3,5 e 4,5 em solução aquosa a 1% (40). A sua fórmula estrutural está representada na Figura 4.

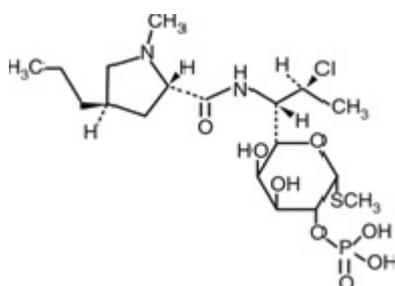


Figura 4. Fórmula estrutural do fosfato de clindamicina (CDM) (Massa molecular: $504,96 \text{ g mol}^{-1}$ e Log P: 0,57).

A clindamicina é cerca de oito vezes mais ativa que a lincomicina contra *S. aureus* e *S. pneumonia*, além de também ser ativa contra *S. epidermidis*, *S. pyogenes*, *S. pneumoniae* e *Streptococcus viridans* e, geralmente, ser ativa contra cocos gram-

positivos anaeróbicos. As espécies *Propionibacterium*, *Bifidobacterium* e *Lactobacillus*, que raramente causam infecções sistêmicas, também são suscetíveis a ela, além das cepas de *Plasmodium falcipum* e *Toxoplasma gondii* (35,41).

Recentemente, no Brasil, o Ministério da Saúde incorporou o fosfato de clindamicina, em sua forma tópica (1% em gel ou loção), ao protocolo clínico e diretrizes terapêuticas (PCDT) de hidradenite supurativa, que é uma doença cutânea, inflamatória e crônica, do folículo piloso, caracterizada por nódulos e abscessos dolorosos e recorrentes que se rompem e levam a tratos sinusais e cicatrizes (42).

Dentre os principais efeitos adversos da clindamicina de uso sistêmico estão disfunções gastrointestinais, diarreia, hepatotoxicidade, reações de hipersensibilidade, flebite, ocasionalmente neutropenia e trombocitopenia, prolongamento do bloqueio neuromuscular, eritema, ardor, prurido e principalmente colite pseudomembranosa (35). Dessa forma, a terapia tópica tem sido indicada para acne vulgaris por diminuir substancialmente a ocorrência desses efeitos adversos, por proporcionar menor ação sistêmica, uma vez que a exposição se limita à área aplicada, além de permitir a administração de doses menores do fármaco (43).

No entanto, apesar da via tópica diminuir a ocorrência dos efeitos adversos relacionados ao fármaco, o grau de absorção de fármacos hidrossolúveis como a clindamicina na pele tende a ser limitado. Além disso, ela pode provocar irritações e reações alérgicas pela ação dos fármaco ou excipientes presentes da formulação e, portanto, uma melhora nas características da formulação tópica contendo clindamicina é altamente requerida (44).

Isso posto, os sistemas nanoparticulados têm apresentado resultados promissores como sistemas de liberação de fármacos, pois permitem utilizar doses menores do fármaco, além de direcioná-lo ao local de ação pretendido, evitando efeitos adversos por acúmulo em outros tecidos. Adicionalmente, podem promover liberação progressiva do fármaco, de forma a reduzir a necessidade de várias reaplicações do medicamento ao longo do dia, mantendo níveis eficazes e seguros do fármaco em seu local de ação durante o período de tratamento (9).

2.5 Nanotecnologia

Nos últimos anos o uso da nanotecnologia tem aumentado e as suas aplicações já contemplam áreas como a da indústria têxtil, agricultura, eletrônica, ciência forense, médica e farmacêutica. Com os contínuos avanços na síntese de nanopartículas (NP) e

na interface delas com os sistemas biológicos, surgiu o crescimento exponencial no uso de nanopartículas para aplicação terapêutica de medicamentos (45). Em geral, o uso de partículas nanométricas oferece várias vantagens sobre outros sistemas de administração de medicamentos. Dentre elas estão a melhora na solubilidade de fármacos altamente hidrofóbicos, liberação sustentada e controlada de fármacos encapsulados, aumento da estabilidade dos agentes terapêuticos, concentrações mais altas de medicamentos nas áreas-alvo e tratamentos direcionados, especialmente quando a superfície das nanoestruturas estão modificadas com ligantes específicos para as células-alvo (46).

Diferentes materiais podem compor os nanossistemas, dentre eles polímeros naturais ou sintéticos, lipídios ou metais. Dependendo da estrutura e composição, os nanossistemas podem ser denominados como nanopartículas poliméricas, nanopartículas magnéticas, dendrímeros, nanotubos e nanossistemas lipídicos (47).

Com relação à aplicação tópica de nanopartículas sólidas, estudos têm mostrado que quando aplicadas topicamente elas geralmente acumulam-se nos folículos capilares e facilitam assim a penetração das moléculas de fármacos nela encapsuladas através das camadas superficiais do estrato córneo, seguido pela liberação do fármaco nas camadas mais profundas da pele (9,45,46,48).

As nanopartículas poliméricas são sintetizadas utilizando vários métodos, de acordo com as necessidades da aplicação e do tipo de fármaco a ser encapsulado, como por exemplo gelificação ionotrópica, microemulsão, emulsificação-difusão do solvente e formação de complexos polieletrônicos (49). Dentre as nanopartículas poliméricas, as biodegradáveis são preferenciais, pois fornecem propriedade de liberação controlada/sustentada, tamanho subcelular e biocompatibilidade com tecidos e células. Além disso, são estáveis, não-tóxicas, não-trombogênicas, não-imunogênicas, não-inflamatórias, não ativam neutrófilos, biodegradáveis e aplicável a várias moléculas, como fármacos sintéticos, proteínas, peptídeos ou ácidos nucleicos (45). São exemplos de polímeros biodegradáveis utilizados para o preparo de nanopartículas: quitosana (QS), ácido hialurônico (AH), policaprolactona (PCL), ácido poli láctico (PLA), polibutileno succinato-co-butileno dilinoleato (PBS:PBDL), e o poli (ácido láctico-co-ácido glicólico) (PLGA)

2.6 Polímeros utilizados no preparo de nanopartículas

2.6.1. *Quitosana*

Embora uma ampla gama de polímeros naturais tenha sido usada para o preparo de nanopartículas, aqueles à base de quitosana (Figura 5) têm sido os mais amplamente estudados para medicamentos tópicos (50). A quitosana é um polissacarídeo linear derivado da quitina, encontrada no exoesqueleto de crustáceos (51,52). O grupo amino da quitosana sofre protonação em condições ácidas a neutras, resultando em uma carga líquida positiva. Isso torna a quitosana solúvel em água e ainda funciona como um bioadesivo, uma vez que a quitosana com carga positiva pode se ligar a mucoproteínas com carga negativa das células e de secreções de membranas mucosas. (50,53) Essa interação ajuda a prolongar o tempo ação de medicamentos contendo quitosana, levando à maior biodisponibilidade e efetividade do medicamento. Um estudo recente, por exemplo, utilizando esse polímero apresentou-se como um sistema de liberação muito promissor para a terapia tópica da alopecia utilizando o minoxidil, pois foi capaz de aumentar rapidamente a quantidade de fármaco no seu local de ação e manter praticamente constante a concentração desse fármaco no local, além de restringir a entrada do fármaco para camadas mais profundas da pele (9).

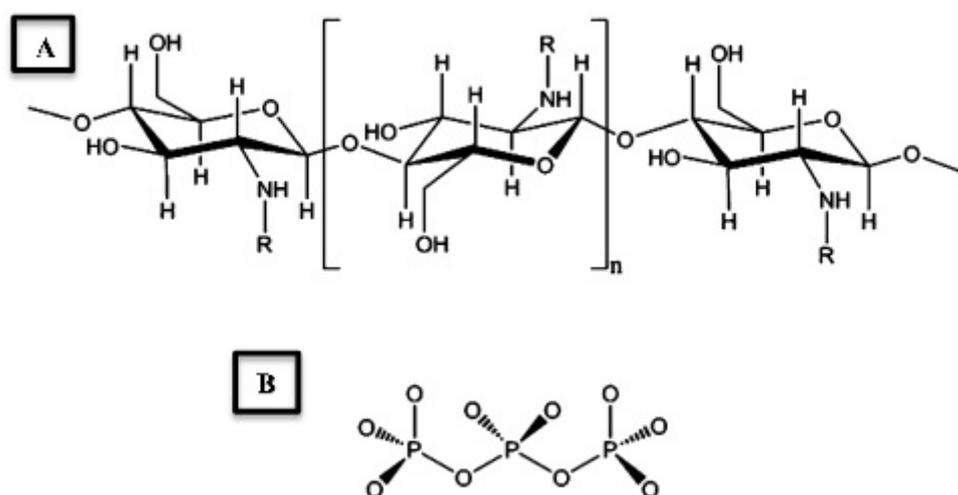


Figura 5. Fórmula estrutural da quitosana (A) e do tripolifosfato de sódio (B).

Nanopartículas de quitosana podem ser preparado usando métodos como gelificação ionotrópica, reticulação covalente, precipitação, polimerização ou automontagem, com tamanhos variando de 20 a 800 nm, dependendo do método de preparação (46).

Dos métodos citados, as nanopartículas produzidas por gelificação ionotrópica é uma das mais utilizadas, por possuir condições de processamento brando, aquoso, utilização de reagentes não tóxicos e baixos requisitos de energia (51). O polianion mais comumente utilizado nessa metodologia é o tripolifosfato, que não é tóxico (53).

Todavia, sua relação molar com a quitosana são cruciais para a formação do diâmetro médio das nanopartículas e esse parâmetro pode afetar diretamente a propriedade de liberação do medicamento (51,53).

2.6.2. *Ácido Hialurônico*

O ácido hialurônico (AH) é um polissacarídeo linear feito de unidades repetidas de ácido β -D-glucurônico e N-acetil β -D-glucosamina ligadas nas posições 1 - 4 e 1 - 3, respectivamente, como apresentado na Figura 6 (54-56). Esse polissacarídeo e seus derivados foram investigados extensivamente para aplicações biomédicas e farmacêuticas, como engenharia de tecidos, tratamento de artrite, cirurgia ocular, administração de medicamentos (54,57). Seus grupos funcionais na cadeia principal permitem modificações químicas e isso facilita com que o ácido seja utilizado no preparo de várias formulações relacionadas à nanomedicina como conjugados, nanotubos, dendrímeros, lipossomas e nanopartículas automontadas (58).

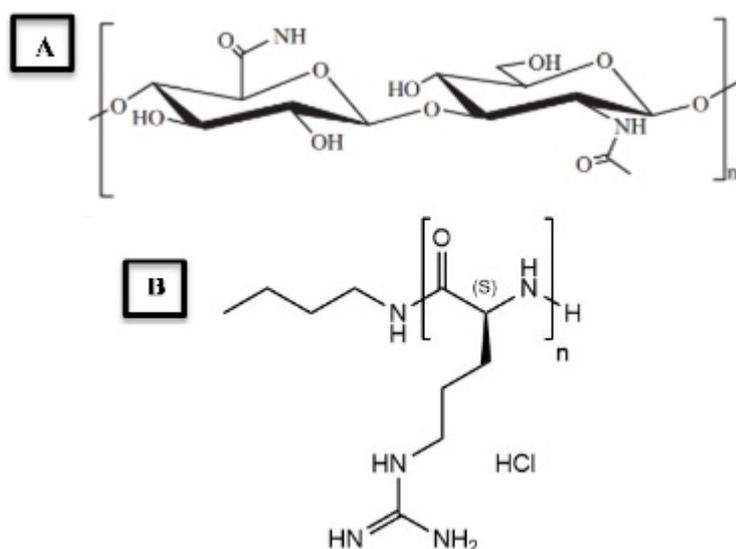


Figura 6. Fórmula estrutural do ácido hialurônico (A) e da poliarginina (B).

Sua massa molecular pode chegar a $8,10^6$ Da, 10^7 Da ou 10^8 Da, de acordo com enzima que catalisou sua síntese (54,56). Devido a esses altos valores de massa molecular e fortes interações intermoleculares, as soluções aquosas de ácido hialurônico são altamente viscosas e degradação por meio de hidrólise em condições alcalinas é mais acentuada e rápida do que em condições ácidas (54).

O ácido hialurônico possui boa biocompatibilidade, biodegradabilidade e não imunogenicidade (58). Além disso, tem a capacidade de reconhecer receptores específicos superexpressos na superfície de células tumorais, e direcionar de fármacos

para essas células (59). Dessa forma, o ácido hialurônico tem sido alvo de estudo para o direcionamento de fármacos como, ácidos nucleicos, peptídeos e proteínas conjugados de ação prolongada, liberação sustentada de proteínas, sistemas para direcionamento tumoral de conjugados ácido hialurônico-fármaco, sistemas para direcionamento tumoral que visa a administração de medicamentos a partir de derivados anfifílicos do ácido hialurônico e sistemas para direcionamento tumoral que visa a administração de medicamentos a partir modificação da superfície do ácido hialurônico (58,59).

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

O objetivo deste trabalho foi desenvolver nanopartículas com dois polímeros diferentes - quitosana e ácido hialurônico - contendo fosfato de clindamicina que sejam mais eficientes e seguras para o tratamento tópico da acne, ou seja, capazes de direcionar e ao mesmo tempo controlar a liberação do fármaco para os folículos pilosebáceos da pele.

3.2 Objetivos específicos

- Desenvolver e validar um método analítico por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) capaz de quantificar seletivamente o fosfato de clindamicina extraído das camadas da pele após experimentos de permeação cutânea;
- Realizar ensaios para garantir a compatibilidade entre fosfato de clindamicina e os polímeros utilizados para preparo das nanopartículas;
- Desenvolver nanopartículas poliméricas contendo fosfato de clindamicina, com características adequadas para deposição nos folículos pilosos;
- Caracterizar as nanopartículas poliméricas por meio de parâmetros como diâmetro hidrodinâmico, dispersão do tamanho, potencial zeta, pH e eficiência de encapsulação;
- Determinar *in vitro* o perfil de liberação da clindamicina a partir das dispersões de nanopartículas poliméricas;
- Avaliar *in vitro* a penetração/permeação da clindamicina a partir das nanopartículas poliméricas, elucidando a importância de cada via e direcionamento folicular do fármaco em diferentes condições da pele;
- Estudar *in vitro* a segurança da formulação contendo as nanopartículas desenvolvidas por avaliação do potencial irritativo (HET-CAM).

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Material

O fosfato de clindamicina ($\geq 99,0\%$) foi obtido da Sigma-Aldrich (Steinheim, Alemanha). Os solventes utilizados nas análises cromatográficas, acetonitrila e ácido fosfórico foram obtidos da J. T. Baker (Phillipsburg, EUA) e Sigma-Aldrich (Steinheim, Alemanha), respectivamente. O etanol utilizado no ensaio de solubilidade foi obtido da J. T. Baker (Phillipsburg, EUA). Para o preparo das nanopartículas, quitosana de baixo peso molecular, ácido acético, tripolifosfato de sódio e poliarginina foram adquiridos da Sigma-Aldrich (Steinheim, Alemanha). O ácido hialurônico de alto peso molecular foi adquirido da Bio Products (São Paulo, Brasil). Para preparação do tampão foram utilizados fosfato de sódio nas formas monobásica e dibásica (Vetec, Rio de Janeiro, Brasil), HEPES (Vetec, Rio de Janeiro, Brasil) e cloreto de sódio (Serva, Rio de Janeiro, Brasil) e as correções de pH foram realizadas com hidróxido de sódio (Dinâmica Química Contemporânea Ltda. São Paulo, Brasil). A membrana hidrofílica de acetato de celulose utilizada nos experimentos de liberação (Dialysis Tubing MWCO 12000-14000, Fisherbrand) foi obtida da Fisher Cientific (Reino Unido). Para a verificação da eficiência de encapsulação foi utilizado o dispositivo concentrador de amostra (Vivaspin[®]2, Sartorius) adquiridos da Analítica (São Paulo, Brasil). A técnica de *tape-stripping* diferencial aplicada nos estudos de permeação foi realizada usando a fita Scotch no. 845 Book Tape (3M, St. Paul, MN, USA), cola de cianoacrilato (Henkel Loctite, Dublin, Irlanda) e metanol para extração de J. T. Baker (Phillipsburg, EUA). Para o teste de permeação utilizando pele seborréica foram utilizados óleo vegetal (Bunge, Santa Catarina, Brasil) e sebo de carneiro foi obtido de produtores autônomos (Brasília, DF). Como amostra comparadora, foi adquirida a formulação comercial, com registro sanitário vigente no País, Adacne Clin, gel dermatológico, produzido pela Glenmark Farmacêutica Ltda, Nasik, Índia. Os ovos de galinha utilizados nos estudos de irritação (HET CAM) foram gentilmente cedidos pela Avifran (Planaltina, Brasil). Filtros pré-limpos, de diâmetro 25 mm e poro 0,45 μm , hidrofóbicos e hidrofílicos, foram comprados de Analítica (São Paulo, Brasil). As orelhas dos suínos utilizadas nos estudos de permeação cutânea foram gentilmente cedidas pelo Frigorífico Nippobras (Formosa, Goiás, Brasil) ou adquiridas do Frigorífico Sabugi (Planaltina, Distrito

Federal, Brasil). Todas as análises foram realizadas utilizando água ultrapurificada (Millipore, Illkirch-Graffenstaden, França).

4.2 Ensaio de pré-formulação

a) Desenvolvimento da metodologia analítica

O método analítico utilizado para quantificação do fosfato de clindamicina foi aquele contemplado na monografia da Farmacopéia Brasileira 6^o edição (60) para o referido fármaco. Alterando-se apenas o tampão utilizado como fase móvel, utilizando ácido fosfórico 0,01 M ao invés de fosfato de potássio monobásico a 1,36%, e fixação da temperatura da coluna a 40° C, considerando a variabilidade de temperatura registrada no Distrito Federal. Foi avaliada a quantificação de clindamicina na presença de interferentes extraídos das camadas da pele. Dessa forma, considerando a existência de método analítico compendial, realizou-se a validação parcial da metodologia, por meio dos parâmetros: seletividade, linearidade, precisão e exatidão

i. Condições cromatográficas

As análises cromatográficas foram realizadas em um sistema de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) (modelo LC-20AD, Shimadzu, Kyoto, Japão) composto por duas bombas (modelo LC 20-AT), um forno (modelo CTO-20AS), um detector DAD espectrofotométrico (modelo SPD-M20A) e um injetor automático de amostras (modelo 9SIL-20AD). A aquisição de dados, análise e relatórios foram realizados usando o software Shimadzu LC. Como fase estacionária, utilizou-se uma coluna de fase reversa C₁₈ (25 cm x 4,6 mm, 5µm Discovery[®], Supelco). A fase móvel foi composta de (A) acetonitrila e (B) solução de ácido fosfórico (0,01 mol L⁻¹), na proporção 20:80, e eluiu a uma vazão de 1,0 mL min⁻¹. O forno foi mantido a 40 °C durante todas as análises. O fosfato de clindamicina foi detectado por absorvância a 200 nm e o volume de injeção de cada amostra foi de 20 µL.

ii. Obtenção das peles de suínos

As orelhas foram retiradas imediatamente após o abate do animal e antes do processo de escalda e mantida em refrigeração até seu processamento, que ocorreu no mesmo dia do abate.

Para obtenção dos fragmentos de pele a partir da orelha de porco, esta foi fixada por meio de alfinetes em um suporte de isopor recoberto com papel alumínio. Com o auxílio de um bisturi, a pele da região externa da orelha foi removida e separada de sua camada adiposa, muscular e vasos sanguíneos com o auxílio de uma tesoura, conforme mostrado na Figura 7.



Figura 7. Representação do processo de remoção da pele da orelha de suínos.

Após esse procedimento, as peles foram recortadas em círculos de aproximadamente 1 cm² e armazenadas a -4 °C por um período máximo de 2 meses antes do seu uso.

iii. Extração dos fármacos das camadas da pele de suínos

A extração do fosfato de clindamicina do estrato córneo, dos folículos pilosos e da pele remanescente foram testadas variando-se algumas condições. Para isso, utilizou-se a técnica de *tape-stripping* diferencial para separar as frações da pele (61), conforme esquematizado na Figura 8. Resumidamente, as peles de suínos que foram recortadas em círculos de aproximadamente 1 cm² foram fixadas por meio de alfinetes a um suporte de isopor recoberto com papel alumínio, com o estrato córneo voltado para cima. O estrato córneo foi retirado a partir da aplicação e retirada de 15 pedaços de fitas adesivas. Em seguida, os folículos pilosos foram removidos aplicando-se uma gota de cola de cianoacrilato à superfície da pele, seguida por um pedaço de fita adesiva. Após 1 min, tempo requerido para secagem da cola, a fita foi removida com um único movimento. Por fim, a pele restante foi cortada em pequenos pedaços com o auxílio de uma tesoura. Cada camada separada da pele foi então colocada em frascos de vidro separados foi contaminada com 350 µL da solução estoque (equivalente a 35 µg de clindamicina em metanol). Após completa evaporação do solvente, foram aplicados diferentes protocolos de extração (adição de 5 mL de água ou metanol à preparação e tempo de repouso de 12 ou 24 h), conforme ilustrado na Figura 8. Em seguida, as amostras foram filtradas em

membranas de 0,45 μm e levadas para análise seguindo o método por CLAE, de forma a verificar a capacidade de recuperação do fármaco na pele.

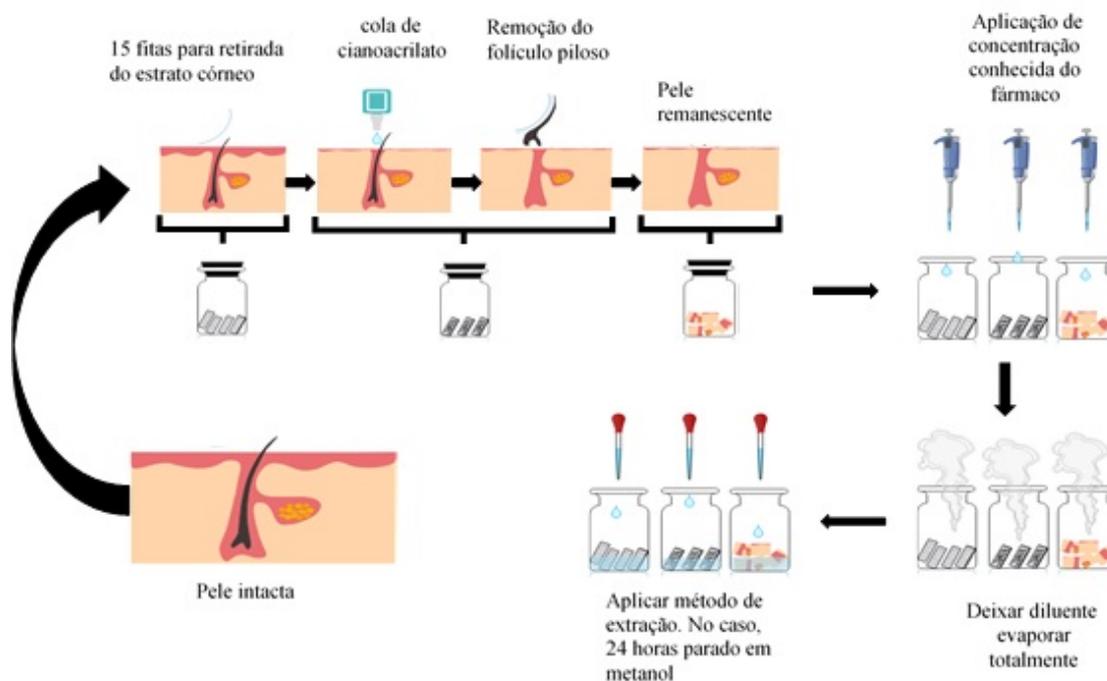


Figura 8. Representação da técnica de *tape-stripping* diferencial e os métodos de extração testados para a recuperação de fosfato de clindamicina (CDM) das camadas da pele.

iv. Validação do método

A confiabilidade e o desempenho analítico do método cromatográfico proposto foram comprovados por meio de validação parcial da metodologia com relação à seletividade, linearidade, precisão e exatidão de acordo com as diretrizes da RDC nº 166 de 24/07/2017 da ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária), que estabelece critérios para a validação de métodos analíticos empregados em insumos farmacêuticos, medicamentos e produtos biológicos em todas as suas fases de produção, do *International Conference on Harmonization* (ICH) e da Farmacopeia Brasileira (60,62).

v. Seletividade

Inicialmente foi preparada uma solução contendo os contaminantes da pele de suínos, extraídos a partir da técnica de *tape-stripping* diferencial, conforme descrito no item 4.2.2 acima, mas sem a contaminação das amostras da pele com o fármaco. Uma alíquota dessas três soluções foi adicionada a uma solução de fosfato de clindamicina em água na concentração de $7,0 \mu\text{g mL}^{-1}$. Em seguida, as amostras, contaminadas ou não, foram filtradas em membranas de $0,45 \mu\text{m}$ e levadas para análise seguindo o método

por CLAE, de forma a verificar a capacidade de quantificar e distinguir os fármacos dos interferentes da pele.

vi. Linearidade

Soluções de fosfato de clindamicina foram preparadas em triplicata a partir de três soluções estoque preparadas de maneira independente. Aliquotas dessas soluções foram diluídas em água para obter uma curva de calibração na faixa de concentração que foi de $0,5 \mu\text{g mL}^{-1}$ a $20 \mu\text{g mL}^{-1}$ (0,5; 2,0; 5,0; 7,0; 10,0; 15,0 e $20,0 \mu\text{g mL}^{-1}$). As curvas de calibração para a concentração *versus* a área do pico foram plotadas para se calcular a regressão linear. Os fatores de resposta foram calculados considerando a razão entre a área do pico e a concentração dos analitos.

vii. Precisão

A precisão do método foi determinada pela repetibilidade instrumental, repetibilidade do método (precisão intra-dia) para o fármaco. A repetibilidade instrumental foi determinada utilizando a mesma amostra na concentração de $7,0 \mu\text{g mL}^{-1}$ para o fármaco em seis análises realizadas durante um curto período de tempo. As concentrações de fosfato de clindamicina foram determinadas e os coeficientes de variação (CV) foram calculados.

viii. Exatidão

A exatidão do método foi avaliada com base na porcentagem de fosfato de clindamicina recuperados do estrato córneo, folículos pilosos e pele remanescente utilizando o método de extração otimizado. Todos os ensaios foram realizados com seis repetições de amostras ($7,0 \mu\text{g mL}^{-1}$).

Primeiro, os fragmentos das camadas da pele foram separados seguindo a técnica de *tape-stripping* diferencial mencionada anteriormente (seção 2.5). Amostras de uma solução do fármaco em água foram então aplicadas nas superfícies de cada camada de pele. O solvente foi completamente evaporado e 5 mL de metanol foram adicionados a cada fragmento de pele e deixados em repouso durante 24 h. Após este período de tempo, as amostras foram filtradas através de uma membrana de $0,45 \mu\text{m}$.

Finalmente, as amostras foram analisadas em CLAE-UV pela metodologia descrita acima. A exatidão foi relatada como uma porcentagem de fosfato de clindamicina recuperados das camadas da pele.

b) Solubilidade do fosfato de clindamicina

A solubilidade do fosfato de clindamicina foi determinada para os seguintes solventes: tampão HEPES pH 7,4; tampão fosfato pH 7,4, água e etanol. A escolha dos solventes foi realizada com base no logP do fármaco ($\log P = 0,57$), que é uma medida quantitativa da lipofilicidade. Assim, a frascos com tampa foram adicionados 3 mL dos respectivos solventes. Aos diferentes solventes foi adicionada uma quantidade do fármaco suficiente para formar corpo de fundo por um período de 15 minutos sob agitação constante. Após 48 horas sob temperatura ambiente a 700 rpm, as amostras foram centrifugadas a 4000 rpm por 10 minutos. Em seguida, as alíquotas sobrenadantes das amostras foram filtradas em membranas de 0,45 μm e levadas para análise seguindo o método por CLAE. O ensaio foi realizado em triplicata para cada solvente.

c) Estudos de compatibilidade

Os estudos de compatibilidade foram realizados por meio da análise das características térmicas dos fármacos individualmente, da mistura física dos fármacos na mesma proporção (m/m) e das nanopartículas liofilizadas. As amostras foram submetidas aos estudos de compatibilidade utilizando-se as técnicas de análise térmica que se seguem.

i. Calorimetria de varredura diferencial

As análises de calorimetria de varredura diferencial (DSC) foram realizadas em um DSC-60 (Shimadzu®, Tokyo, Japan), sob atmosfera controlada de nitrogênio com vazão de 50 mL min^{-1} . Amostras de aproximadamente 3 mg foram analisadas sob uma taxa de aquecimento de 10° C min^{-1} de 25 a 500° C. O aquecimento foi realizado com o cadinho coberto. Todas as medições térmicas foram realizadas usando o software TA-60 Shimadzu®.

ii. Análise termogravimétrica (TGA)

Avaliações de termogravimetria foram realizadas usando um DTG-60H (Shimadzu, Japão). As amostras foram pesadas (3 – 5 mg) em cadinhos de platina em atmosfera de nitrogênio com vazão de 50 mL min^{-1} e velocidade de aquecimento de 10° C min^{-1} no intervalo entre 25 a 300° C. Todas as medições térmicas foram realizadas usando o software TA-60 Shimadzu®.

4.3 Desenvolvimento de nanopartículas

4.3.1 Nanopartículas de quitosana

Nanopartículas de quitosana foram preparadas pelo método de gelificação ionotrópica, conforme descrito por Calvo, 1997, com algumas modificações no que se refere ao método de agitação. Primeiramente, a quitosana foi dispersa em ácido acético a 1 % e solubilizada *overnight*, e então o pH foi ajustado para 5,0 (63). O fosfato de clindamicina foi disperso na solução de quitosana de modo que sua concentração final fosse 0,1 % (m/v). Então, foi preparada uma solução de TPP em água purificada. Foram utilizadas duas técnicas de preparação das nanopartículas. Na primeira, esquematizada na Figura 9, as nanopartículas de quitosana foram obtidas espontaneamente quando a solução de TPP foi gotejada na solução de quitosana contendo o fármaco, sob agitação magnética (700 rpm) à temperatura ambiente. Em seguida a dispersão foi sonicada por 3 (três) minutos, alternando entre OFF e ON a cada 15 segundos, a uma amplitude de 30 %. Na segunda técnica, esquematizada na Figura 10, a solução contendo o fármaco foi mantida sob sonicação por 10 minutos, alternando entre OFF e ON a cada 30 segundos, e a solução de TPP foi gotejada na solução de quitosana nos momentos em que o ultrassom se encontrava em modo ON. Além da técnica de preparo, foram realizadas alterações na proporção de quitosana e TPP, conforme descrito na Tabela 1, a seguir.

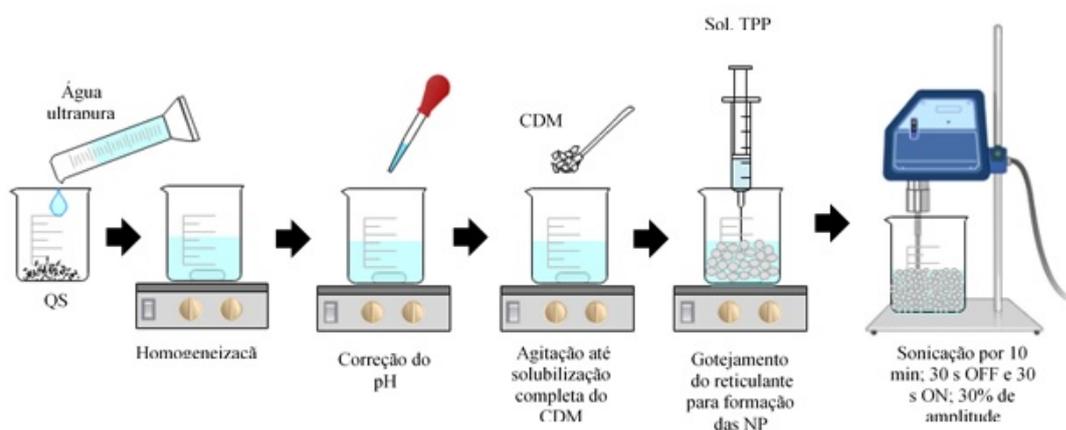


Figura 9. Representação do preparo das nanopartículas de quitosana com a etapa de sonicação após o gotejamento do reticulante. QS: quitosana; CDM: fosfato de clindamicina; TPP: tripolifosfato; NP: nanopartícula.

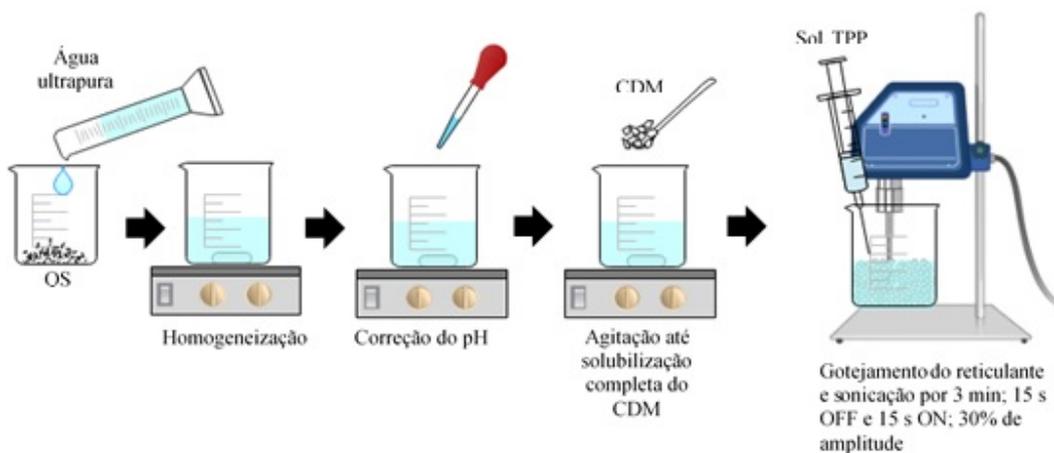


Figura 10. Representação do preparo das nanopartículas de quitosana com a etapa de sonicação durante o gotejamento do reticulante. QS: quitosana; CDM: fosfato de clindamicina; TPP: tripolifosfato; NP: nanopartícula.

4.4.2 *Nanopartículas de ácido hialurônico*

Nanopartículas de ácido hialurônico foram preparadas como descrito por Oyarzun-Ampuero, 2011, com algumas modificações (64). Primeiramente, o ácido hialurônico a 10 % foi disperso em água purificada e o fosfato de clindamicina foi disperso nessa solução de modo que sua concentração final fosse 0,1 % (m/v). Posteriormente, foi preparada uma solução de poli L-arginina em água purificada. Então, as nanopartículas de ácido hialurônico foram obtidas espontaneamente quando a solução de poli L-arginina foi gotejada na solução de ácido hialurônico contendo fosfato de clindamicina sob agitação magnética constante (700 rpm). Por fim, a dispersão foi sonicada por 7 (sete) minutos, alternando entre OFF e ON a cada 15 segundos, a uma amplitude de 30 %, à temperatura ambiente, conforme (Figura 11).

A concentração de polímeros em relação ao reticulante e ao fármaco foi variada conforme descrito na Tabela 1, bem como a forma de agitação utilizada na técnica de preparo.

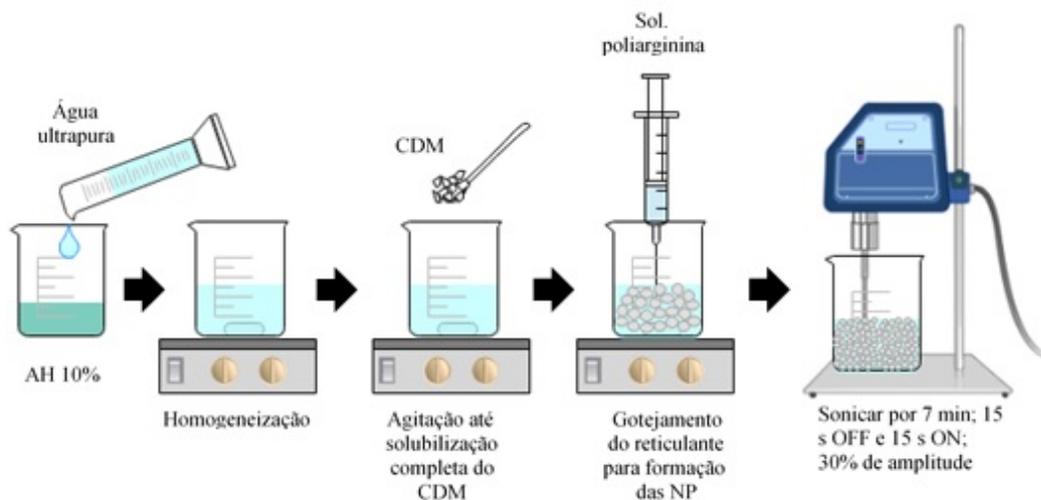


Figura 11. Representação do preparo das nanopartículas de ácido hialurônico. AH: ácido hialurônico; CDM: fosfato de clindamicina; NP: nanopartícula.

Tabela 1 - Concentração dos componentes das nanopartículas e métodos de preparo

Descrição	Polímero	Reticulante	Razão Polímero /Reticulante	Razão (Polímero/ CDM)	Método de agitação
NP-QS-CDM-1	QS	TPP	15,00	3,75	sonicador
NP-QS-CDM-2	QS	TPP	30,00	3,75	sonicador
NP-QS-CDM-3	QS	TPP	15,00	3,75	agitador magnético e sonicador
NP-QS-CDM-4	QS	TPP	30,00	3,75	agitador magnético e sonicador
NP-HA-CDM-1	HA	PLA	4,17	2,25	agitador magnético e sonicador
NP-HA-CDM-2	HA	PLA	20,00	2,25	agitador magnético e sonicador
NP-HA-CDM-3	HA	PLA	25,00	2,25	agitador magnético e sonicador
NP-HA-CDM-4	HA	PLA	100,00	2,25	agitador magnético e sonicador

4.4.3 Caracterização das nanopartículas (quitosana e ácido hialurônico)

As nanopartículas desenvolvidas foram todas caracterizadas por meio da determinação do seu diâmetro hidrodinâmico médio, da análise de distribuição de tamanho (índice de polidispersividade, PDI), do potencial zeta, do pH, e da eficiência de encapsulação do fármaco, de acordo com as metodologias descritas abaixo. Todos os experimentos de caracterização foram realizados em triplicata para cada formulação.

i. Diâmetro hidrodinâmico

O diâmetro hidrodinâmico médio e o PDI foram determinados por espalhamento de luz dinâmico por meio do equipamento Zetasizer Nano (NANO ZS90, Malvern, Worcestershire, Reino Unido). Para tanto, 100 µL de cada dispersão foram suspensos em 900 µL de água ultrapura e levados ao aparelho para análise.

ii. Potencial zeta

O potencial zeta foi analisado por mobilidade eletroforética por meio do equipamento Zetasizer Nano (NANO ZS90, Malvern, Worcestershire, Reino Unido). Para tanto, 100 µL de cada dispersão foram suspensos em 900 µL de água ultrapura e levados ao aparelho para análise.

iii. pH

Os valores de pH foram medidos pela imersão direta do eletrodo na dispersão não diluída. Para a determinação do pH, foi utilizado um potenciômetro calibrado (Modelo MPA-210, MS-Tecnoyon, São Paulo, Brasil).

iv. Morfologia

A morfologia das partículas, bem como a confirmação da distribuição de tamanho delas, foi analisada por microscopia eletrônica de varredura (MEV JOEL, JSM-7000 IF) e microscopia eletrônica de transmissão (MET, modelo JEM 1011, do departamento de Biologia Celular – CEL do instituto de Biologia da Universidade de Brasília). Para a análise no MEV, uma gota de cada uma das amostras de nanopartículas foi colocada em uma fita condutora de carbono e as fitas foram deixadas à temperatura ambiente até completa evaporação do solvente. Em seguida, as amostras foram metalizadas com ouro e analisadas. Para análise no MET, as amostras foram diluídas na

proporção de 1:200 μL em grades de ouro recobertas de resina “formvar”, e deixadas secar em temperatura ambiente por 5 minutos. O excesso da formulação foi retirado com auxílio de papel filtro. Após essa etapa, foram adicionados 3 μL do contrastante acetato de uranila a 3% e deixado secar protegido da luz por mais 5 minutos em temperatura ambiente. Ao final o excesso foi removido com papel filtro e a amostra levada para análise.

v. Eficiência de encapsulação

A eficiência de encapsulação foi determinada por método indireto, avaliando-se a quantidade de fármaco livre dissolvido no meio frente à quantidade total de fármaco utilizado no preparo das nanopartículas, conforme metodologia esquematizada na Figura 12. Inicialmente 2 mL das nanopartículas foram adicionadas a dispositivos descartáveis de ultrafiltração para a concentração de amostras (Vivaspin[®]2) e centrifugadas a 4000 rpm durante 20 minutos. Posteriormente, uma alíquota de 350 μL da fração inferior do dispositivo (filtrado) foi adicionada a um balão volumétrico de 50 mL e água ultrapura foi adicionada até completar o volume, chegando a concentração final teórica de 7 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (100 %) de clindamicina. Por fim, as amostras foram homogeneizadas e filtradas em seringas acopladas às membranas hidrofílicas de porosidade de 0,45 μm e quantidade de fármaco foi determinada por CLAE-UV, de acordo com o método descrito acima.

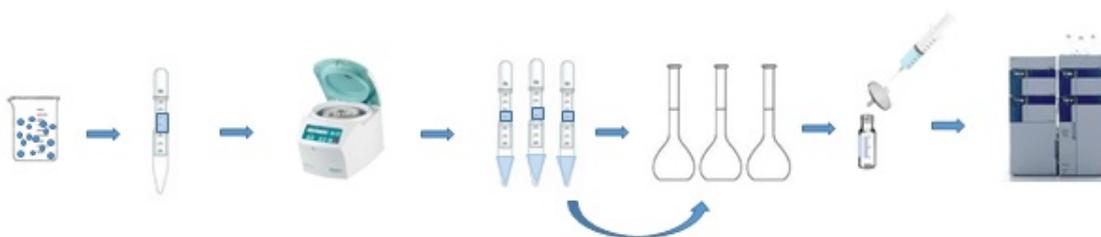


Figura 12. Representação do protocolo de eficiência de encapsulação (EE) por método indireto.

A eficiência de encapsulação foi calculada de acordo com a equação I:

$$EE (\%) = \frac{FL}{FT} \times 100$$

onde: EE = eficiência de encapsulação, FT = quantidade total de fármaco; e FL = quantidade de fármaco livre.

4.4 Estudos *in vitro* de liberação de fosfato de clindamicina a partir das nanopartículas

Células de difusão do tipo *Franz* modificadas (Figure 13) foram montadas com uma membrana de acetato de celulose, previamente lavada com água ultrapurificada fervente para a retirada de impurezas, separando os compartimentos doador e receptor.

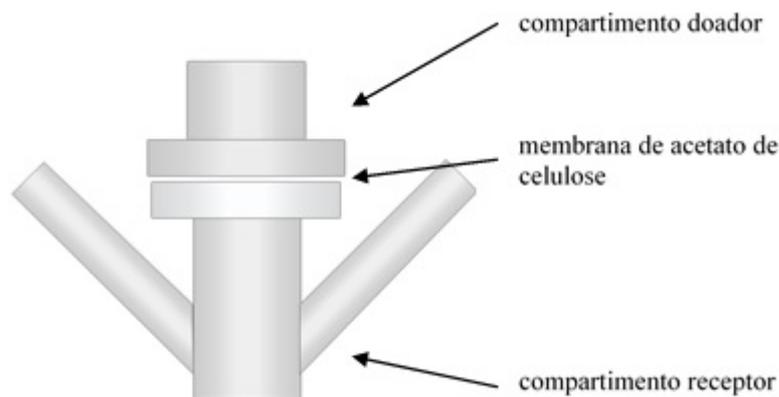


Figura 13. Célula tipo Franz modificada.

No compartimento doador, sobre as membranas, foram adicionados 500 μ L de cada nanopartícula e da formulação comercial. O compartimento receptor foi preenchido com 15 mL de solução tampão fosfato, pH 7,4. Durante todo o tempo de experimento, a temperatura das células foi mantida a 32° C, e o líquido receptor foi agitado a 300 rpm com o auxílio de uma barra magnética por um período de 24 h. O experimento foi realizado em quintuplicata para cada formulação.

A cada tempo de coleta, uma alíquota de 1 mL da solução receptora foi coletada e igual volume de solução tampão fosfato, pH 7,4 foi imediatamente repostado. Amostras das soluções receptoras foram coletadas nos tempos 0,5; 1,0; 1,5; 2,0; 2,5; 3,0; 3,5; 4,0 e 24 h. As alíquotas foram filtradas em seringas acopladas as membranas de porosidade de 0,45 μ m. Posteriormente, a quantidade de fármaco liberada foi determinada por CLAE-UV, de acordo com o método descrito anteriormente.

O perfil de liberação da clindamicina a partir das formulações contendo nanopartículas foi analisado e comparado com o de uma formulação comercial contendo o fármaco por meio de métodos gráficos relacionando a quantidade liberada dos fármacos (μ g) em função do tempo (h).

4.5 Avaliação *in vitro* da penetração cutânea de fosfato de clindamicina a partir das nanopartículas

As peles utilizadas no experimento foram inicialmente tratadas de quatro formas distintas, a saber: (i) pele não-tratada, denominada pele intacta; (ii) pele com bloqueio artificial de todos os orifícios foliculares utilizando resina de esmalte (KIKO-806, Paris), denominada folículos selados; (iii) pele tratada com uma mistura sebácea com o auxílio de uma seringa (Figura 14), denominada pele sebácea; e (iv) pele sebácea após bloqueio artificial dos orifícios foliculares, denominada pele sebácea com folículos selados.

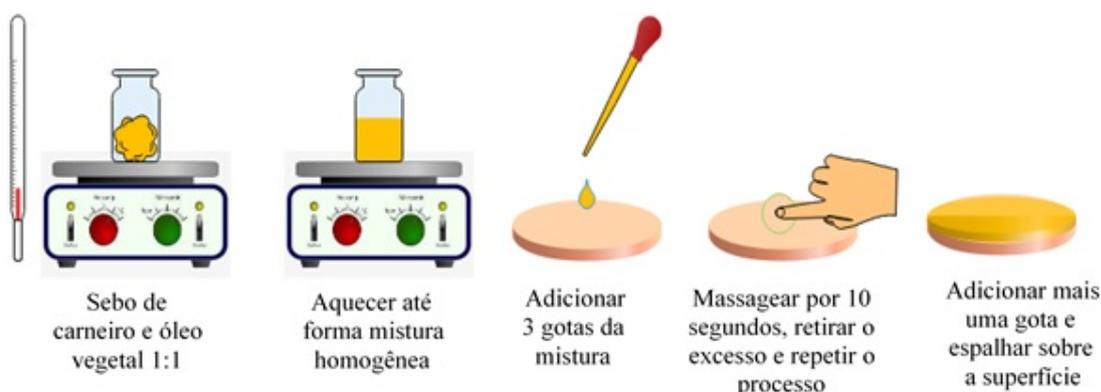


Figura 14. Esquema de processamento da pele sebácea.

Após o pré-tratamento das peles, elas foram montadas em células de difusão tipo Franz modificadas (área de difusão = 1,3 cm²) separando o compartimento doador do compartimento receptor. O compartimento receptor foi preenchido com 15 mL de um tampão fosfato pH 7,4. O compartimento doador foi preenchido com 1 mL de uma simples solução aquosa de fosfato de clindamicina ou 1 mL das nanopartículas NP-QS-CDM-3 e NP-AH-CDM-4. As células foram mantidas a uma temperatura de 32° C, com sob agitação magnética (300 rpm) por um período de 24 h. Os ensaios foram conduzidos em quadruplicata para cada formulação e tipo de pele.

Ao final das 24 h, a pele foi removida da célula de difusão e colocada na posição vertical, para retirada do excesso da formulação, com aplicação de água ultrapurificada por um período de 10 segundos e posteriormente colocada em superfície plana com o estrato córneo voltado para cima. O estrato córneo da pele foi então removido com a aplicação de 15 fitas adesivas. Em seguida, uma gota de supercola de cianoacrilato foi aplicada na mesma área da pele e coberta com uma outra fita adesiva usando pressão leve. Após polimerização total da cola (\pm 1 min), a fita foi removida e a biópsia dos folículos pilosos foi obtida. Por fim, a pele remanescente foi picotada com o auxílio de uma tesoura.

Os fragmentos de cada camada da pele foram colocados em recipientes de vidro com 5 mL de metanol sem agitação por 24 h. As alíquotas resultantes foram filtradas em filtros de 0,45 μm e a quantidade de clindamicina recuperada da pele foi quantificada seguindo método por CLAE descrito acima.

4.6 Avaliação *in vitro* do potencial irritativo das nanopartículas de QS e AH (HET-CAM)

O grau de irritabilidade das nanopartículas foram avaliados utilizando o ensaio “hen's egg-chorioallantoic membrane test” (HET-CAM) a partir de ovos de galinha no 10º dia de fertilização. Primeiramente os ovos foram colocados em suporte, de modo que a câmara de ar ficasse voltada para cima. Com o auxílio de uma tesoura, a casca ao lado da câmara foi cuidadosamente retirada, expondo assim a membrana cório-alantóide (CAM), que foi retirada na sequência, com cuidado para evitar danos aos vasos sanguíneos ali presentes. À área exposta, foram adicionadas alíquotas de 300 μL de cada uma das nanopartículas, da formulação comercial (Adacne Clin[®]), além de controle positivo e controle negativo, que eram uma solução de NaOH 1 mol L⁻¹ e solução salina, respectivamente (Figura 15). Após 20 segundos de contato com a superfície exposta, a amostra foi descartada e a CAM foi cuidadosamente lavada com solução salina. A CAM foi visualmente monitorada por 5 minutos, nos tempos de 0,5, 2 e 5 minutos em termos de hiperemia, hemorragia e coagulação (65,66).



Figura 15. Representação esquemática da avaliação *in vitro* do potencial irritativo das nanopartículas.

O tempo necessário para a ocorrência destas reações foi registrado (em segundos) e o cálculo do índice de irritabilidade foi realizado utilizando-se a Eq. II.

(Equação II),

$$II = \frac{(301 - HE) \times 5}{300} + \frac{(301 - HP) \times 7}{300} + \frac{(301 - CO) \times 9}{300}$$

onde: II = índice de irritabilidade; HE = tempo para ocorrência de hemorragia (segundos); HP = tempo para ocorrência de hiperemia (segundos); e CO = tempo para ocorrência de coagulação/opacidade (segundos).

A classificação final das nanopartículas quanto ao seu potencial de irritabilidade no ensaio HET-CAM está descrita na Tabela 2.

Tabela 2 - Classificação final das nanopartículas considerando a pontuação cumulativa quanto ao grau de irritabilidade no HET-CAM

Índice de irritabilidade	Classificação
0 – 0,9	Não irritante (NI)
1 – 4,9	Irritante Leve (IL)
5 – 8,9	Irritante Moderado (IM)
9 – 21,0	Irritante Severo (IS)

4.7 Análise estatística

A construção dos cromatogramas e termogramas foi realizada com o uso do programa Origin 8. Para a análise estatística dos dados foi utilizado o programa GraphPad Prism 8, as diferenças significativas foram verificadas por análise de variância seguindo-se teste t. O nível de significância estatística dos dados foi fixado em $p < 0,05$. Os dados, de no mínimo uma triplicata, estão representados como média \pm desvio padrão. As regressões lineares e equações de reta foram obtidas com a utilização do programa Microsoft Excel 2013.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Ensaaios de pré-formulação

a) Metodologia analítica

O método analítico avaliado neste estudo teve como objetivo a quantificação de clindamicina na presença de contaminantes presentes na pele, de onde o fármaco foi extraído para a realização de experimentos de permeação cutânea. Assim, partiu-se do método cromatográfico descrito na 6ª Edição da Farmacopeia Brasileira (60) para o fosfato de clindamicina e realizou-se validação parcial dessa metodologia em termos de seletividade, linearidade, precisão e exatidão.

i. Seletividade

A seletividade de um método analítico demonstra a sua capacidade de identificar ou quantificar o analito de interesse, inequivocamente, na presença de componentes que podem estar presentes na amostra, como impurezas, diluentes e componentes da matriz. Neste caso, a corrida cromatográfica contendo o analito, fosfato de clindamicina, foi confrontada com as corridas cromatográficas de seus possíveis interferentes, provenientes das camadas da pele (estrato córneo, folículos pilosos e pele remanescente), conforme apresentado na Figura 16.

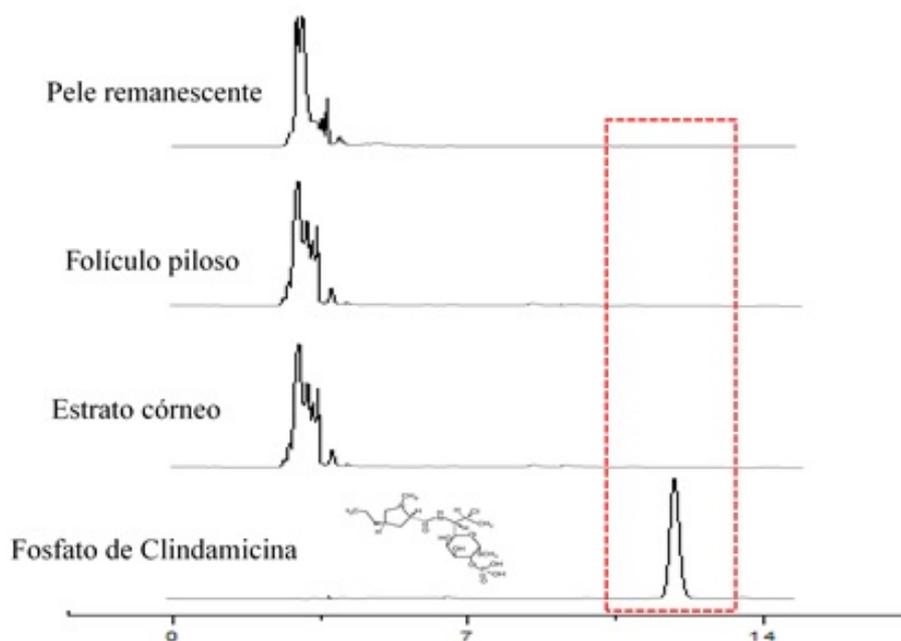


Figura 16. Cromatogramas representativos de CLAE do fosfato de clindamicina (CDM), estrato córneo (EC), folículos pilosos (FP) e pele remanescente (PR) obtidos seguindo o método estabelecido com detecção UV (200 nm).

A clindamicina eluiu em 10,5 minutos, em uma corrida fixada em 15 minutos. Verificou-se que os cromatogramas referentes às camadas da pele mostraram que todos os contaminantes oriundos da matriz biológica eluíram em tempo de retenção distinto do fosfato de clindamicina e que o método desenvolvido, portanto, apresentou seletividade em relação à pele.

ii. Linearidade

A linearidade de um método deve ser demonstrada por meio da sua capacidade de obter respostas analíticas diretamente proporcionais à concentração de um analito em uma amostra. Dessa forma, a plotagem da área do pico para cada amostra em relação à respectiva concentração de fosfato de clindamicina foi considerada linear na faixa de 2,0 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ a 20 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$. A linearidade foi avaliada após análise de regressão linear usando o método dos mínimos quadrados (Figura 17).

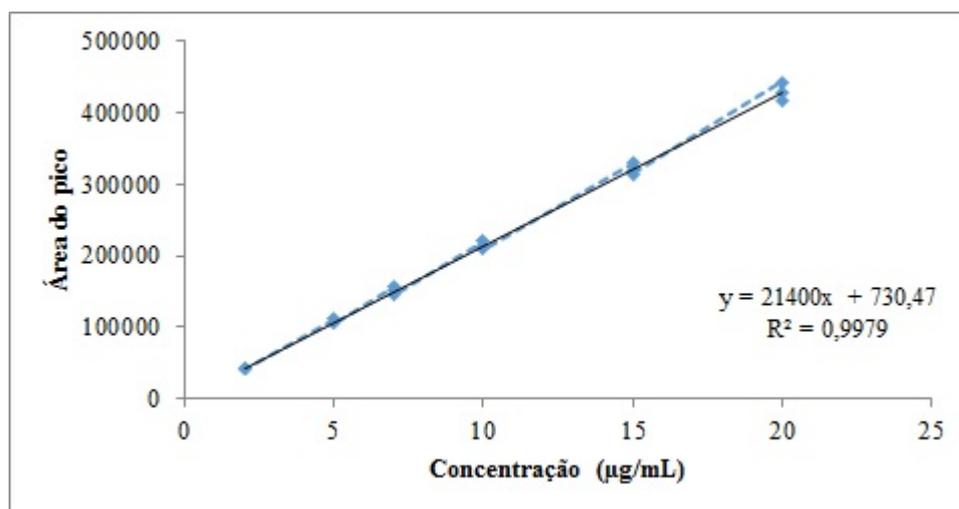


Figura 17. Curva analítica obtida pela análise de uma triplicata de fosfato de clindamicina por HPLC nas concentrações de 2,0; 5,0; 7,0; 10,0; 15,0 e 20,0 $\mu\text{g}/\text{mL}$, comprovando a linearidade do método. Equação da reta: $y = 21400x + 730,47$, $r = 0,9989$.

A equações de regressão foi $y = 21400x + 730,47$ e o coeficiente de correlação da curva padrão foi 0,9989, mostrando alta probabilidade de correlação. Observou-se que o coeficiente de correlação e a análise de regressão estão dentro dos limites estabelecidos (67).

iii. Precisão

A precisão avalia a proximidade entre os resultados obtidos por meio de ensaios com amostras preparadas conforme descrito no método analítico testado. Dessa forma a precisão foi medida usando seis replicatas de uma solução de clindamicina a 7,0 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$

¹. O coeficiente de validação (CV) encontrado foi de 3,36 %. Este valor está dentro dos critérios de aceitação (não maior que 5 %) do ICH e, portanto, o método foi considerado preciso (68).

iv. Exatidão/Recuperação

A exatidão de um método analítico é obtida por meio do grau de concordância entre os resultados individuais do método em estudo em relação a um valor aceito como verdadeiro. Como trata-se de um método bioanalítico, a recuperação do método foi avaliada com base na porcentagem de fosfato de clindamicina recuperada do estrato córneo, folículos pilosos e pele remanescente utilizando o método de extração otimizado. A extração do fármaco das três camadas de pele foi então padronizada variando-se a composição do solvente de extração e tempo de extração, conforme descrito na Tabela 3.

Tabela 3 - Avaliação do método de extração de fosfato de clindamicina das camadas de pele estudadas (EC, estrato córneo; FP, folículos pilosos; PR, pele remanescente).

Solvente	Tempo de repouso (h)	Recuperação CDM (%)		
		EC	FP	PR
água	12	35,9	48,7	41,8
metanol	12	45,5	53,9	53,9
metanol	24	97,8	83,5	55,3

Verificou-se que o metanol foi o solvente que melhor extraiu a clindamicina das camadas da pele, e o melhor tempo para extração foi de 24 h, em que 97,8% do fármaco foi recuperado do estrato córneo, e 83,5% dos folículos pilosos. Quanto à extração da pele remanescente, a porcentagem recuperada de fármaco não foi superior a 55%, qualquer que tenha sido a condição testada. Sendo assim, manteve-se o metanol como solvente extrator e no caso desta camada, optou-se pelo uso de um fator de correção como é comum se fazer nesses casos (62). Vale ressaltar que este procedimento está de acordo com a orientação da FDA em casos de resultados de recuperação consistentes, precisos e reproduzíveis (67).

b) Solubilidade do fosfato de clindamicina

Além do desenvolvimento de uma metodologia bioanalítica seletiva validada, a determinação da solubilidade do fármaco é essencial para a realização de ensaios *in vitro* que envolvam difusão, como os de permeação cutânea e os de liberação. Isso porque a determinação desse parâmetro garante que os experimentos ocorram em condições *sink*.

Assim, a concentração do fármaco na solução receptora não deve exceder 10% da solubilidade do fármaco no respectivo meio (69) garantindo que a difusão do fármaco não fique comprometida pela saturação deste meio.

Na Tabela 4 estão apresentados valores encontrados de solubilidade para a clindamicina em água, etanol, tampão HEPES pH 7,4 e tampão fosfato pH 7,4.

Tabela 4 - Solubilidade do fosfato de clindamicina

Meios de solubilização	Solubilidade da clindamicina (g/L)
Tampão HEPES pH 7,4	62,14 ± 1,21
Tampão fosfato pH 7,4	74,73 ± 1,91
Água	54,03 ± 0,95
Etanol	0,37 ± 0,04

Resultados apresentados como média ± DP; n = 3.

O meio em que a clindamicina apresentou maior solubilidade foi o tampão fosfato, em que 74,7 g/L do fármaco foi solubilizado, superando o tampão HEPES, no mesmo pH, água e etanol. A relação entre a solubilidade da clindamicina e o pH do meio deve-se à crescente ionização do fármaco à medida que o pH aumenta, uma vez que possui caráter fracamente ácido ($pK_a = 6,9$), obtendo-se uma maior porcentagem do fármaco na forma desprotonada (ionizada). Dessa forma, a elevação do pH promove maior solubilização do fármaco (70). Tendo em vista que nos ensaios propostos a concentração do fármaco é de 1000 $\mu\text{g/mL}$, e o volume da formulação é de, no máximo, 1000 μL , a quantidade de fármaco no compartimento doador da célula de Franz não excede 1000 μg . Considerando-se ainda que o volume do compartimento receptor é de 15 mL, caso todo fármaco passasse do compartimento doador para o receptor, a concentração final do fármaco seria de aproximadamente 66,66 $\mu\text{g/mL}$, ou 66,66 mg/L. Esse valor excede aproximadamente 100 vezes o mínimo requerido e, portanto, o uso do tampão fosfato pH 7,4 como meio receptor é adequado.

c) Estudo de compatibilidade

As técnicas de DSC e TG associadas são úteis na compreensão dos mecanismos físico-químicos relativos a processos de decomposição térmica, interpretação dos processos térmicos ou no estudo e desenvolvimento de novos compostos e produtos. Dessa forma, os estudos de compatibilidade entre fosfato de clindamicina e os polímeros

utilizados no preparo das nanopartículas foram avaliados separadamente e após mistura física.

Os dados obtidos a partir das análises em DSC (Figura 18) mostram que o fosfato de clindamicina, sozinho ou associado aos respectivos polímeros (quitosana e ácido hialurônico) por meio de mistura física, apresenta eventos térmicos compatíveis com a literatura (71).

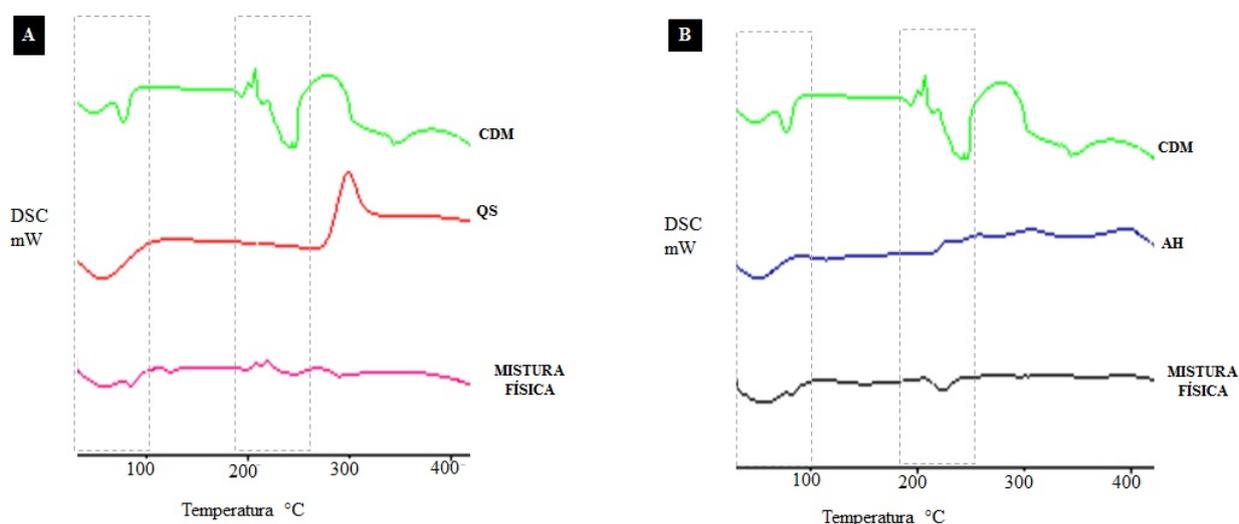


Figura 18. A: Análises de DSC de fosfato de clindamicina (CDM), quitosana e mistura física. B: Análises de DSC de fosfato de clindamicina (CDM), ácido hialurônico (AH) e mistura física.

Quanto aos dados obtidos a partir das análises em TG (Figura 19) a faixa de temperatura na qual ocorre a principal perda de massa também foi compatível com a literatura.

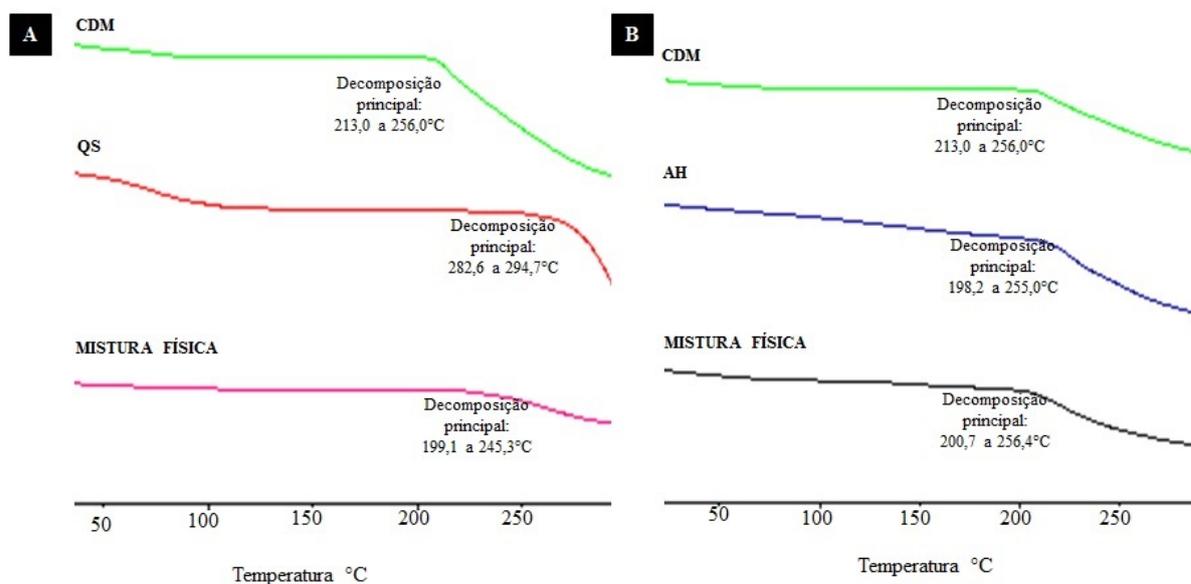


Figura 19. A: Análises de TG de fosfato de clindamicina (CDM), quitosana e mistura física. B: Análises de TG de fosfato de clindamicina (CDM), ácido hialurônico (AH) e mistura física.

5.2 Desenvolvimento das nanopartículas

Foram desenvolvidas duas nanopartículas utilizando-se dois polímeros diferentes com cargas opostas: a quitosana, positivamente carregada, e o ácido hialurônico, negativamente carregado, com diâmetro adequado (48), índice de polidispersividade compatível com nanopartículas monodispersas (72) e potencial zeta compatível com o recomendado na literatura (72–74). A quantidade de fármaco a ser encapsulada foi fixada em 0,1%, e tentou-se obter nanopartículas de tamanho semelhante e com potencial zeta iguais em módulo a fim de testarmos a natureza do material e a carga superficial das nanopartículas na penetração cutânea do fármaco hidrofílico nelas incorporado.

5.2.1 Nanopartículas de quitosana

Os testes preliminares para o desenvolvimento das nanopartículas de quitosana foram realizados a partir da técnica descrita por Calvo, 1997 (63), na qual a formação de nanopartícula se dá de maneira espontânea após a adição de um agente reticulante à solução de quitosana sob agitação constante. Essa técnica é amplamente utilizada por suas condições brandas de processamento, utilização de reagentes não tóxicos e baixos requisitos energéticos (51).

Inicialmente foram realizados testes variando-se a proporção do polímero em relação ao fármaco, fixando a proporção do agente reticulante. Então foram avaliados os parâmetros de diâmetro médio, índice de polidispersividade, potencial zeta e eficiência de encapsulação das nanopartículas de quitosana obtidas, conforme apresentado na Tabela 5.

Tabela 5 - Caracterização das nanopartículas alterando a proporção de polímero em relação ao fármaco.

Razão [QS]/[CDM]	Razão [QS]/[TPP]	Diametro médio (nm)	PDI	Potencial zeta (mV)	EE (%)
1,25	3,00	209,93 ± 3,99	0,30 ± 0,03	21,40 ± 0,46	18,47 ± 1,27
1,88	3,00	192,23 ± 1,83	0,28 ± 0,01	24,33 ± 0,68	16,64 ± 4,15
3,75	3,00	172,33 ± 2,47	0,25 ± 0,02	27,17 ± 0,47	29,17 ± 0,55

Resultados apresentados como média ± DP; n = 3. CDM: fosfato de clindamicina; QS: quitosana; TPP: tripolifosfato de sódio; EE: eficiência de encapsulação; DP: desvio padrão

De acordo com os dados apresentados, observou-se uma melhor eficiência de encapsulação, maior redução no tamanho de partícula e maior carga superficial quando utilizou-se uma maior proporção de quitosana em relação à clindamicina, do que quando

utilizou-se uma menor proporção de quitosana, o que pode ser explicado pelo aumento de grupos funcionais polares disponíveis no polímero (NH_2) para interação com o fármaco (51).

Relata-se na literatura que, para a formação de nanopartículas de quitosana utilizando o método de gelificação ionotrópica, melhores resultados são encontrados quando se utiliza um excesso de cargas catiônicas da quitosana (NH_2) em comparação com as cargas aniônicas do TPP (PO_4), pois o contrário pode culminar na formação de precipitados ou formação de partículas instáveis (51). Portanto a formação de nanopartículas a partir dessa técnica requer maiores proporções molares de $\text{NH}_2 / \text{PO}_4$.

Dessa forma, os próximos testes foram direcionados a encontrar a proporção ideal de reticulante em relação ao polímero. Para isso foram preparadas nanopartículas com duas proporções diferentes de TPP em relação à quitosana, mantendo-se a proporção de quitosana/clindamicina conforme testes anteriores (3,75).

Entretanto, de acordo com a técnica descrita por Calvo e colaboradores (1997) (63), um aumento na proporção de quitosana em relação ao TPP resulta em aumento do diâmetro das partículas (53), chegando à escala micrométrica. Dessa forma, foi introduzido o uso de sonicador no desenvolvimento das nanopartículas. Esse equipamento promove a aplicação de energia sonora, em frequências em grande parte inaudível para o ouvido humano, a fim de facilitar a dispersão de aglomerados de partículas através de um processo conhecido como cavitação (75). O sonicador foi utilizado em dois momentos, durante e após a etapa de gotejamento do agente reticulante na dispersão polimérica em ácido acético 1 %. Então foram avaliados os parâmetros de diâmetro médio das partículas, índice de polidispersividade, potencial zeta e eficiência de encapsulação, conforme apresentado na Tabela 6.

Tabela 6 - Caracterização das nanopartículas de quitosana alterando a proporção de reticulante em relação ao polímero e mantendo a proporção de fármaco.

Descrição	Razão [QS]/[TPP]	Uso do sonicador	Diâmetro médio (nm)	PDI	Potencial zeta (mV)	EE%
NP-QS-CDM-1	15,00	durante	223,5 ± 16,4	0,46 ± 0,05	+ 42,7 ± 0,9	39,7 ± 0,3
NP-QS-CDM-2	30,00	durante	485,1 ± 13,0	0,44 ± 0,05	+27,4 ± 1,1	38,6 ± 0,4
NP-QS-CDM-3	15,00	após	417,4 ± 9,0	0,46 ± 0,05	+ 27,7 ± 0,9	43,7 ± 1,9
NP-QS-CDM-4	30,00	após	507,4 ± 16,9	0,44 ± 0,05	+ 28,5 ± 1,0	44,2 ± 2,0

Resultados apresentados como média ± DP; n = 3. CDM: fosfato de clindamicina; QS: quitosana; TPP: tripolifosfato de sódio; PDI: índice de polidispersividade; EE: eficiência de encapsulação; DP: desvio padrão.

Diante dos dados apresentados, verificou-se que o uso de sonicator durante a etapa de gotejamento resultou em partículas de menor diâmetro (223,5 e 485,1 nm) em relação às aquelas em que o sonicator foi utilizado somente após a etapa de gotejamento (417,4 e 507,4 nm), sem grandes alterações para os outros parâmetros analisados.

Em relação ao índice de polidispersividade, não foram encontradas diferenças significativas entre as amostras testadas, já que todas elas apresentaram índices que indicam monodispersão PDI próximos à 0,4 (72).

Em relação ao potencial zeta, os resultados encontrados refletem a característica do polímero utilizado, sendo positivo para a quitosana (variando entre + 27,4 e + 42,7 mV) devido à presença do grupamento amino em sua estrutura. Como a literatura sugere que cargas eletrostáticas em torno de ± 30 mV podem ser vantajosas, uma vez que tendem a aumentar a repulsão, diminuindo a aglomeração das partículas (74), verificou-se que as nanopartículas aqui desenvolvidas estão próximas ou dentro do valor recomendado para potencial zeta. Cabe ressaltar que o efeito de carga das nanopartículas poderá influenciar a sua interação com a superfície da pele e os folículos pilosos, podendo ter influência na penetração folicular do fármaco nelas incorporado.

Quanto à eficiência de encapsulação, os melhores resultados (com maior eficiência) foram aqueles em que o sonicator foi utilizado somente após a etapa de gotejamento do reticulante, no caso NP-QS-CDM-3 e a NP-QS-CDM-4, cuja razão de [QS]/[TPP] foi de 15 e 30, respectivamente.

Entretanto, apesar de não haver diferença estatística entre a eficiência de encapsulação das NP-QS-CDM-3 e NP-QS-CDM-4 e ambas apresentarem diâmetro compatíveis com o local de direcionamento (48), aquela que utilizou uma maior proporção de polímero em relação ao reticulante (30) apresentou mais de uma população de nanopartículas (Figura 20), indicando falta de homogeneidade da amostra.

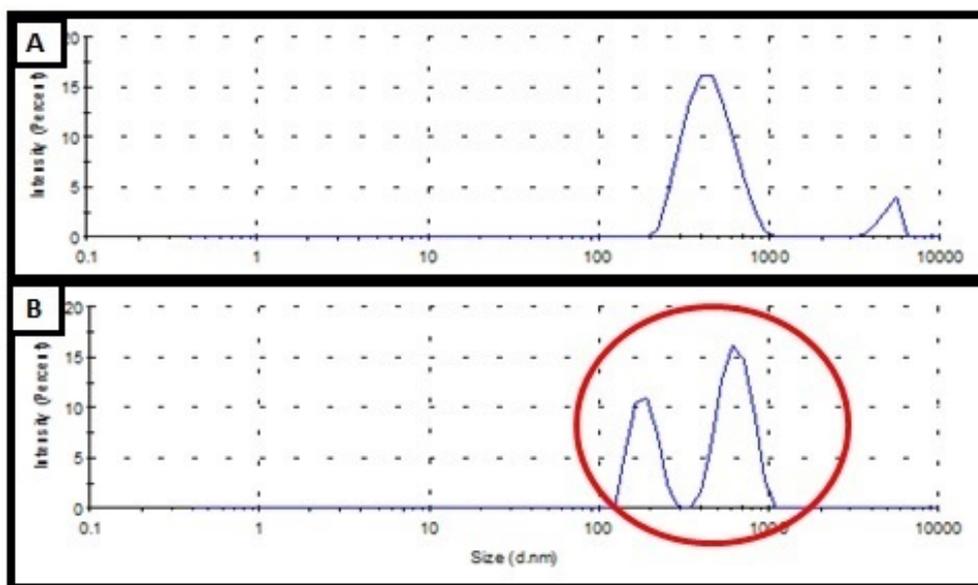


Figura 20. Gráfico de distribuição do tamanho de partícula, onde A: NP-QS-CDM-3 e B: NP-QS-CDM-4. Demonstração de como estão distribuídas as populações, em relação ao diâmetro, das nanopartículas.

Portanto, considerando as características apresentadas acima, diâmetro adequado (48), índice de polidispersividade compatível com nanopartículas monodispersas (72), potencial zeta compatível com o recomendado na literatura (72–74), principalmente ao que se refere à eficiência de encapsulação (43,7 %), as nanopartículas de quitosana obtidas a partir da razão quitosana/TPP igual a 15 e sonicação após a etapa de gotejamento (NP-QS-CDM-3) foi selecionada para os estudos futuros.

5.2.2 *Nanopartículas de ácido hialurônico*

Os testes preliminares para o desenvolvimento das nanopartículas de ácido hialurônico foram realizados a partir da técnica descrita por Oyarzun-Ampuero e colaboradores (2011) (64), na qual a formação de nanopartícula se dá após a adição do reticulante (poliarginina) à dispersão aquosa de ácido hialurônico. Essa técnica, apesar de simples, é pouco estudada em termos de carregamento de fármacos. As nanopartículas de ácido hialurônico normalmente são formadas pela ligação que ocorre entre os grupos redutores do polímero e os grupos amino da poliarginina, como foi descrito para a poli (L-lisina) poliaminoácido carregada positivamente (76).

Como trata-se de metodologia pouco descrita na literatura os testes iniciais foram realizados a partir das mesmas proporções definidas para as nanopartículas de quitosana selecionada, com foco inicial na técnica de preparo. A forma de adição da solução contendo o agente reticulante (gotejamento) também foi semelhante à técnica de preparo descrita por Calvo e colaboradores (1997) (63). Dessa forma, primeiramente o

gotejamento da solução contendo o agente reticulante na solução contendo o polímero foi realizado lentamente sob agitação magnética (Figura 21A), posteriormente sob sonicação (Figura 21B) e por fim, sob agitação magnética e posterior sonicação (Figura 21C).

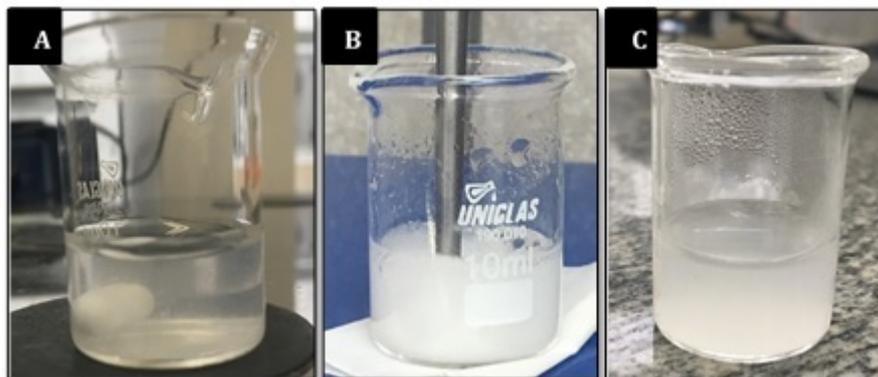


Figura 21. Aparência das amostras após adição do agente reticulante (poliarginina) na solução contendo o polímero (ácido hialurônico). A: gotejamento sob agitação magnética; B: gotejamento sob sonicação; C: gotejamento sob agitação magnética e sonicação posterior.

Verificou-se a presença de aglomerados visíveis na amostra em que o gotejamento foi realizado sob agitação magnética. No gotejamento sob sonicação observou-se precipitação imediata do polímero e no gotejamento sob agitação magnética e o sonicação posterior obteve-se líquido esbranquiçado, sem aglomerados visíveis. Portanto, essa técnica foi selecionada para a continuidade do desenvolvimento.

O próximo passo foi a avaliação da quantidade de reticulante em relação ao polímero. Nesse caso, a concentração do fármaco foi fixada em 0,1 %, compatível com aquela já definida para as nanopartículas de quitosana. Então foram avaliados os parâmetros de diâmetro médio, índice de polidispersividade, potencial zeta e eficiência de encapsulação para as nanopartículas de ácido hialurônico obtidas a partir de diferentes proporções polímero/reticulante, conforme apresentado na Tabela 7.

Tabela 7 - Caracterização das nanopartículas de ácido hialurônico alterando a proporção de reticulante em relação ao polímero e mantendo a concentração de fármaco.

Descrição	Razão	Razão	Diâmetro médio (nm)	PDI ± SD	Potencial zeta (mV)	EE (%)
	[AH]/[PLA]	[AH]/[CDM]				
NP-AH-CDM-1	4,17	2,25	206,3 ± 1,1	0,06 ± 0,02	- 49,4 ± 0,4	32,3 ± 1,0
NP-AH-CDM-2	20,00	2,25	568,7 ± 33,6	0,50 ± 0,03	- 43,3 ± 0,3	38,0 ± 0,3
NP-AH-CDM-3	25,00	2,25	563,6 ± 35,1	0,74 ± 0,18	- 39,1 ± 0,5	38,2 ± 0,4
NP-AH-CDM-4	100,00	2,25	362,0 ± 18,7	0,46 ± 0,02	- 30,2 ± 2,7	50,4 ± 0,6

Resultados apresentados como média ± DP; n = 3. CDM: fosfato de clindamicina; AH: ácido hialurônico; PLA: poliarginina; PDI: índice de polidispersividade; EE: eficiência de encapsulação; DP: desvio padrão

Diante dos dados apresentados, verificou-se que o gotejamento da solução contendo o agente reticulante (poliarginina) na solução contendo o polímero (ácido hialurônico) resultou em partículas na escala nanométrica, com diâmetros dentro ou próximos daqueles desejáveis para o local de direcionamento (48).

Em relação ao índice de polidispersividade, as amostras NP-AH-CDM-2 e NP-AH-CDM-3 apresentaram índices que indicam polidispersão alta ou moderada ($PDI > 0,4$) (72). Já as amostras NP-AH-CDM-1 e NP-AH-CDM-4 apresentaram índices que indicam a monodispersão ($PDI \leq 0,4$) (72).

Quanto à eficiência de encapsulação, o melhor resultado, com maior eficiência (50,4%), foi obtido para aquelas nanopartículas obtidas utilizando-se uma razão de ácido hialurônico/poliarginina igual a 100 (NP-AH-CDM-4), sendo estatisticamente superior às demais concentrações ($p > 0,05$).

Portanto, considerando as características apresentadas acima de diâmetro adequado e semelhante ao das nanopartículas de quitosana, índice de polidispersividade compatível com o de nanopartículas monodispersas (72), potencial zeta compatível com o recomendado na literatura e semelhante ao das nanopartículas de quitosana em módulo (72–74), e maior eficiência de encapsulação (50,4 %), as nanopartículas obtidas a partir de uma razão de ácido hialurônico/poliarginina igual a de 100 (NP-AH-CDM-4) foi selecionada para os estudos futuros.

Procedeu-se então à caracterização das nanopartículas selecionadas quanto ao pH da dispersão e quanto à sua morfologia.

5.2.3 pH

O pH da formulação foi em torno de 5,0 para as NP-QS-CDM-3 e 5,5 para as NP-AH-CDM-4, sendo compatível com o pH da pele e com o pH ideal para a ação das fosfatases (77) responsáveis pela conversão do fosfato de clindamicina em sua forma ativa (38). Além disso, esse é um dos fatores que influenciam a permeação passiva do fosfato de clindamicina. Isso ocorre porque a variação do pH da formulação doadora pode afetar o grau de ionização da própria molécula do fármaco, tornando-a mais ou menos ionizada. A permeação passiva é favorecida pela menor fração ionizada do fármaco, que possui afinidade pelo estrato córneo, que é apolar, facilitando sua difusão em direção ao interior da pele (78,79). No pH das formulações das nanopartículas, o fosfato de clindamicina possui mais que 50% de suas moléculas na forma não ionizada. Portanto, o pH da formulação parece ideal para favorecer sua penetração cutânea.

5.2.4 Morfologia

Um importante parâmetro para transporte e liberação de fármacos em um sistema particulado é a superfície de contato da partícula, sendo que a forma esférica apresenta uma proporção ideal entre volume e área de superfície (80). A partir das imagens obtidas por Microscopia Eletrônica de Varredura (Figura 22A e B) e Microscopia Eletrônica por Transmissão (Figura 22C e D), para as nanopartículas e quitosana e de ácido hialurônico, respectivamente, verificou-se que as nanopartículas desenvolvidas apresentaram formato esférico. Esta morfologia é semelhante à descrita para outras partículas preparadas com os mesmos polímeros (50,51).

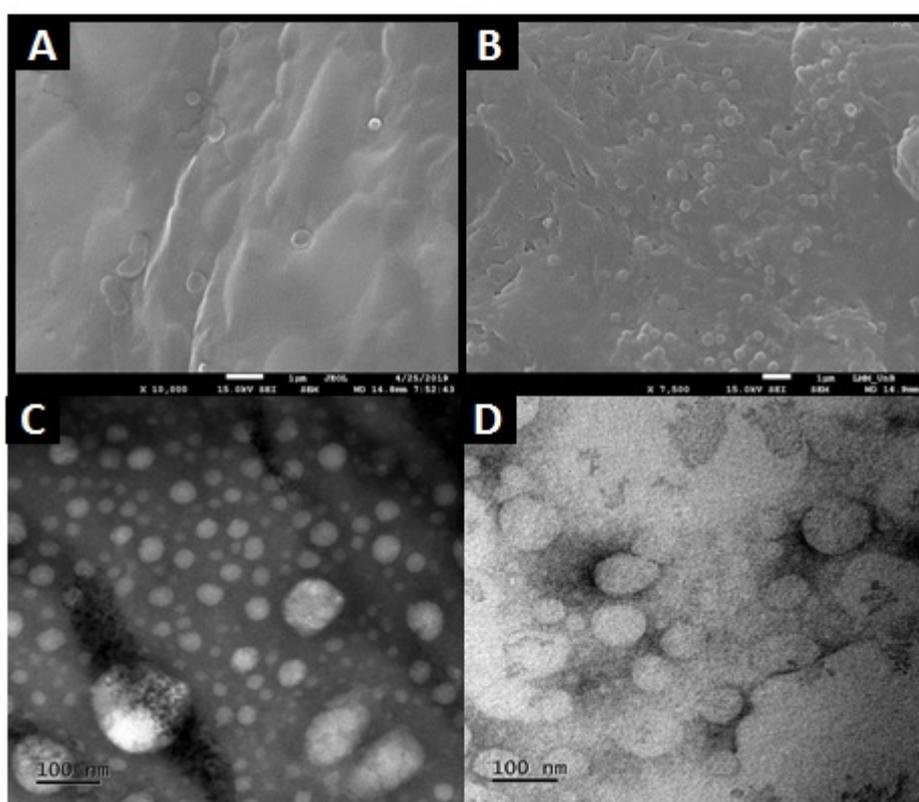


Figura 22. Microscopia eletrônica de varredura (MEV) das nanopartículas A: NP-QS-CDM-3 e B: NP-AH-CDM-4. Microscopia eletrônica por Transmissão (MET) das nanopartículas A: NP-QS-CDM-3 e B: NP-AH-CDM-4.

Apesar das imagens obtidas por MEV terem apresentados alguns artefatos, possivelmente pela deposição de polímero durante a metalização da amostra, é possível verificar pelas imagens obtidas tanto por essa técnica quanto por MET que a faixa de diâmetro das nanopartículas está na mesma ordem de grandeza dos encontrados por meio da técnica de espalhamento de luz dinâmico.

5.3 Ensaios *in vitro* de liberação

O estudo de liberação foi realizado *in vitro* e teve como objetivo a avaliação da velocidade com que o fármaco é liberado das diferentes nanopartículas. O perfil de liberação da clindamicina a partir das nanopartículas NP-QS-CDM-3 e NP-AH-CDM-4 foram comparados ao perfil de liberação do fármaco a partir da formulação comercial Adacne Clin[®], fabricado pela empresa Glenmark Pharmaceuticals Ltd. (Nasik, Índia), que contém a mesma concentração de fármaco que ambas as nanopartículas. Os perfis de liberação do fármaco a partir das diferentes formulações estão apresentados na Figura 23.

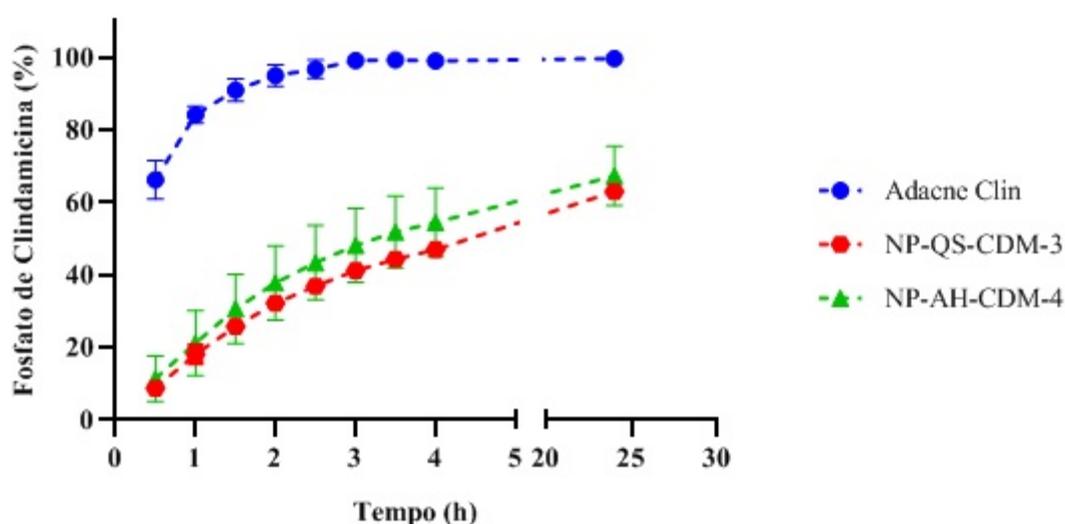


Figura 23. Perfis de liberação das nanopartículas NP-QS-CDM-3 e NP-AH-CDM-4 em comparação da formulação comercial Adacne Clin[®], contendo a mesma concentração de fármaco.

Verificou-se que a formulação comercial apresentou liberação da quase totalidade do fármaco (>80%) já na primeira hora de experimento.

As nanopartículas, conforme o esperado, liberaram o fármaco de maneira sustentada, sendo que ao final das 24 horas elas liberaram apenas aproximadamente 65% do fármaco. Esse perfil de liberação sustentada, como os apresentados pelas nanopartículas, é desejável principalmente quando a formulação visa atuar como reservatório do fármaco na pele. Dessa forma, as nanopartículas apresentam características de liberação adequadas ao objetivo proposto, possibilitando a diminuição da necessidade de reaplicação da formulação.

O perfil de liberação do fármaco foi semelhante entre as duas nanopartículas testadas, não possuindo diferença estatística ($p < 0,05$) entre as proporções de fármaco liberadas em nenhum dos tempos analisados. Essa liberação controlada deve-se

principalmente ao aprisionamento do fármaco no interior das nanopartículas, que em ambos os casos depende de um processo de dissolução e difusão para ser liberado (81).

5.4 Estudo *in vitro* de permeação através da pele de suínos

Os ensaios *in vitro* de permeação cutânea têm se tornado cada vez mais utilizados para viabilizar a administração tópica de fármacos a partir de novas formulações (82). Aqui, esse estudo foi conduzido no intuito de verificar o direcionamento do fármaco para os folículos pilosos ocasionado pelas nanopartículas, a importância da via folicular para a penetração cutânea do fármaco livre e encapsulado e, sobretudo, para avaliar a capacidade das nanopartículas desenvolvidas em atingir as estruturas pilosebáceas da pele, que é o local de ação do fármaco encapsulado, mesmo na presença de excesso de sebo, como acontece durante o quadro de acne (1).

Inicialmente os ensaios de permeação foram realizados com pele de suínos intacta e não processada. Foram avaliadas as nanopartículas NP-QS-CDM-3, NP-AH-CDM-4 e a formulação comercial. Os resultados estão demonstrados na Figura 24.

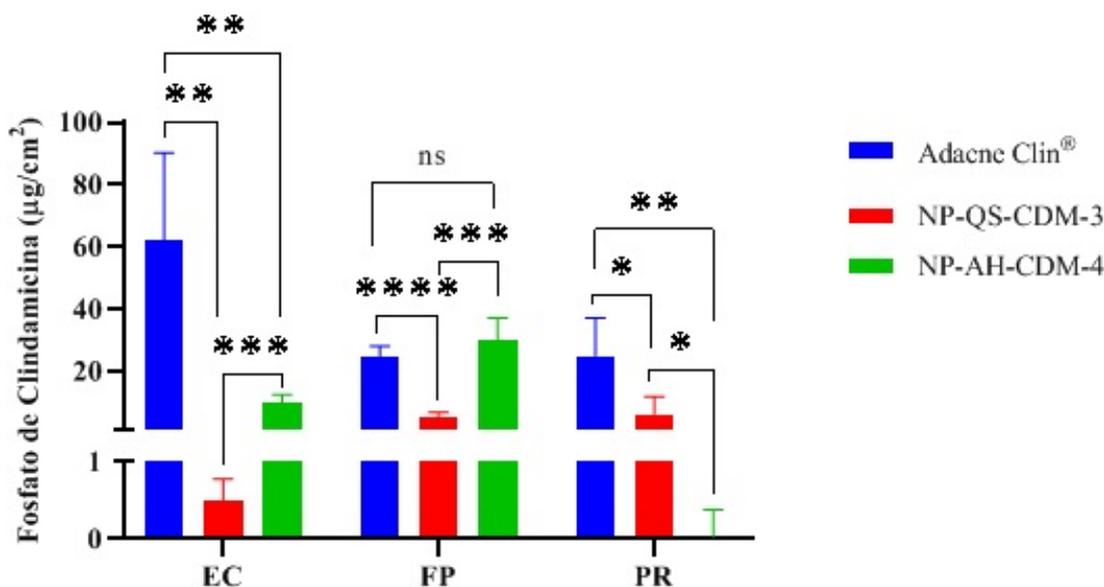


Figura 24. Quantidade permeada de fármaco na pele de suínos sem processamento. EC: estrato córneo; FP: folículo piloso; PR: pele remanescente. ($p < 0,05$)

Verificou-se que fosfato de clindamicina presente na formulação comercial (Adacne Clin®) permeou significativamente mais as camadas da pele em comparação ao fármaco encapsulado nas nanopartículas. A NP-QS-CDM-3 reduziu em 120 vezes a penetração do fármaco no estrato córneo, e 6 vezes a penetração na pele remanescente (epiderme viável + derme). Já a NP-AH-CDM-4 restringiu 2 vezes a penetração do

fármaco no estrato córneo e 20 vezes na pele remanescente. Isso pode ser explicado tanto pela presença de promotores de absorção na formulação comercial, como o propilenoglicol (83), que ajuda a permeabilizar mais o estrato córneo da pele, quanto pelo controle de liberação do fármaco promovido por ambas as nanopartículas desenvolvidas. Essa restrição de permeação é benéfica ao tratamento da acne por evitar exposição sistêmica do fármaco e por reduzir a interação dele com camadas da pele que não são de interesse (84).

No entanto, no tocante à penetração do fármaco nos folículos pilosos da pele, tanto a formulação comercial quanto as NP-AH-CDM-4 resultaram numa mesma concentração do fármaco recuperado dessas estruturas ($p < 0,05$), e as nanopartícula NP-QS-CDM-3 promoveram uma redução significativa, ($p > 0,05$) porém sutil do fármaco penetrado nesses anexos da pele. Assim, pode-se observar que ambas as nanopartículas foram capazes de aumentar a proporção de fármaco retido nos folículos pilosos em relação ao retido nas camadas da pele, evidenciando um direcionamento da penetração da clindamicina. É importante ressaltar que os folículos pilosebáceos é justamente o local onde a acne se desenvolve (1) e, portanto, esse direcionamento é bastante adequado para seu tratamento.

Testes adicionais foram então realizados para avaliar a capacidade de penetração do fármaco nas diferentes camadas da pele a partir das nanopartículas quando a pele estava em uma condição mais semelhante à encontrada nos quadros de acne, em que as unidades pilosebáceas são acometida por aumento da produção de sebo (1,85). Dessa forma, a permeação foi realizada com pele de suínos tratadas com sebo utilizando-se as mesmas formulações (Figura 25).

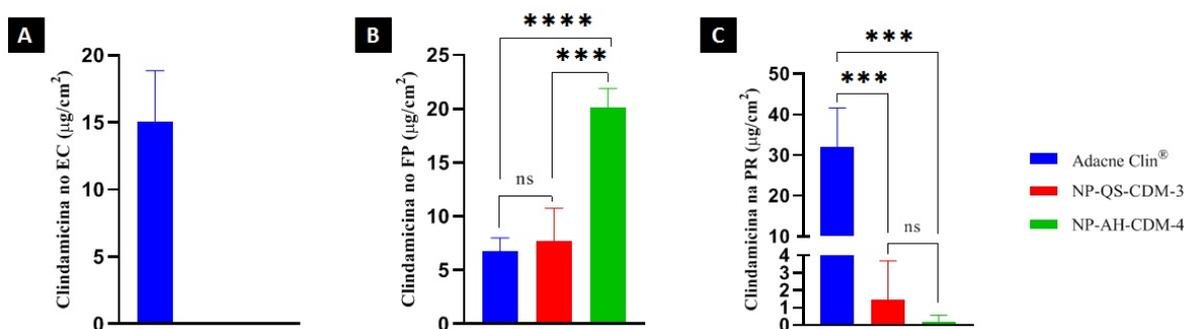


Figura 25. permeação da pele tratada com sebo. A: quantificação da permeação das nanopartículas NP-QS-CDM-3, NP-AH-CDM-4 e formulação comercial (Adacne Clin®) no estrato córneo (EC); B: quantificação da permeação das nanopartículas NP-QS-CDM-3, NP-AH-CDM-4 e formulação comercial (Adacne Clin®) no: folículo piloso (FP) e C: quantificação da permeação das nanopartículas NP-QS-CDM-3, NP-AH-CDM-4 e formulação comercial (Adacne Clin®) na pele remanescente (PR). ($p < 0,05$)

Diante dos dados apresentados, observou-se que o excesso de sebo dificultou a permeação do fármaco através do estrato córneo (Figura 25A), sendo que apenas a formulação comercial apresentou penetração de quantidades detectáveis de clindamicina nesta primeira camada cutânea. Para a camada mais profunda da pele, a mesma situação se repetiu.

Quanto à penetração de clindamicina nos folículos pilosos (Figura 25B), a nanopartícula NP-AH-CDM-4 ofereceu um forte direcionamento do fármaco para essa estrutura, promovendo a penetração de praticamente o dobro do fármaco que as nanopartícula NP-QS-CDM-3 e de 2,5 vezes a quantidade de fármaco penetrado a partir da formulação comercial. Dessa forma, observou-se que a nanopartícula que possui o ácido hialurônico como polímero possui capacidade de direcionamento mesmo em ambiente que mimetiza o processo de hiperprodução sebácea no quadro de acne. Vale destacar que a formulação comercial reduziu mais que a metade a capacidade de promover a penetração do fármaco nas estruturas pilossebáceas nesse ambiente oleoso, em comparação ao analisado quando a pele estava intacta.

De forma a confirmar o direcionamento e a importância na via folicular para a penetração cutânea da clindamicina livre ou nanoencapsulada, foram realizados ensaios de permeação em peles que tiveram os folículos pilosos obstruídos, com e sem tratamento com o sebo. Esses ensaios foram comparados ao ensaio de permeação em pele intacta e os dados estão apresentados abaixo nas Figuras 26 e 27.

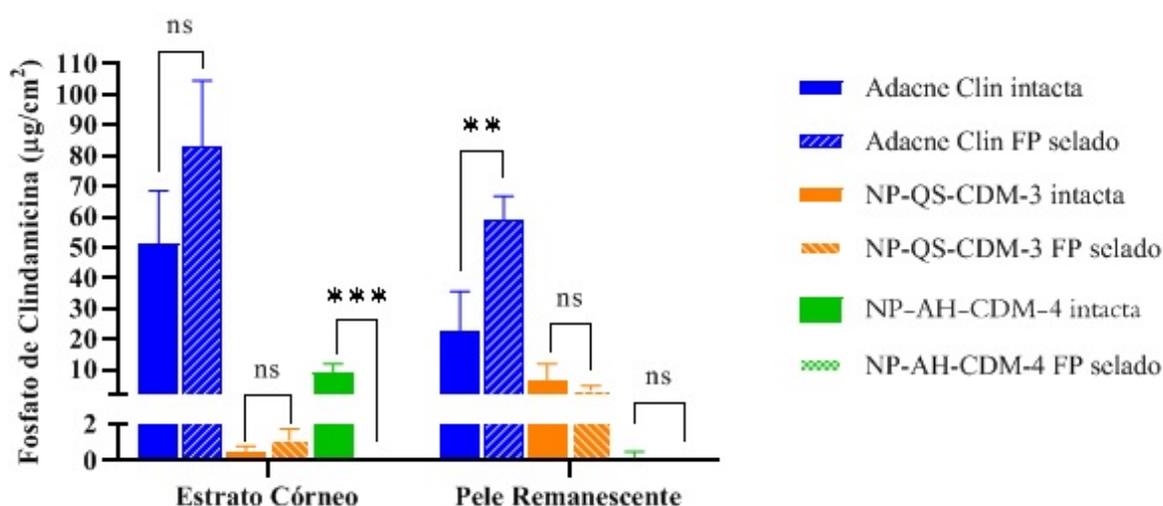


Figura 26. Quantificação da clindamicina nas camadas da pele com folículos selados após 24 horas de permeação; EC: estrato córneo; PR: pele remanescente. ($p < 0,05$)

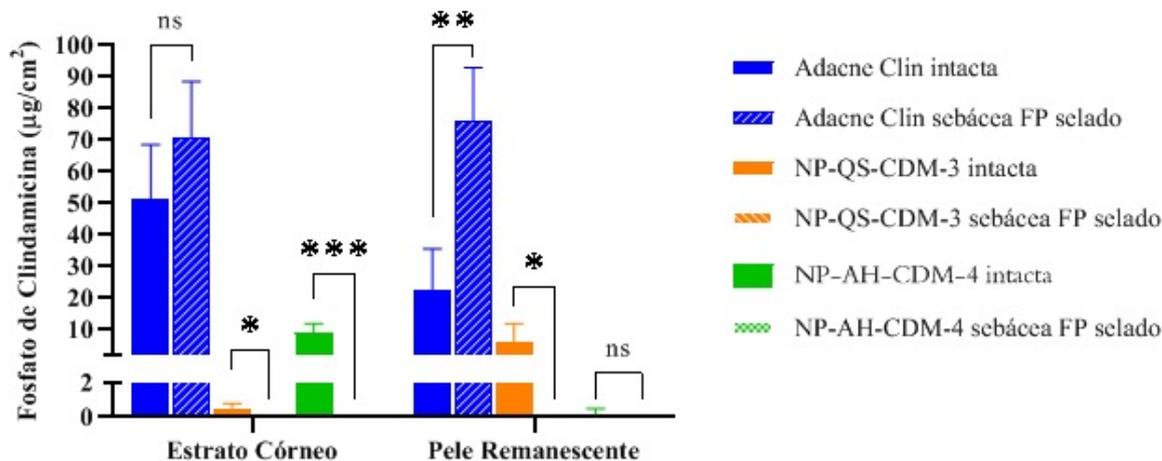


Figura 27. Quantificação da clindamicina nas camadas da pele tratada com sebo e com folículos selados após 24 horas de permeação; EC: estrato córneo; PR: pele remanescente. ($p < 0,05$)

Diante dos dados apresentados, observou-se que a via folicular não é imprescindível para a permeação cutânea do fármaco a partir da formulação comercial. Nesse caso, o estrato córneo é a via mais significativa para promover a sua permeação cutânea. Já para as nanopartículas desenvolvidas (NP-QS-CDM-3 e NP-AH-CDM-4), a via folicular mostrou-se imprescindível, uma vez que a sua falta praticamente inviabiliza a penetração do fármaco para as demais estruturas da pele. Esse fato justifica a utilização das nanopartículas poliméricas em formulações em que os folículos pilosos são o alvo principal.

Além disso, quando calculamos o fator de direcionamento folicular do fármaco para as três formulações testadas variando-se o tipo de pele (Figura 28), verificamos que o direcionamento para o folículo piloso das nanopartículas testadas em relação às demais estruturas é estatisticamente superior à formulação comercial.

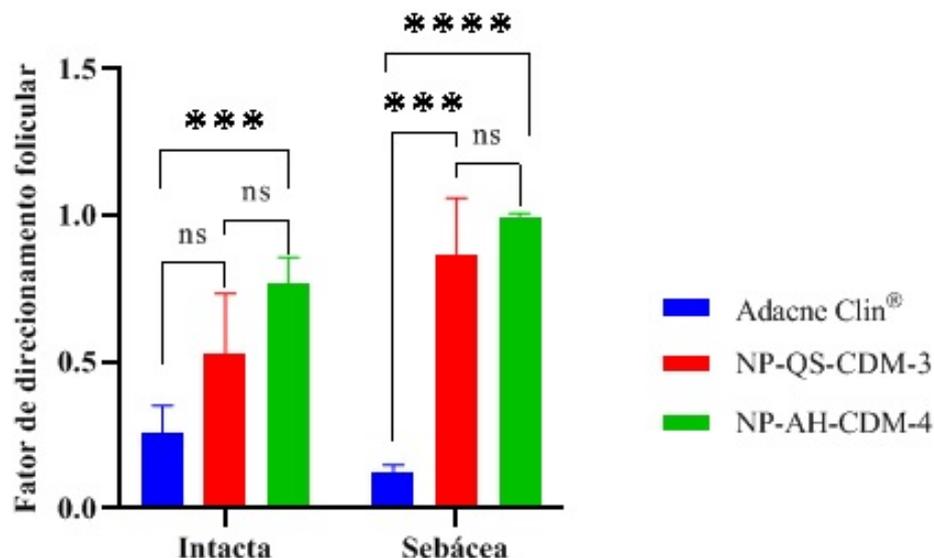


Figura 28. Direcionamento folicular da formulação comercial (Adacne Clin[®]) e das nanopartículas (NP-QS-CDM-3 e NP-AH-CDM-4) em pele intacta e pele sebácea.

Verifica-se, ainda, que o direcionamento é maior quando a pele é tratada com sebo. Isso reforça a vantagem dessas nanopartículas em relação à formulação comercial, no que se refere ao direcionamento ao local de ação do fármaco. Além disso, a nanopartícula NP-AH-CDM-4 chegou a direcionar 7,5 vezes mais que a formulação comercial, mesmo em pele sebácea, chegando a um nível próximo de 100 % de direcionamento do fármaco para o local de ação.

Por fim, destaca-se que, considerando as similaridades entre as nanopartículas de quitosana e de ácido hialurônico no que se refere ao diâmetro, PDI, morfologia, pH e perfil de liberação, e a diferença em relação a carga superficial delas, sendo a NP-AH-CDM-4 negativamente carregada e a NP-QS-CDM-3 positivamente carregada, nanopartículas de carga negativas parecem ser mais eficientes no direcionamento da liberação de fármacos nela encapsulados para os folículos pilosos da pele na presença de lipídeos. Esse maior direcionamento pode estar relacionado ao fato de que o estrato córneo da pele é negativamente carregado em pH fisiológico (86) e que as vias apendiculares desta forma propiciam uma melhor acomodação das nanoestruturas que possuem a mesma carga do estrato córneo. Outros estudos, no entanto, deverão ser realizados para tentar provar essa hipótese.

5.5 Avaliação *in vitro* do potencial irritativo das nanopartículas de QS e AH

(HET-CAM)

Apesar dos polímeros quitosana e ácido hialurônico utilizados como matrizes para a produção das nanopartículas neste trabalho terem sua biocompatibilidade bem estabelecida, e do pH das dispersões das nanopartículas serem compatíveis para sua aplicação na pele, o agente reticulante utilizado na produção das nanopartículas, bem como a incorporação do fármaco podem conferir à formulação certa toxicidade. Desta forma, o potencial irritativo das duas nanoformulações desenvolvidas foi avaliado por meio de ensaio HET-CAM.

O ensaio HET-CAM é um teste muito usado para avaliar o potencial irritante de formulações, evitando a realização de testes em animais os quais necessitam de aprovação de comitês de ética.

Na Figura 29 estão apresentadas as imagens que foram capturadas durante 0,5, 2 e 5 min após a exposição da CAM às amostras de nanopartículas testadas em comparação aos controles positivo e negativo para avaliar seu potencial irritante.

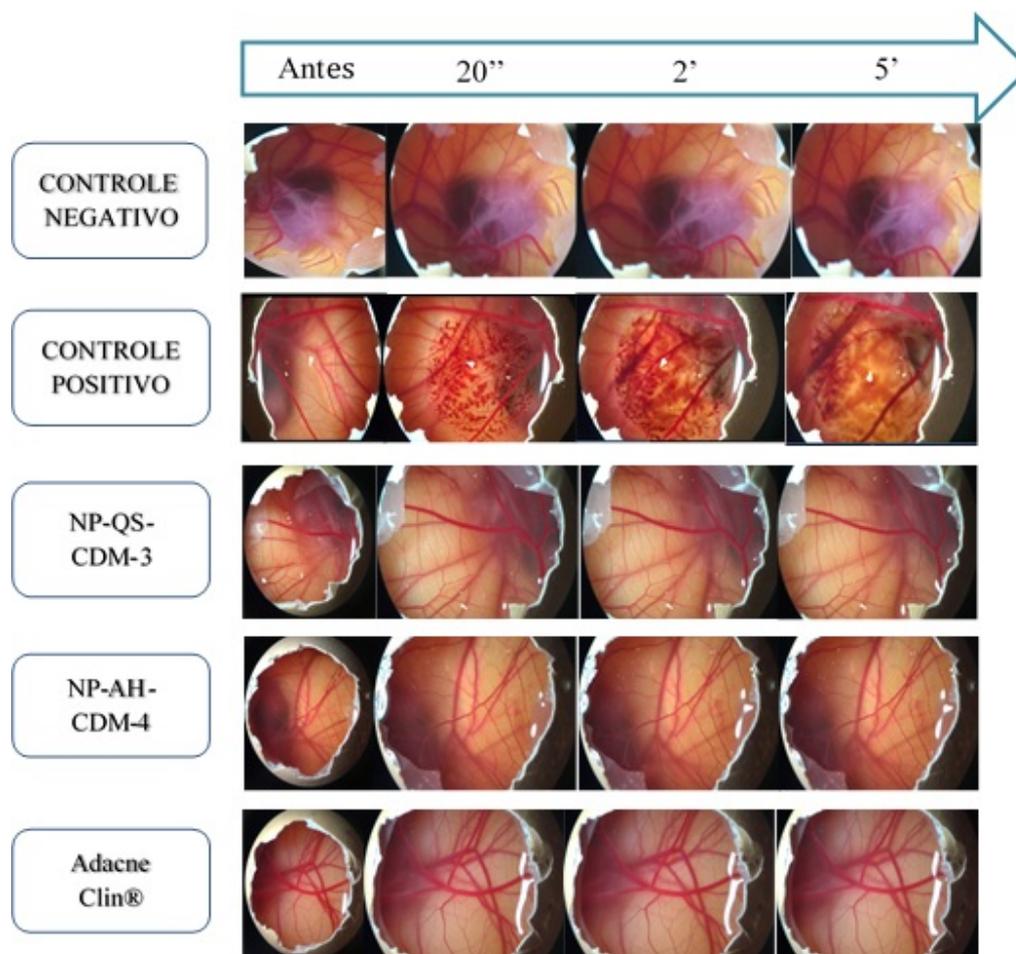


Figura 29. Sequência ilustrativa das imagens do ensaio de HET-CAM demonstrando o efeito dos controles positivo (NaOH 1 M), negativo (NaCl 0,9%) e nas nanopartículas NP-QS-CDM-3 e NP-AH-CDM-4 e formulação comercial na membrana cório-alantoide após 30 segundos, 2 minutos e 5 minutos.

O controle positivo proporcionou a ocorrência de diversas alterações vasculares na membrana logo nos primeiros segundos, como o aumento da vascularização e calibre dos vasos, além de uma alteração da coloração associada ao rompimento dos vasos e extravasamento de sangue. Em contraposição, o controle negativo (solução fisiológica) não apresentou a ocorrência de nenhum desses fenômenos, semelhante ao que ocorreu com as nanopartículas testadas NP-QS-CDM-3, NP-AH-CDM-4 e na formulação comercial. Todas as formulações testes obtiveram assim um índice de irritabilidade inferior a 0,9. Com isso, as formulações testadas, inclusive a formulação comercial de clindamicina foram classificadas como formulações não-irritantes e, portanto, adequadas para aplicação na pele humana.

6. CONCLUSÃO

As duas nanopartículas desenvolvidas NP-QS-CDM-3 e NP-AH-CDM-4 apresentaram características adequadas para o tratamento tópico no que se refere a tamanho, índice de polidispersividade, potencial zeta e morfologia. Além disso, apresentaram perfil de liberação similares, retendo o fármaco por mais tempo que a formulação comercial com registro sanitário vigente no País.

Quanto ao perfil de irritabilidade, ambas se demonstraram não irritativas quando testadas pela técnica de HET-CAM, o que dá suporte para a utilização em tratamentos tópicos.

Por fim, o estudo de permeabilidade em pele sebácea demonstrou que uma das nanopartículas, NP-AH-CDM-4, possui capacidade de permeação no folículo piloso mesmo quando o folículo encontra-se obstruído por lipídeos. Essa é uma característica bastante promissora tendo em vista que, normalmente, os quadros de acne são acompanhados de hiperprodução ou obstrução sebácea.

REFERÊNCIAS

1. Williams HC, Dellavalle RP, Garner S. Acne vulgaris. *Lancet* [Internet]. janeiro de 2012 [citado 8 de setembro de 2019];379(9813):361–72. Available at: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0140673611603218>
2. Biswal I, Gaiind R, Kumar N, Mohanty S, Manchanda V, Khunger N, et al. In vitro antimicrobial susceptibility patterns of propionibacterium acnes isolated from patients with acne vulgaris. *J Infect Dev Ctries*. 2016;10(10):1140–5.
3. Lynn D, Umari T, Dellavalle R, Dunnick C. The epidemiology of acne vulgaris in late adolescence. *Adolesc Health Med Ther*. 2016;13.
4. Fox L, Csongradi C, Aucamp M, Du Plessis J, Gerber M. Treatment modalities for acne. *Molecules*. 2016;21(8):1–20.
5. Brown BJ, Oladokun RE, Osinusi K. Acne Vulgaris review. *Niger J Clin Pract* [Internet]. 2009;379(9813):361–72. Available at: [http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736\(11\)60321-8](http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736(11)60321-8)
6. Zaenglein AL, Pathy AL, Schlosser BJ, Alikhan A, Baldwin HE, Berson DS, et al. Guidelines of care for the management of acne vulgaris. *J Am Acad Dermatol* [Internet]. 2016;74(5):945-973.e33. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jaad.2015.12.037>
7. Arshdeep, De D. What's new in the management of acne? *Indian J Dermatol Venereol Leprol*. 2013;79(3):279–87.
8. Akhavan A, Bershada S. Topical acne drugs: Review of clinical properties, systemic exposure, and safety. *Am J Clin Dermatol*. 2003;4(7):473–92.
9. Matos BN, Reis TA, Gratieri T, Gelfuso GM. Chitosan nanoparticles for targeting and sustaining minoxidil sulphate delivery to hair follicles. *Int J Biol Macromol*. 2015;75:225–9.
10. Abdellatif AAH, Tawfeek HM. Transfersomal Nanoparticles for Enhanced Transdermal Delivery of Clindamycin. *AAPS PharmSciTech*. 2016;17(5):1067–74.
11. Gelfuso GM, Gratieri T, Simão PS, Freitas LAP de, Lopez RFV. Chitosan microparticles for sustaining the topical delivery of minoxidil sulphate. *J Microencapsul*. 2011;28(7):650–8.
12. Yu K, Wang Y, Wan T, Zhai Y, Cao S, Ruan W, et al. Tacrolimus nanoparticles based on chitosan combined with nicotinamide: Enhancing percutaneous delivery and treatment efficacy for atopic dermatitis and reducing dose. *Int J Nanomedicine*. 2018;13:129–42.
13. Sundberg JP, Nanney LB, Fleckman P, King LE. *Skin and Adnexa* [Internet]. First Edit. Comparative Anatomy and Histology. Elsevier Inc.; 2012. 433–455 p. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-381361-9.00023-8>
14. Bouwstra JA, Ponc M. The skin barrier in healthy and diseased state. *Biochim Biophys Acta*. 2006;1758:2080–95.
15. Blanpain C, Fuchs E. Epidermal Stem Cells of the Skin. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 2008;22:339–73.
16. Wickett RR, Visscher MO. Structure and function of the epidermal barrier. *Am J*

- Infect Control. 2006;34(10):98–110.
17. Kolarsick PAJ, Kolarsick MA, Goodwin C. Anatomy and Physiology of the Skin. *J Dermatol Nurses Assoc.* 2006;3(4):2011.
 18. Stenn KS, Paus R. Controls of Hair Follicle Cycling. *Physiol Rev.* 2018;81(1):449–94.
 19. Yanga C-C, Cotsarelisa G. Review of hair follicle dermal cells. *J Dermatol Sci.* 2010;57(1):1–19.
 20. Toyoshima K, Asakawa K, Ishibashi N, Toki H, Ogawa M, Hasegawa T, et al. Fully functional hair follicle regeneration through the rearrangement of stem cells and their niches. *Nat Commun.* 2012;3:784.
 21. Martel J, Badri T. Anatomy, Head, Hair, Follicle. StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2018. p. 470321.
 22. RALF P AUS , M.D., AND G EORGE C OTSARELIS MD, H. T He B Iology of H Air F OLlicles. *New Engl J Med Fig.* 2004;341(7):491–7.
 23. Bouwstra JA, Honeywell-Nguyen PL, Gooris GS, Ponc M. Structure of the skin barrier and its modulation by vesicular formulations. Vol. 42, *Progress in Lipid Research.* 2003. 1–36 p.
 24. Alexander A, Dwivedi S, Giri TK, Saraf S, Saraf S, Krishna D. Approaches for breaking the barriers of drug permeation through transdermal drug delivery. *J Control Release.* 2012;164(1):26–40.
 25. Hansen S, Lehr C-M, Schaefer UF. Improved input parameters for diffusion models of skin absorption ☆. *Adv Drug Deliv Rev.* 2013;65:251–64.
 26. Gratieri T, Martins G, Fonseca R, Lopez V. Princípios básicos e aplicação da iontoforese na penetração cutânea de fármacos. *Quim Nova.* 2008;31(6):1490–8.
 27. Fitz-Gibbon S, Tomida S, Chiu BH, Nguyen L, Du C, Liu M, et al. Propionibacterium acnes strain populations in the human skin microbiome associated with acne. *J Invest Dermatol [Internet].* 2013;133(9):2152–60. Available at: <http://dx.doi.org/10.1038/jid.2013.21>
 28. Tang W, Bhushan B. Adhesion, friction and wear characterization of skin and skin cream using atomic force microscope. *Colloids Surfaces B Biointerfaces.* 2009;76:1–10.
 29. Dréno B. What is new in the pathophysiology of acne, an overview. *J Eur Acad Dermatology Venereol.* 2017;31:8–12.
 30. Melnik BC. Acne vulgaris: The metabolic syndrome of the pilosebaceous follicle. *Clin Dermatol [Internet].* 2018;36(1):29–40. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.clindermatol.2017.09.006>
 31. Iinuma K, Sato T, Akimoto N, Noguchi N, Sasatsu M, Nishijima S, et al. Involvement of propionibacterium acnes in the augmentation of lipogenesis in hamster sebaceous glands in vivo and in vitro. *J Invest Dermatol [Internet].* 2009;129(9):2113–9. Available at: <http://dx.doi.org/10.1038/jid.2009.46>
 32. Gollnick H, Cunliffe W, Berson D, Dreno B, Finlay A, Leyden JJ, et al. Management of acne: A report from a global alliance to improve outcomes in acne. *J Am Acad Dermatol.* 2003;49(1 SUPPL.):1–37.

33. Thadepalli H, Dhawan VK. Clindamycin A Review of Fifteen Years of Experience. *Rev Infect Dis.* 1982;4(6):1133–53.
34. Smieja M. Current indications for the use of clindamycin: A critical review. *Can J Infect Dis.* 1998;9(1):22–8.
35. Dhawan VK, Thadepalli H. Clindamycin: A Review of Fifteen Years of Experience. *Rev Infect Dis.* 1982;4(6):1133–53.
36. Gemmell CG, Peterson PK, Schmeling D, Kim Y, Mathews J, Wannamaker L, et al. Potentiation of Opsonization and Phagocytosis of *Streptococcus pyogenes* following Growth in the Presence of Clindamycin. *J Clin Invest.* 1981;67:1249–56.
37. Hoogdalem EJ Van. Transdermal absorption of topical anti-acne agents in man; review of clinical pharmacokinetic data. *J Eur Acad Dermatol Venereol.* 1998;11.
38. Amr S, Brown MB, Martin GP, Forbes B. Activation of clindamycin phosphate by human skin. *J Appl Microbiol.* 2001;90(4):550–4.
39. Sp MJ. Lincomycin , clindamycin and their applications. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2004;64:455–64.
40. USP. Clindamycin Phosphate – official monographs USP 40. United States Pharmacop. 2018;
41. Klainer AS. Clindamycin. *Med Clin North Am.* 1987;71(6):1169–75.
42. Brasil. Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas Hidradenite Supurativa [Internet]. Relatório de Recomendação nº 473. 2019. 28 p. Available at: http://conitec.gov.br/images/Consultas/Relatorios/2019/Relatorio_PCDT_Hidradenite_Supurativa_CP_35_2019.pdf
43. Hagen M, Baker M. Skin penetration and tissue permeation after topical administration of diclofenac. *Curr Med Res Opin.* 2017;0(0):000.
44. Singla V, Saini S, Joshi B, Rana AC. A new platform for topical drug delivery. *Int J Pharma Bio Sci.* 2012;3(1).
45. Kumari A, Yadav SK, Yadav SC. Biodegradable polymeric nanoparticles based drug delivery systems. *Colloids Surfaces B Biointerfaces.* 2010;75(1):1–18.
46. Goyal R, Macri LK, Kaplan HM, Kohn J. Nanoparticles and nanofibers for topical drug delivery. 2016;(ii):77–92.
47. Suri SS, Fenniri H, Singh B. Nanotechnology-based drug delivery systems. *J Occup Med.* 2007;6:1–6.
48. Pereira MN, Ushirobira CY, Cunha Filho MSS, Gelfuso GM, Gratieri T. Nanotechnology advances for hair loss. *Ther Deliv.* 2018;
49. Nagpal K, Singh SK, Mishra DN. Chitosan nanoparticles: A promising system in novel drug delivery. *Chem Pharm Bull.* 2010;58(11):1423–30.
50. Fan W, Yan W, Xu Z, Ni H. Formation mechanism of monodisperse, low molecular weight chitosan nanoparticles by ionic gelation technique. *Colloids Surfaces B Biointerfaces* [Internet]. 2012;90(1):21–7. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.colsurfb.2011.09.042>
51. Sreekumar S, Goycoolea FM, Moerschbacher BM, Rivera-Rodriguez GR.

- Parameters influencing the size of chitosan-TPP nano- and microparticles. *Sci Rep* [Internet]. 2018;8(1):1–11. Available at: <http://dx.doi.org/10.1038/s41598-018-23064-4>
52. Raafat D, Sahl HG. Chitosan and its antimicrobial potential - A critical literature survey. *Microb Biotechnol*. 2009;2(2 SPEC. ISS.):186–201.
 53. Koukaras EN, Papadimitriou SA, Bikiaris DN, Froudakis GE. Insight on the formation of chitosan nanoparticles through ionotropic gelation with tripolyphosphate. *Mol Pharm*. 2012;9(10):2856–62.
 54. Schanté CE, Zuber G, Herlin C, Vandamme TF. Chemical modifications of hyaluronic acid for the synthesis of derivatives for a broad range of biomedical applications. *Carbohydr Polym*. 2011;85(3):469–89.
 55. Mero A, Campisi M. Hyaluronic acid bioconjugates for the delivery of bioactive molecules. *Polymers (Basel)*. 2014;6(1):346–69.
 56. Knopf-Marques H, Pravda M, Wolfova L, Velebny V, Schaaf P, Vrana NE, et al. Hyaluronic Acid and Its Derivatives in Coating and Delivery Systems: Applications in Tissue Engineering, Regenerative Medicine and Immunomodulation. *Adv Healthc Mater* [Internet]. novembro de 2016 [citado 8 de setembro de 2019];5(22):2841–55. Available at: <http://doi.wiley.com/10.1002/adhm.201600316>
 57. Mathes C, Melero A, Conrad P, Vogt T, Rigo L, Selzer D, et al. Nanocarriers for optimizing the balance between interfollicular permeation and follicular uptake of topically applied clobetasol to minimize adverse effects. *J Control Release*. 2016;223:207–14.
 58. Rho JG, Han HS, Han JH, Lee H, Nguyen VQ, Lee WH, et al. Self-assembled hyaluronic acid nanoparticles: Implications as a nanomedicine for treatment of type 2 diabetes. *J Control Release* [Internet]. 2018;279:89–98. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2018.04.006>
 59. Huang G, Huang H. Application of hyaluronic acid as carriers in drug delivery. *Drug Deliv* [Internet]. 2018;25(1):766–72. Available at: <https://doi.org/10.1080/10717544.2018.1450910>
 60. Brasil. Fosfato de clindamicina -. In: *Farmacopeia Brasileira*. 6° ed 2019. p. 858–61.
 61. Teichmann A, Jacobi U, Ossadnik M, Richter H, Koch S, Sterry W, et al. Differential Stripping: Determination of the Amount of Topically Applied Substances Penetrated into the Hair Follicles. *J Invest Dermatol* [Internet]. 1 de agosto de 2005 [citado 13 de agosto de 2019];125(2):264–9. Available at: [https://www.jidonline.org/article/S0022-202X\(15\)32389-7/fulltext#.XVKftd02fu8.mendeley](https://www.jidonline.org/article/S0022-202X(15)32389-7/fulltext#.XVKftd02fu8.mendeley)
 62. ICH. Harmonised Tripartite Guideline - Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology - Q2 (R1). Geneva, Switzerland,. 2005;
 63. P. CALVO, C. REMUNˆAˆN-LOˆPEZ, J. L. VILA-JATO and MJA. Novel Hydrophilic Chitosan– Polyethylene Oxide Nanoparticles as Protein Carriers. *J Appl Polym Sci*. 1997;63:125–32.
 64. Oyarzun-Ampuero FA, Goycoolea FM, Torres D, Alonso MJ. A new drug

- nanocarrier consisting of polyarginine and hyaluronic acid. *Eur J Pharm Biopharm* [Internet]. 2011;79(1):54–7. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejpb.2011.04.008>
65. Vinardell MP, Macián M. Comparative study of the HET-CAM test and the Draize eye test for assessment of irritancy potential. *Toxicol Vitr* [Internet]. junho de 1994 [citado 19 de agosto de 2019];8(3):467–70. Available at: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/0887233394901708>
 66. Batista-Duharte A, Jorge Murillo G, Pérez UM, Tur EN, Portuondo DF, Martínez BT, et al. The Hen's Egg Test on Chorioallantoic Membrane: An Alternative Assay for the Assessment of the Irritating Effect of Vaccine Adjuvants. *Int J Toxicol*. 2016;35(6):627–33.
 67. FDA. Validation of chromatographic methods. *Anal Instrum Handbook*, Third Ed. 2004;(November):1015–33.
 68. Brasil. Farmacopeia Brasileira. Vol. 1, Farmacopeia Brasileira, 6ª edição. 2019. 60–69, 72–85 p.
 69. Liu P, De Wulf O, Laru J, Heikkilä T, Van Veen B, Kiesvaara J, et al. Dissolution studies of poorly soluble drug nanosuspensions in non-sink conditions. *AAPS PharmSciTech*. 2013;14(2):748–56.
 70. Galia E1, Nicolaidis E, Hörter D, Löbenberg R, Reppas C DJ. Evaluation of various dissolution media for predicting in vivo performance of class I and II drugs. Frankfurt am Main, Germany.: Pharmaceutical research.; 1998. p. 698–705.
 71. Gong J, Zhang D, Ran Y, Zhang K, Du S. Solvates and polymorphs of clindamycin phosphate: Structural, thermal stability and moisture stability studies. *Front Chem Sci Eng*. 2017;11(2):220–30.
 72. Bhattacharjee S. DLS and zeta potential – What they are and what they are not? *J Control Release*. 2016;235:337–51.
 73. Honary S, Zahir F. Effect of Zeta Potential on the Properties of Nano-Drug Delivery Systems - A Review (Part 2). *Trop J Pharm Res*. 2013;12(April):265–73.
 74. Wu L, Zhang J, Watanabe W. Physical and chemical stability of drug nanoparticles. *Adv Drug Deliv Rev*. 2011;63(6):456–69.
 75. Taurozzi JS, Hackley VA, Wiesner MR. Ultrasonic dispersion of nanoparticles for environmental, health and safety assessment issues and recommendations. *Nanotoxicology*. 2011;5(4):711–29.
 76. Asayama S, Nogawa M, Takei Y, Akaike T, Maruyama A. Synthesis of Novel Polyampholyte Comb-Type Copolymers Consisting of a Poly(L -lysine) Backbone and Hyaluronic Acid Side Chains for a DNA Carrier. *Bioconjug Chem* [Internet]. julho de 1998 [citado 8 de setembro de 2019];9(4):476–81. Available at: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/bc970213m>
 77. Greenman J. Follicular pH and the Development of Acne. *Int J Dermatol*. 1981;20(10):656–8.
 78. Öhman H, Vahlquist A. The pH gradient over the stratum corneum differs in X-linked recessive and autosomal dominant ichthyosis: A clue to the molecular

- origin of the “acid skin mantle”? *J Invest Dermatol*. 1998;111(4):674–7.
79. Gelfuso GM, Barros MA de O, Delgado-Charro MB, Guy RH, Lopez RFV. Iontophoresis of minoxidil sulphate loaded microparticles, a strategy for follicular drug targeting? *Colloids Surf B Biointerfaces*. 2015;134:408–12.
 80. Daum N, Tscheka C, Neumeyer A, Schneider M. Novel approaches for drug delivery systems in nanomedicine: Effects of particle design and shape. *Wiley Interdiscip Rev Nanomedicine Nanobiotechnology*. 2012;4(1):52–65.
 81. Nangia A, Patil S, Berner B, Boman A, Maibach H. In vitro measurement of transepidermal water loss: A rapid alternative to tritiated water permeation for assessing skin barrier functions. *Int J Pharm*. 1998;170(1):33–40.
 82. Trauer S, Patzelt A, Otberg N, Knorr F, Rozycki C, Balizs G, et al. Permeation of topically applied caffeine through human skin - A comparison of in vivo and in vitro data. *Br J Clin Pharmacol*. 2009;68(2):181–6.
 83. Hadgraft J. Passive enhancement strategies in topical and transdermal drug delivery. *Int J Pharm*. 1999;184(1):1–6.
 84. Lapteva M, Möller M, Gurny R, Kalia YN. Self-assembled polymeric nanocarriers for the targeted delivery of retinoic acid to the hair follicle. *Nanoscale*. 2015;7(44):18651–62.
 85. Kandekar SG, Del Río-Sancho S, Lapteva M, Kalia YN. Selective delivery of adapalene to the human hair follicle under finite dose conditions using polymeric micelle nanocarriers. *Nanoscale*. 2018;10(3):1099–110.
 86. Matos BN, Reis TA, Gratieri T, Gelfuso GM. Chitosan nanoparticles for targeting and sustaining minoxidil sulphate delivery to hair follicles. *Int J Biol Macromol* [Internet]. 2015;75:225–9. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2015.01.036>