

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA  
FACULDADE DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

TAMARA ÂNGELO DE OLIVEIRA SANTOS DAMASCENO

**Combinação de nanocarreadores lipídicos e métodos físicos para retenção de  
propionato de clobetasol em folículos pilosos**

BRASÍLIA - DF

2018

Tamara Ângelo de Oliveira Santos Damasceno

Combinação de nanocarreadores lipídicos e métodos físicos para retenção de  
propionato de clobetasol em folículos pilosos

Tese de Doutorado 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 Doutora em Ciências Farmacêuticas.

Orientadora: Prof<sup>ª</sup> Dr<sup>ª</sup> Tais Gratieri

Coorientador: Prof. Dr. Marcílio Sérgio Soares da Cunha Filho

Coorientador: Prof. Dr. Marc Schneider

Brasília - DF

2018

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.

?D155c Ângelo de Oliveira Santos Damasceno, Tamara  
Combinação de nanocarreadores lipídicos e métodos físicos  
para retenção de propionato de clobetasol em folículos  
pilosos / Tamara Ângelo de Oliveira Santos Damasceno;  
orientador Tais Gratieri. -- Brasília, 2018.  
117 p.

Tese (Doutorado - Doutorado em Ciências Farmacêuticas) -  
Universidade de Brasília, 2018.

1. tecnologia farmacêutica. 2. nanotecnologia. 3.  
dermatologia. 4. permeação cutânea. I. Gratieri, Tais,  
orient. II. Título.

Tamara Ângelo de Oliveira Santos Damasceno

Título do trabalho: Combinação de nanocarreadores lipídicos e métodos físicos para retenção de propionato de clobetasol em folículos pilosos

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade de Brasília, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Ciências Farmacêuticas.

Aprovada em 20 de dezembro de 2018.

Banca Examinadora:

---

Prof<sup>ta</sup> Dr<sup>a</sup> Taís Gratieri  
Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade de Brasília

---

Prof<sup>ta</sup> Dr<sup>a</sup> Maria de Fátima Borin  
Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade de Brasília

---

Prof<sup>ta</sup> Dr<sup>a</sup> Maria Aparecida Godoy Soler Pajanian  
Instituto de Física, Universidade de Brasília

---

Prof<sup>ta</sup> Dr<sup>a</sup> Stephânia Fleury Taveira  
Faculdade de Farmácia, Universidade de Goiás

Dedico esta tese ao meu amigo, companheiro e marido Leonardo,  
e aos meus queridos e sempre presentes pais, Alexandre e Margarete.  
Vocês são meus exemplos de dedicação, perseverança e amor.

## AGRADECIMENTOS

Antes de tudo, e sempre, agradeço a Deus, por sua infinita misericórdia e incontáveis demonstrações de cuidado e amor. A Ele consagro tudo o que tenho, o que sou e o que serei.

Ao meu marido, Leonardo, agradeço pelo suporte imensurável. Obrigada por ter passado os últimos anos discutindo uma ciência que não fazia parte da sua formação. Obrigada por compreender a minha ausência, quando, tantas vezes, ela se fez necessária. Obrigada por fazer as malas, atravessar um oceano e morar em um país de língua estranha, para apoiar os meus sonhos. Obrigada por me dar forças, quando eu achava que não iria conseguir. Obrigada por seu amor. Aos meus pais, Alexandre e Margarete, agradeço por serem meu porto-seguro, minha certeza de pertencimento, minha tranquilidade de saber meu lugar no mundo. Junto com meus irmãos, Filipe e Alexandre, de alguma maneira, sempre me acompanharam, aonde quer que eu fosse, tornando a vida mais leve. Aos meus sogros, Juraci e Mariza, agradeço por todo carinho, compreensão e acolhimento. Família, vocês são fundamentais sempre!

À minha orientadora, Prof<sup>ta</sup> Dr<sup>a</sup> Taís Gratieri, agradeço por cada oportunidade que me deu durante o doutorado. Seu exemplo e incentivo me proporcionaram participar de várias pesquisas, desenvolver atividades relacionadas ao planejamento e administração de projetos científicos e auxiliar na coorientação de outros alunos. Obrigada por tanto aprendizado. Obrigada por aprovar a minha atuação como docente durante o período do doutorado. Obrigada por me indicar para o doutorado-sanduiche. Obrigada pela confiança e pelo apoio. Sem dúvida, todas essas oportunidades contribuíram de forma muito positiva para o desenvolvimento das minhas habilidades e vocação.

Ao Prof. Dr. Marcílio Sérgio Soares da Cunha Filho e ao Prof. Dr. Guilherme Martins Gelfuso agradeço pela colaboração científica. Nossas discussões foram enriquecedoras. Obrigada pela generosidade de me acolherem como parte do seu grupo de pesquisa. A participação de vocês foi de suma importância para a minha formação.

Aos colegas e amigos do Laboratório de Tecnologia de Medicamentos, Alimentos e Cosméticos (LTMAC), da Universidade de Brasília, também declaro minha gratidão. Obrigada Ana Elise, Breno, Felipe, Fernando, Geisa, Giselly, Giulian, Larissa, Lorena, Luana, Ludmila, Maíra, Mairinha, Maria Cristina, Natália, Natane, Paula, Ricardo, Sarah, Seila, Thaiene e Wanessa. Obrigada por dividirem as rotinas de experimentos, soluções de problemas e reflexões científicas. Agradeço também aos colegas docentes e aos discentes da

Faculdade de Ceilândia e da LS Educacional, em especial à Prof<sup>ta</sup> Dr<sup>a</sup> Izabel Silva, à Prof<sup>ta</sup> Dr<sup>a</sup> Paula Martins e à Prof<sup>ta</sup> MSc. Anna Maly Eduardo, por me acompanharem nessa jornada. Mas agradeço, ainda mais, por permitirem que nossa relação extrapolasse para além das paredes dos laboratórios e das salas de aula. Cada um de vocês sabe a extensão dos meus sentimentos. Sempre guardarei com carinho na minha memória esses anos que compartilhamos.

Ao Prof. Dr. Marc Schneider agradeço por ter me recebido na Alemanha, junto aos outros integrantes do seu grupo de pesquisa, no *Institut für Biopharmazie und Pharmazeutische Technologie*, da *Universität des Saarlandes*. Obrigada queridos Afra, Agnes, Alexandra, Alina, Aljoscha, Baseer, Carolin, Daniel, Enkeleda, Isabelle, Karola, Marc, Marcel, Marijas, Marilena, Nesma, Nicole, Peter, Sarah, Thorben e Valentin. Seu acolhimento profissional e pessoal permitiram que uma experiência com tantos percalços se tornasse tão prazerosa e recompensante. Obrigada por nos ensinarem tanto. Obrigada por nos fazerem sentir em casa, em um país que não era o nosso.

Aos colaboradores externos agradeço pelo suporte, sem o qual este trabalho não seria possível. Obrigada Prof<sup>ta</sup> Dr<sup>a</sup> Stephânia Fleury Taveira, Lígia Andrade e Luís Antônio Silva, da Universidade de Goiás, pelo auxílio na produção das nanopartículas lipídicas. Agradeço ao Prof. Dr. Robert Lemor e ao Prof. Dr. Michael Möller, por possibilitarem os estudos com laser na *Hochschule für Technik und Wirtschaft des Saarlandes*. Agradeço a Sandra Schäfer, do laboratório *Anorganische Festkörperchemie*, da *Universität des Saarlandes*, pelo auxílio na produção de nanopartículas metálicas. Agradeço a Chiara De Rossi, do *Helmholtz-Institut für Pharmazeutische Forschung Saarland*, pelo auxílio na obtenção de imagens de microscopia eletrônica de varredura. Agradeço à Bonasa, em Brasília, e à Färber, em Zweibrücken, pela doação das peles de porco para os experimentos de permeação cutânea.

Agradeço a participação das agências de fomento neste projeto científico. O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES), com Código de Financiamento 001. O doutorado-sanduíche teve financiamento da organização alemã *Deutscher Akademischer Austauschdienst* (DAAD), com a bolsa de estudos *Bi-nationally Supervised Doctoral Degrees 2017/18*, número de financiamento 57299293. O Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e a Fundação de Apoio à Pesquisa do Distrito Federal (FAP-DF) também colaboraram com financiamento de equipamentos, reagentes e participações em eventos. Sou grata por todo o suporte financeiro concedido, que foi de grande importância para a realização deste trabalho.

A todos, de coração, muito obrigada!

*Tudo tem o seu tempo determinado, e há tempo para todo o propósito debaixo do céu.*

*Há tempo de nascer, e tempo de morrer; tempo de plantar, e tempo de arrancar o que se plantou;*

*Tempo de matar, e tempo de curar; tempo de derrubar, e tempo de edificar;*

*Tempo de chorar, e tempo de rir; tempo de prantear, e tempo de dançar;*

*Tempo de espalhar pedras, e tempo de ajuntar pedras; tempo de abraçar, e tempo de afastar-se de abraçar;*

*Tempo de buscar, e tempo de perder; tempo de guardar, e tempo de lançar fora;*

*Tempo de rasgar, e tempo de coser; tempo de estar calado, e tempo de falar;*

*Tempo de amar, e tempo de odiar; tempo de guerra, e tempo de paz.*

(Eclesiastes 3:1-8)



## RESUMO

DAMASCENO, Tamara Ângelo de Oliveira Santos. Combinação de nanocarreadores lipídicos e métodos físicos para retenção de propionato de clobetasol em folículos pilosos. Brasília, 2018. 117 f. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas) – Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade de Brasília, Brasília, 2018.

O propionato de clobetasol (CLO) é um glicocorticoide usado no tratamento de várias doenças dermatológicas, como eczema e psoríase. Estudos recentes sugerem sua aplicação também a distúrbios do couro cabeludo e cabelo causadas por inflamação. Em tais condições, os folículos pilosos (FP) não são apenas sítio-alvo, mas também podem atuar como reservatórios de fármacos. Portanto, um tratamento capaz de direcionar o fármaco especificamente para o FP poderia resultar em maior eficácia e segurança quando comparado aos medicamentos orais ou tópicos tradicionais. Uma das estratégias para o direcionamento aos FP é o uso de formulações contendo nanopartículas lipídicas. Outra abordagem promissora é a aplicação de métodos físicos para promoção da permeação. O objetivo deste estudo foi desenvolver um nanossistema e observar sua eficácia combinando diferentes técnicas para aumentar a retenção de CLO no FP. Carreadores lipídicos nanoestruturados (CLN) foram produzidos com CLO 0,05%. As partículas foram caracterizadas em termos de tamanho, PDI, potencial zeta, estabilidade e efeito TEWL. Os experimentos de liberação do fármaco e permeação cutânea *in vitro* foram conduzidos utilizando células de difusão de Franz. A penetração do fármaco em diferentes camadas da pele foi avaliada após aplicação passiva de CLN e após o uso de irradiação infravermelha (IV), ultrassom (US) ou massagem. A remoção diferencial recuperou o CLO do estrato córneo (EC), FP e pele remanescente (PR) e o fármaco foi quantificado por um método HPLC-UV validado. Formulação de CLN contendo corante fluorescente foi produzida e sua penetração cutânea foi observada por microscopia confocal. Os CLN obtidos apresentaram tamanho em torno de 180 nm, com PDI abaixo de 0,2 e potencial zeta negativo. A formulação apresentou estabilidade por 30 dias sob refrigeração e não causou qualquer dano nos testes de TEWL. As partículas demonstraram liberação prolongada do fármaco por mais de 3 dias. O CLN foi capaz de aumentar a retenção folicular de CLO cerca de 4,5 vezes em comparação com uma solução hidroalcoólica de CLO. Em comparação a um creme comercial, estes valores atingiram cerca de 40 vezes. Imagens de microscopia confocal confirmaram que o CLN favoreceu a retenção folicular. A aplicação de CLN seguida de IV não mostrou benefícios em termos de direcionamento ao FP. Após o tratamento com US, a retenção de CLO aumentou tanto para FP como para PR, em comparação com a exposição passiva de CLN. O uso de massagem resultou em mais que o dobro da quantidade de CLO no FP em relação à aplicação passiva de CLN. O CLO não foi observado no meio receptor para nenhum dos tratamentos realizados, indicando que o fármaco foi retido nas camadas da pele. A formulação desenvolvida mostrou grande potencial para direcionar o CLO para o FP. A combinação de aplicação de CLN com massagem demonstrou ser uma boa abordagem para melhorar a retenção folicular de CLO. O uso das estratégias apresentadas pode possibilitar a redução da dose e da frequência de aplicação do medicamento, resultando em maior segurança e eficácia para os pacientes.

Palavras-chave: tecnologia farmacêutica, nanotecnologia, dermatologia, permeação cutânea.

## ABSTRACT

DAMASCENO, Tamara Ângelo de Oliveira Santos. Combinação de nanocarreadores lipídicos e métodos físicos para retenção de propionato de clobetasol em folículos pilosos. Brasília, 2018. 117 f. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas) – Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade de Brasília, Brasília, 2018.

Clobetasol propionate (CLO) is a glucocorticoid used to treat several dermatological diseases such as eczema and psoriasis. Recent studies suggest its application also to inflammatory-caused scalp and hair disorders. In such conditions hair follicles (HF) are not only target site, but also can act as drug reservoirs. Therefore, a treatment capable to provide a specific drug delivery into the HF could result in higher effectiveness and safety when compared to oral or traditional topical medications. One of the strategies for HF targeting is the use of formulations containing lipid-based nanoparticles. Another promising approach is the application of physical methods for penetration enhancement. The aim of this study was to develop a nanosystem and observe the efficacy of combining different techniques to increase CLO retention in the HF. Nanostructured lipid carriers (NLC) were produced with CLO 0.05%. Particles were characterized in terms of size, PDI, zeta potential, stability and TEWL effect. Drug release experiments and in vitro skin permeation were conducted using Franz diffusion cells. Drug penetration in different skin layers was evaluated after passive NLC application and after the use of infrared irradiation (IR), ultrasound (US) or massage. Differential tape stripping recovered CLO from stratum corneum (SC), HF and remaining skin (RS) and the drug was further quantified by a validated HPLC-UV method. NLC containing fluorescent dye were produced and their cutaneous penetration was observed by confocal microscopy. Obtained NLC presented sizes around 180 nm, with PDI below 0.2 and negative zeta potential. The formulation presented stability for 30 days under refrigeration and did not show any harm in TEWL tests. Particles demonstrated sustained drug release for more than 3 days. NLC were capable of increase CLO follicular retention about 4.5 times compared to CLO hydroalcoholic solution. In comparison to a commercial cream, these values reached about 40 times. Confocal images confirmed NLC favoured follicular delivery. NLC application followed by IR showed no benefit in terms of drug delivery. After US treatment, CLO retention increased for both HF and RS, compared to passive NLC exposition. Use of massage resulted in more than double the amount of CLO in the HF in relation to NLC passive application. CLO was not observed in the acceptor medium for any of the performed treatments, indicating that the drug was retained in the skin layers. The developed formulation showed great potential for delivering CLO to HF. The combination of NLC application with massage seems to be a good approach to enhance CLO follicular retention. The use of the presented strategies could enable the reduction of dose and frequency of drug application resulting in increased safety and efficacy for the patients.

Keywords: pharmaceutical technology, nanotechnology, dermatology, skin permeation.

## LISTA DE FIGURAS

### Capítulo 2 – Revisão da literatura

<b>Figura 2.1</b> Esquema representativo da estrutura e componentes celulares da pele. Adaptado de Pasparakis; Haase; Nestle, 2014. Reproduzido mediante autorização. ....	22
<b>Figura 2.2</b> Fórmula estrutural do propionato de clobetasol. ....	25
<b>Figura 2.3</b> Pacientes com alopecia universalis e alopecia totalis antes e após 2 meses de tratamento com pomada de propionato de clobetasol 0,05%, sob oclusão. Fonte: Tosti et al, 2003. Reproduzida mediante autorização. ....	26
<b>Figura 2.4</b> Representação esquemática das possíveis vias de penetração cutânea: (1) via de penetração intercelular, em torno dos corneócitos, (2) via de penetração intracelular através dos corneócitos, (3) via de penetração folicular. Morfologia do folículo piloso: (A) região do infundíbulo, (B) antígenos próximos ao infundíbulo, (C) glândula sebácea, (D) segmento intermediário (istmo), (E) antígenos ao redor do bulbo. Adaptada de: Patzelt & Lademann, 2013. Reproduzida mediante autorização. ....	28
<b>Figura 2.5</b> Principais estratégias utilizadas para o aprimoramento da permeação tópica e transdérmica de fármacos. Adaptado de: Borgheti-Cardoso et al., 2016. Reproduzido mediante autorização. ....	29

### Capítulo 4.1 – Desenvolvimento e validação de método analítico para quantificação do propionato de clobetasol em folículos pilosos e diferentes camadas da pele

<b>Figura 4.1.1</b> Obtenção da pele de orelha de porco para estudos de permeação cutânea <i>in vitro</i> . ....	38
<b>Figura 4.1.2</b> Pele de porco disposta sobre papel de filtro embebido com tampão HEPES pH 7,4. A área da pele foi delimitada por fita adesiva laminada com círculo de 15 mm de diâmetro. ....	38
<b>Figura 4.1.3</b> Esquema representativo (A) e fotografias (B) do método de remoção diferencial. Dez fitas adesivas são utilizadas para remover o estrato córneo (1). Em seguida, o conteúdo do folículo piloso é removido com auxílio de cola de cianoacrilato com duas fitas adesivas (2-4). Por fim, a pele remanescente é obtida, após as bordas da área delimitada serem cortadas (5). ....	39
<b>Figura 4.1.4</b> Esquema representativo do preparo de amostras de propionato de clobetasol e extrato de pele para análise por HPLC. ....	40
<b>Figura 4.1.5</b> Representação do espectro de absorção da solução de propionato de clobetasol em metanol na concentração 0,5 µg/mL. ....	44
<b>Figura 4.1.6</b> Sobreposição de cromatogramas representativos de CLO: propionato de clobetasol, EC: estrato córneo, FP: folículo piloso e PR: pele remanescente. Método de HPLC-UV: coluna RP-C18 (4,6 mm x 15 cm x, 5 µm), fase móvel composta por metanol: acetonitrila: água (50:15:35, v/v), vazão de 1,2 mL/min, temperatura de 30 °C, volume de injeção de 50 µL e detecção a 240 nm. ....	46
<b>Figura 4.1.7</b> Seletividade do método para quantificação do propionato de clobetasol (CLO). Quantificação do CLO (7,5 µg/mL) isolado e adicionado aos extratos de pele. Análises em termos de A) tempo de retenção e B) área do pico de CLO. n = 6. EC: estrato córneo, FP: folículo piloso, PR: pele remanescente. ....	48
<b>Figura 4.1.8</b> Gráficos de superfície de resposta para o ensaio de robustez do método de quantificação do propionato de clobetasol, correspondentes ao efeito de variações analíticas na A) área do pico e B) tempo de retenção (TR) do propionato de clobetasol. T: temperatura do forno; VFM: vazão da fase móvel; W: porcentagem de água na fase móvel. ....	49

**Figura 4.1.9** Representação gráfica da curva analítica do propionato de clobetasol (CLO) na faixa de concentração de 0,5 a 15,0 µg/mL. Equação da reta:  $y = 81698,6x - 1321,6$ ; coeficiente de correlação linear:  $r = 0,9996$ . ..... 50

## **Capítulo 4.2 – Produção de carreadores lipídicos nanoestruturados para aumento da retenção de propionato de clobetasol no folículo piloso**

**Figura 4.2.1** Esquema representativo do preparo dos carreadores lipídicos nanoestruturados contendo propionato de clobetasol (CLO). ..... 56

**Figura 4.2.2** Célula de difusão do tipo Franz. .... 59

**Figura 4.2.3** Medida de perda de água. A) a pele é montada na célula de Franz e deixada em repouso por 30 minutos; B) o compartimento doador é retirado; C e D) o sensor é posicionado sobre a pele e a medida é realizada. .... 61

**Figura 4.2.4** Esquema representativo do ensaio de permeação cutânea *in vitro*. EC: estrato córneo; FP: folículo piloso; HPLC: cromatografia líquida de alta eficiência (do inglês: *High Performance Liquid Chromatography*) PR: pele remanescente. .... 62

**Figura 4.2.5** Célula de Franz montada para estudo de permeação cutânea *ex vivo*. .... 64

**Figura 4.2.6** Aspecto visual da formulação constituída de carreadores lipídicos nanoestruturados contendo propionato de clobetasol. .... 64

**Figura 4.2.7** Imagens dos carreadores lipídicos nanoestruturados contendo propionato de clobetasol obtidas por microscopia eletrônica de varredura. Escalas = 1 µm e 200 nm (superior); 300 e 200 nm (inferior). .... 66

**Figura 4.2.8** Gráfico de distribuição de tamanho de partícula da formulação de CLN-CLO por intensidade de espalhamento de luz. .... 67

**Figura 4.2.9** Perfil de liberação do propionato de clobetasol (CLO) em solução aquosa de lauril sulfato de sódio (LSS) 1,0%. Resultados apresentados como média ± DP; n = 6. .... 71

**Figura 4.2.10** Perfil de liberação das formulações. Resultados apresentados como média ± DP; n = 6. CLN-CLO: carreador lipídico nanoestruturado contendo propionato de clobetasol; CLO-EtOH 45 V: CLO livre em EtOH<sub>(aq)</sub> (45%, v/v). .... 72

**Figura 4.2.11** Quantificação do propionato de clobetasol (CLO) após ensaios *in vitro* de permeação cutânea em células de Franz com aplicação passiva das formulações. Não foi observado CLO na solução receptora. Resultados apresentados como média ± DP; n = 6. CLN: carreador lipídico nanoestruturado; CLO-EtOH 45 V: CLO livre em EtOH<sub>(aq)</sub> (45%, v/v); EC: estrato córneo; FP: folículo piloso; PR: pele remanescente. .... 73

**Figura 4.2.12** Efeito das formulações sobre a perda de água transepidérmica. Resultados apresentados como média ± DP. Foram realizadas 3 análises por cada amostra. Cada análise consistiu em uma medida por segundo, com no mínimo 20 repetições e até que o desvio padrão fosse menor ou igual a 0,2 nas últimas cinco medidas. CLN-CLO: carreador lipídico nanoestruturado contendo propionato de clobetasol; CLO-EtOH 45 V: CLO livre em EtOH<sub>(aq)</sub> (45%, v/v); TEWL: perda de água transepidérmica (do inglês: *Transepidermal Water Loss*); \* = p < 0,05; \*\*\* = p < 0,01; \*\*\*\* = p < 0,0001 ..... 76

**Figura 4.2.13** Sobreposição dos espectros de substâncias fluorescentes. .... 79

**Figura 4.2.14** Folículo piloso após ensaios *in vitro* de permeação cutânea em células de Franz com aplicação passiva de solução hidroetanólica de rodamina 6G. Imagens obtidas por microscopia óptica (esquerda) e confocal (direita). Escala = 200 µm. .... 80

**Figura 4.2.15** Folículo piloso após ensaios *in vitro* de permeação cutânea em células de Franz com aplicação passiva de formulação constituída de carreadores lipídicos nanoestruturados contendo rodamina 6G. Imagens obtidas por microscopia óptica (superior) e confocal (inferior). Escala = 500 µm. .... 81

### Capítulo 4.3 – Aplicação de métodos físicos a nanossistema contendo propionato de clobetasol

- Figura 4.3.1** Esquema representativo do ensaio de permeação cutânea *in vitro*. Comparação entre permeação passiva e ativa. EC: estrato córneo; FP: folículo piloso; IV: infravermelho; PR: pele remanescente; US: ultrassom. .... 85
- Figura 4.3.2** Configuração do laser para irradiação na pele. Direita: vista lateral; Esquerda: vista superior. .... 87
- Figura 4.3.3** Equipamento doméstico de ultrassom dermatológico. .... 88
- Figura 4.3.4** Montagem de pele para avaliação do efeito da massagem em estudos de permeação cutânea *in vitro*. .... 89
- Figura 4.3.5** Aspecto visual da formulação contendo nanopartículas de magnetita. .... 90
- Figura 4.3.6** Nanopartículas de magnetita. Imagens obtidas por microscopia eletrônica de transmissão. Escala = 20 nm. .... 90
- Figura 4.3.8** Quantificação do propionato de clobetasol (CLO) após ensaios *in vitro* de permeação cutânea em células de Franz modificadas. Comparação entre aplicação passiva de CLN com aplicação de CLN+NPM e laser infravermelho. Não foi observado CLO na solução receptora. Resultados apresentados como média  $\pm$  DP; n = 6. CLN: carreador lipídico nanoestruturado; EC: estrato córneo; FP: folículo piloso; PR: pele remanescente. \* P < 0,05. .... 93
- Figura 4.3.9** Quantificação do propionato de clobetasol (CLO) após ensaios *in vitro* de permeação cutânea em células de Franz modificadas. Comparação entre aplicação passiva de CLN com aplicação de ultrassom (US). Não foi observado CLO na solução receptora. Resultados apresentados como média  $\pm$  DP; n = 6. CLN: carreador lipídico nanoestruturado; EC: estrato córneo; FP: folículo piloso; PR: pele remanescente. \*\* P < 0,01. .... 96
- Figura 4.3.10** Quantificação do propionato de clobetasol (CLO) após ensaios *in vitro* de permeação cutânea em células de Franz modificadas. Comparação entre aplicação passiva de CLN com aplicação de ultrassom (US) + vibração mecânica. Não foi observado CLO na solução receptora. Resultados apresentados como média  $\pm$  DP; n = 6. CLN: carreador lipídico nanoestruturado; EC: estrato córneo; FP: folículo piloso; PR: pele remanescente. \*\* P < 0,01; \*\*\*\* P < 0,001. .... 98
- Figura 4.3.11** Quantificação do propionato de clobetasol (CLO) após ensaios *in vitro* de permeação cutânea em células de Franz modificadas. Comparação entre aplicação passiva de CLN com aplicação de massagem. Não foi observado CLO na solução receptora. Resultados apresentados como média  $\pm$  DP; n = 6. CLN: carreador lipídico nanoestruturado; EC: estrato córneo; FP: folículo piloso; PR: pele remanescente. \*\*\*\* P < 0,001. .... 99

## LISTA DE TABELAS

### **Capítulo 4.1 – Desenvolvimento e validação de método analítico para quantificação do propionato de clobetasol em folículos pilosos e diferentes camadas da pele**

<b>Tabela 4.1.1</b> Desenho fatorial para avaliação de robustez do método desenvolvido para quantificação do propionato de clobetasol.....	41
<b>Tabela 4.1.2</b> Variações nas condições analíticas para desenvolvimento de metodologia para quantificar propionato de clobetasol retido no folículo piloso e nas camadas da pele após experimentos de permeação cutânea <i>in vitro</i> .....	45
<b>Tabela 4.1.3</b> Resumo estatístico das respostas do desenho experimental (2 <sup>3</sup> ) para análise de robustez do método de quantificação do propionato de clobetasol (CLO).....	48
<b>Tabela 4.1.4</b> Dados e estatística para teste de linearidade da curva analítica (0.5 – 15.0 µg/mL) para quantificação de propionato de clobetasol .....	51
<b>Tabela 4.1.5</b> Limites de detecção (LD) e quantificação (LD) do propionato de clobetasol....	51
<b>Tabela 4.1.6</b> Repetibilidade e precisão intermediária do método de quantificação de propionato de clobetasol .....	52
<b>Tabela 4.1.7</b> Reprodutibilidade do método de quantificação de propionato de clobetasol ....	52
<b>Tabela 4.1.8</b> Recuperação do método de quantificação de propionato de clobetasol .....	53

### **Capítulo 4.2 – Produção de carreadores lipídicos nanoestruturados para aumento da retenção de propionato de clobetasol no folículo piloso**

<b>Tabela 4.2.1</b> Caracterização da formulação de carreadores lipídicos nanoestruturados contendo propionato de clobetasol após estudos de estabilidade.....	69
<b>Tabela 4.2.2</b> Solubilidade do propionato de clobetasol em solução aquosa de lauril sulfato de sódio.....	70
<b>Tabela 4.2.3</b> Solubilidade do propionato de clobetasol em solução hidroetanólica .....	71
<b>Tabela 4.2.4</b> Comparação entre fluorescência da pele e substâncias candidatas para produção de carreadores lipídicos nanoestruturados .....	78
<b>Tabela 4.2.5</b> Comparação entre características do propionato de clobetasol e rodamina 6G e as nanopartículas produzidas com estas substâncias .....	79

### **Capítulo 4.3 – Aplicação de métodos físicos a nanossistema contendo propionato de clobetasol**

<b>Tabela 4.3.1</b> Medidas de potência do Medilas D SkinPulse S a 4 cm de distância .....	91
<b>Tabela 4.3.2</b> Aquecimento produzido após irradiação por laser (940 nm) em diferentes intensidades e por diferentes tempos .....	91

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

(m/m)	massa/massa
(m/v)	massa/volume
(v/v)	volume/volume
CF	carga do fármaco
CLO	propionato de clobetasol
CLN	carreador lipídico nanoestruturado
CM	concentração mensurada
CT	concentração teórica
CV	coeficiente de variação
DMEM	meio de Eagle modificado por Dulbecco (do inglês: <i>Dulbecco's Modified Eagle's medium</i> )
DMSO	dimetilsulfóxido
DP	desvio padrão
D-PBS	salina tamponada fosfatada de Dulbecco (do inglês: <i>Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline</i> )
EC	estrato córneo
EE	eficiência de encapsulação
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
FP	folículo piloso
HFOC	metodologia de cultura de cabelo humano a partir de FP isolados (do inglês: <i>human hair follicle organ culture</i> )
HOSEC	metodologia de cultura de pele (do inglês: <i>human organotypic skin explant in culture method</i> )
HPLC	cromatografia líquida de alta eficiência (do inglês: <i>High Performance Liquid Chromatography</i> )
ICH	<i>International Conference of Harmonization</i>
IV	infravermelho
LD	limite de detecção
LQ	limite de quantificação
LTMAC	Laboratório de Tecnologia de Medicamentos, Alimentos e Cosméticos
LSS	lauril sulfato de sódio
MET	microscopia eletrônica de transmissão

MEV	microscopia eletrônica de varredura
MM	massa molecular
MTT	brometo de tiazolil azul de tetrazólio
NLS	nanopartícula lipídica sólida
NPM	nanopartícula de magnetita
PdI	índice de polidispersividade (do inglês: <i>Polydispersity Index</i> )
PR	pele remanescente
R6G	rodamina 6G
T	temperatura
TEWL	perda de água transepidermica (do inglês: <i>Transepidermal Water Loss</i> )
TR	tempo de retenção
US	ultrassom
UV	ultravioleta
UV/VIS	ultravioleta/visível
VFM	vazão da fase móvel
W	porcentagem de água na fase móvel



# SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO GERAL.....</b>	<b>21</b>
<b>2 REVISÃO DA LITERATURA .....</b>	<b>22</b>
2.1 A pele.....	22
2.1.1 Pelos e cabelos.....	23
2.1.2 Patologias inflamatórias associadas à pele, pelo e couro cabeludo .....	24
2.2 Propionato de clobetasol.....	25
2.3 Vias de administração epidérmica e folicular.....	27
2.4 Abordagens para aprimoramento da penetração de fármacos na pele .....	29
2.4.1 Nano/Microsistemas de aplicação tópica.....	30
2.4.2 Métodos físicos para aumento da penetração cutânea de fármacos .....	31
<b>3 OBJETIVOS.....</b>	<b>34</b>
3.1 Objetivo geral.....	34
3.2. Objetivos específicos .....	34
<b>4 SEÇÃO EXPERIMENTAL .....</b>	<b>35</b>
<b>4.1 DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODO ANALÍTICO PARA     QUANTIFICAÇÃO DO PROPIONATO DE CLOBETASOL EM FOLÍCULOS PILOSOS E     DIFERENTES CAMADAS DA PELE .....</b>	<b>36</b>
4.1.1 Introdução .....	36
4.1.2 Material.....	37
4.1.3 Métodos .....	37
4.1.3.1 Preparo das soluções de CLO.....	37
4.1.3.2 Determinação do comprimento de onda de absorção máxima do CLO .....	37
4.1.3.3 Tratamento da orelha de porco .....	37
4.1.3.4 Preparo das amostras de pele .....	38
4.1.3.4.1 Técnica de remoção diferencial .....	38
4.1.3.4.2 Preparo de extratos de pele.....	39
4.1.3.5 Desenvolvimento do método analítico .....	40
4.1.3.6 Validação do método analítico .....	40
4.1.3.6.1 Seletividade.....	41
4.1.3.6.2 Robustez.....	41

4.1.3.6.3 Linearidade .....	42
4.1.3.6.4 Limites de detecção e quantificação.....	42
4.1.3.6.5 Precisão .....	43
4.1.3.6.6 Exatidão .....	43
4.1.4 Resultados e discussão .....	44
4.1.4.1 Determinação do comprimento de onda de absorção máxima do CLO ....	44
4.1.4.2 Desenvolvimento do método analítico .....	44
4.1.4.3 Validação do método analítico .....	46
4.1.4.3.1 Seletividade.....	47
4.1.4.3.2 Robustez.....	48
4.1.4.3.3 Linearidade .....	50
4.1.4.3.4 Limites de detecção e quantificação.....	51
4.1.4.3.5 Precisão .....	52
4.1.4.3.6 Exatidão .....	52
4.1.5 Conclusão.....	53
<b>4.2 PRODUÇÃO DE CARREADORES LIPÍDICOS NANOESTRUTURADOS E AVALIAÇÃO DA RETENÇÃO DE PROPIONATO DE CLOBETASOL NO FOLÍCULO PILOSO .....</b>	<b>54</b>
4.2.1 Introdução .....	54
4.2.2 Material.....	55
4.2.3 Métodos .....	55
4.2.3.1 Obtenção das formulações .....	55
4.2.3.2 Caracterização das formulações.....	56
4.2.3.2.1 Rendimento.....	56
4.2.3.2.2 Análise morfológica.....	56
4.2.3.2.3 Análise granulométrica.....	57
4.2.3.2.4 Potencial zeta .....	57
4.2.3.2.5 Fármaco total .....	57
4.2.3.2.6 Eficiência de encapsulação (EE) e carga do fármaco (CF).....	57
4.2.3.2.7 Estudos de estabilidade.....	58
4.2.3.3 Avaliação da solubilidade do CLO.....	59

4.2.3.4. Estudo de liberação.....	59
4.2.3.5 Avaliação <i>in vitro</i> da permeação/penetração cutânea e acúmulo folicular do fármaco .....	60
4.2.3.5.1 Montagem do sistema de permeação .....	60
4.2.3.5.2 TEWL .....	60
4.2.3.6 Amostras fluorescentes e microscopia confocal .....	62
4.2.3.6.1 Estudos de permeação cutânea <i>ex vivo</i> com amostra fluorescente .....	63
4.2.3.7 Análise estatística .....	64
4.2.4 Resultados e discussão .....	64
4.2.4.1 Caracterização da formulação .....	64
4.2.4.1.1 Rendimento.....	65
4.2.4.1.2 Análise morfológica.....	65
4.2.4.1.3 Análise granulométrica.....	66
4.2.4.1.4 Potencial zeta .....	67
4.2.4.1.5 Fármaco total .....	67
4.2.4.1.6 EE e CF.....	68
4.2.4.1.7 Estudos de estabilidade.....	68
4.2.4.2 Avaliação da solubilidade do CLO .....	70
4.2.4.3 Estudo de liberação.....	71
4.2.4.4 Avaliação da permeação/penetração cutânea e acúmulo folicular do fármaco.....	73
4.2.4.4.1 TEWL .....	76
4.2.4.5 Amostras fluorescentes e microscopia confocal .....	77
4.2.4.6.1 Estudos de permeação cutânea <i>ex vivo</i> com amostra fluorescente .....	81
4.2.5 Conclusão.....	83
<b>4.3 APLICAÇÃO DE MÉTODOS FÍSICOS A NANOSSISTEMA CONTENDO PROPIONATO DE CLOBETASOL .....</b>	<b>84</b>
4.3.1 Introdução .....	84
4.3.2 Material.....	84
4.3.3 Métodos .....	85
4.3.3.1 Utilização de IV .....	85

4.3.3.1.1 Desenvolvimento da formulação de nanopartículas de magnetita (NPM) .....	85
4.3.3.1.2 Caracterização da formulação de NPM .....	86
4.3.3.1.3 Produção de hipertermia utilizando laser .....	87
4.3.3.2 Utilização de US .....	88
4.3.3.3 Utilização de massagem .....	89
4.3.3.4 Análise estatística .....	89
4.3.4 Resultados e discussão .....	90
4.3.4.1 Utilização de IV .....	90
4.3.4.1.1 Caracterização da formulação de NPM .....	90
4.3.4.1.2 Produção de hipertermia utilizando laser .....	91
4.3.4.1.3 Estudos de permeação cutânea com aplicação de laser IV .....	92
4.3.4.2 Utilização de US .....	95
4.3.4.3 Utilização de massagem .....	98
4.3.5 Conclusão.....	100
<b>5 CONCLUSÃO GERAL .....</b>	<b>101</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>102</b>

# 1 INTRODUÇÃO GERAL

Patologias inflamatórias dermatológicas relacionadas ao pelo e couro cabeludo vêm sendo tratadas há décadas com corticosteroides orais e tópicos (HABIF et al., 2017).

Entre os fármacos em estudo está o propionato de clobetasol (CLO). Devido a seus efeitos vasoconstritores, anti-inflamatórios, imunossupressores e antiproliferativos, o fármaco age combatendo reações autoimunes, em que as células são atacadas por linfócitos (COTSARELIS; MILLAR, 2001; UCAK et al., 2012; LANGASCO et al., 2018). Entretanto, apesar dos estudos apontarem a aplicação tópica como mais indicada, são observados efeitos adversos locais e há a possibilidade de haver absorção sistêmica, que pode levar a efeitos adversos a longo prazo (LENANE et al., 2014; PEREIRA et al., 2018; STRAZZULLA et al., 2018).

Por esse motivo, faz-se necessário o desenvolvimento de uma formulação que diminua os efeitos adversos e aumente a efetividade do tratamento. Esses requisitos podem ser alcançados por meio de nanossistemas, direcionando-se o CLO especificamente para o folículo piloso (FP), o qual pode servir como local de entrada e armazenamento, promovendo liberação controlada e prolongada do fármaco (NAFISI; MAIBACH, 2018). Assim, a utilização de nanopartículas contendo CLO capazes de possibilitar sua retenção folicular apresenta-se como uma estratégia promissora.

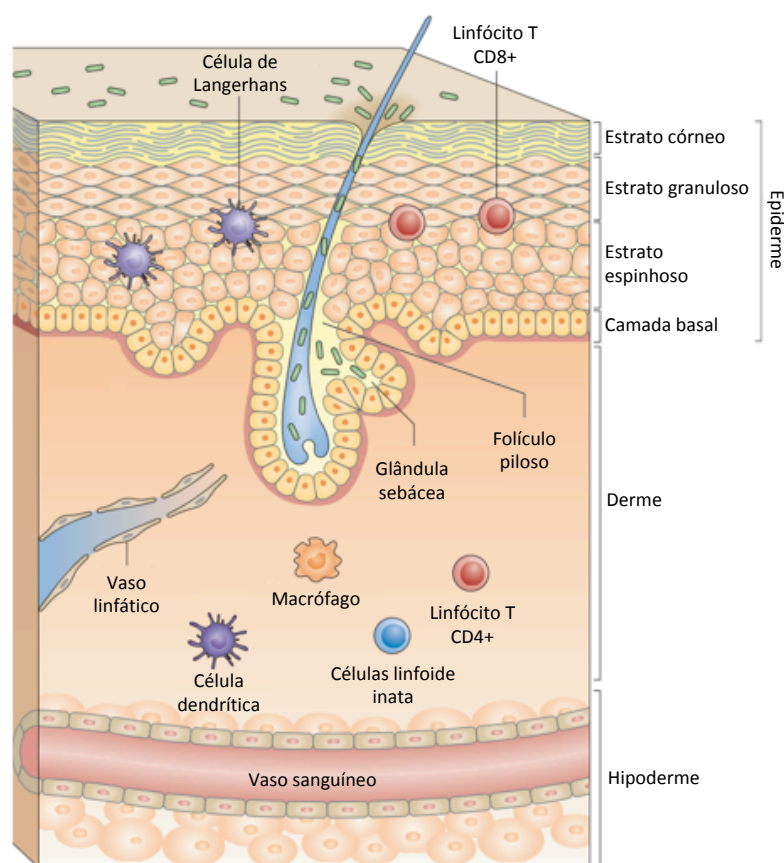
Adicionalmente, o uso combinado de métodos físicos tais como irradiação infravermelha (IV), ultrassom (US) e aplicação de massagem pode promover uma maior penetração e retenção dessas nanopartículas no FP, possibilitando a redução da frequência de aplicações necessárias, a redução da absorção sistêmica e, conseqüentemente, a redução de efeitos adversos (BORGHETI-CARDOSO et al., 2016).

Assim, o objetivo desse trabalho foi produzir uma formulação contendo CLO, que propicie o acúmulo do fármaco no FP, e avaliar a aplicação de métodos físicos ao sistema visando melhorar a eficácia da terapia tópica com esse fármaco. Desse modo, os resultados deste trabalho podem possibilitar a produção de um medicamento potencial para patologias inflamatórias associadas à pele, pelo e couro cabeludo e um protocolo de aplicação que seja mais eficaz e mais seguro que os existentes atualmente, representando um impacto significativo para os pacientes e para o mercado farmacêutico.

## 2 REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1 A pele

A pele é o maior órgão do corpo humano, corresponde a cerca de 16% do seu peso e atua como interface entre o ambiente e o corpo. Sua principal função é servir de barreira à perda de água e à penetração de substâncias potencialmente prejudiciais ao organismo (PASPARAKIS; HAASE; NESTLE, 2014; NAFISI; MAIBACH, 2018). Ela consiste basicamente de três camadas: epiderme, derme e hipoderme ou camada subcutânea (Figura 2.1).



**Figura 2.1** Esquema representativo da estrutura e componentes celulares da pele. Adaptado de Pasparakis; Haase; Nestle, 2014. Reproduzido mediante autorização.

A epiderme é a camada mais estreita e é constituída por células, chamadas queratinócitos, que se diferenciam da camada basal (ou germinativa), mais interna, até o estrato córneo (EC), camada mais superficial. Abaixo do EC está a epiderme viva ou

epiderme viável, composta de estrato granuloso, estrato espinhoso e camada basal, que tem como função renovar o EC. Na diferenciação, as células tornam-se mais achatadas, perdem o núcleo e o citoplasma, passam por um processo de queratinização e possuem menos desmossomos conectando-as às células adjacentes. No espaço entre as células do EC, também chamadas corneócitos, encontram-se diversos lipídios, incluindo ceramidas, triglicerídeos, colesterol e ácidos graxos. É o EC que confere à pele a capacidade de limitar a penetração de substâncias (HAFTEK; TEILLON; SCHMITT, 1998; BARUA; MITRAGOTRI, 2014).

A derme é entre 10 e 20 vezes mais espessa que a epiderme. Essa camada é rica em matriz extracelular constituída de colágeno e elastina e possui função mecânica e estrutural, conferindo elasticidade, flexibilidade e resistência à pele. Já a hipoderme é constituída de tecido conjuntivo frouxo e tecido adiposo, vasos sanguíneos e nervos. Sua principal função é atuar como reserva de energia e proporcionar sensações táteis, vibráteis e amortecimento do corpo. A pele apresenta, ainda, apêndices cutâneos, como unhas, glândulas sebáceas, glândulas sudoríparas e FP (CEVC et al., 1996; MONTENEGRO et al., 2016; NAFISI; MAIBACH, 2018).

Neste trabalho, a pele será analisada em termos de EC, FP e pele remanescente (PR), a qual compreende a epiderme viável e derme.

### **2.1.1 Pelos e cabelos**

Pelos são anexos cutâneos filiformes, formados por células queratinizadas e são característicos dos mamíferos. Nos humanos, eles têm funções como: proteger da luz solar direta, coletar informações sensoriais e diminuir o atrito em regiões como axilas e órgãos sexuais (JAIN; DE-EKNAMKUL, 2014; JÖNSSON et al., 2017).

A atividade cíclica do FP passa por três fases. A fase anágena dura entre dois e seis anos e é a fase de crescimento, na qual há uma grande atividade mitótica e as células tornam-se queratinizadas. A fase catágena dura cerca de duas semanas e é aquela em que o crescimento cessa e a matriz capilar regride. Por fim, na fase telógena, que dura de três a quatro meses, há a queda do cabelo, dando início a um novo ciclo. Cerca de 100 fios de cabelo caem por dia. Em geral, a concentração de fios na fase anágena é de 85-95%, na catágena de menos de 1% e na telógena de 4-14% (ROOK, 1965; HIGGINS; CHRISTIANO, 2014; JAIN; DE-EKNAMKUL, 2014).

Investigações das alterações no ciclo evolutivo do cabelo podem ser de grande valor, visto que os cabelos exercem um importante papel psicossocial, por estarem diretamente

ligados à cultura e à autoimagem (COTSARELIS; MILLAR, 2001). Pessoas com perda de cabelo relatam impacto significativo em sua qualidade de vida, uma vez que a condição pode estar relacionada a sentimentos de vulnerabilidade, baixa autoestima e perda de autoconfiança (WILLIAMSON; GONZALEZ; FINLAY, 2001).

### **2.1.2 Patologias inflamatórias associadas à pele, pelo e couro cabeludo**

Além da função de barreira mecânica, a pele atua, também, como barreira imunológica, defendendo o corpo contra infecções. A homeostase imune é garantida devido ao equilíbrio entre camadas de células da pele, células de defesa e microorganismos que colonizam a superfície da pele e os anexos cutâneos (Figura 2.1). O desequilíbrio desse sistema favorece o surgimento de patologias inflamatórias dermatológicas (PASPARAKIS; HAASE; NESTLE, 2014). Dentre as doenças inflamatórias cutâneas mais comuns, podem-se citar eczema, psoríase, líquen, dermatite atópica e dermatite seborreica. Condições especificamente relacionadas ao pelo e couro cabeludo incluem alopecia areata, alopecia fibrosante frontal, psoríase do couro cabeludo e líquen planopilaris (HABIF et al., 2017).

Alopecia é o termo geral para descrever a diminuição excessiva de pelos e atinge um grande percentual da população (COTSARELIS; MILLAR, 2001). Alguns estudos apontam que mais de 50% dos homens na faixa de 30 a 50 anos apresentam diminuição dos cabelos (ROGERS; AVRAM, 2008; HIGGINS; CHRISTIANO, 2014). Essa condição também parece afetar entre 15 e 30% das mulheres acima de 30 anos, chegando a mais de 80% para mulheres na pré-menopausa (BIRCH; MESSENGER; MESSENGER, 2001).

Especificamente, a alopecia areata é uma patologia de etiologia complexa, que envolve a perda de cabelo desigual no couro cabeludo. O principal mecanismo relaciona-se a reações autoimunes, em que as células do bulbo em anagênese são atacadas por linfócitos. Ela se manifesta como lesões não cicatriciais, arredondadas ou ovais e com bordas bem definidas. Esta patologia pode evoluir para perda de cabelo de todo o couro cabeludo (alopecia totalis) ou para a progressão extrema, resultando em ausência completa de pelos em todo corpo (alopecia universalis) (AHMAD, 1998; LEW; SHIN; SIM, 2009; ABRAHAM; TORRES; AZULAY-ABULAFIA, 2010; TRÜEB; DIAS, 2018).

Já a alopecia fibrosante frontal caracteriza-se como uma recessão cicatricial progressiva da linha frontal e temporal do cabelo. A região apresenta-se mais pálida que o restante da pele. A histoquímica revela infiltração linfocítica perifolicular com fibrose na região do istmo e infundíbulo (MORENO-RAMÍREZ; MARTÍNEZ, 2005).

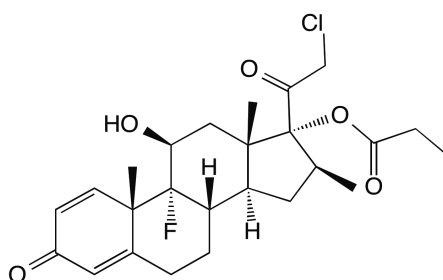


Psoríase é uma inflamação crônica imunomediada, que se manifesta como placas eritematoescamosas avermelhadas, tanto no corpo quanto no couro cabeludo, que podem se apresentar como descamações esbranquiçadas leves, até espessamento severo das placas (MAZZOTTA et al., 2007; LANGASCO et al., 2018; RAJABI-ESTARABADI et al., 2018). A manifestação no couro cabeludo acomete cerca de 79% dos pacientes. Sua histopatologia revela infiltração de células imunes, principalmente linfócitos T CD4+ e CD8+, bem como células dendríticas (JALES et al., 2012).

Por fim, líquen planopilaris é uma desordem cutânea crônica, mediada por linfócitos, que acomete os FP, destruindo-os. Pode ser observada em diferentes áreas do corpo, com progressiva inflamação, eritema perifolicular, hiperqueratinose, descamação e perda de pelos. Sensação de dor, coceira e ardor podem também estar associados (CHIEREGATO et al., 2003; KANG et al., 2008; VENDRAMINI et al., 2016).

## 2.2 Propionato de clobetasol

O CLO (Figura 2.2), é um fármaco glicocorticoide análogo da prednisolona e tem como sinônimos: 9 $\alpha$ -flúor-21-cloro-11 $\beta$ -hidróxi-16 $\beta$ -metilpregna-3,20-diona-1,4-dieno-17 $\alpha$ -propionato; clobetasol 17-propanoato; clobetasol 17-propionato; 21-cloro-9-fluoro-11 $\beta$ ,17-dihidroxi-16 $\beta$ -metilpregna-1,4-dieno-3,20-diona 17-propionato; pregna-1,4-dieno-3,20-diona, 21-cloro-9-fluoro-11-hidroxi-16-metil-17-(1-oxopropoxi)-, (11 $\beta$ ,16 $\beta$ )-; 21-Cloro-9-fluoro-11 $\beta$ ,17-dihidroxi-16 $\beta$ -metilpregna-1,4-dieno-3,20-diona 17-propionato [25122-46-7; 25122-41-2]; e (1R,2S,10S,11S,13S,14R,15S,17S)-14-(2-cloroacetil)-1-fluoro-17-hidroxi-2,13,15-trimetil-5-oxotetraciclo [8.7.0.0<sup>2</sup>,7.0<sup>11</sup>,1<sup>5</sup>] heptadeca-3,6-dien-14-il propanoato. Trata-se de um fármaco pouco hidrossolúvel (logP: 3,49), de massa molar 466,97 g/mol.

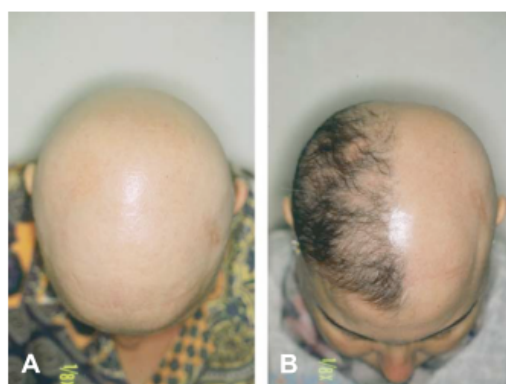


**Figura 2.2** Fórmula estrutural do propionato de clobetasol.

Este fármaco vem sendo usado há décadas, tanto de forma oral quanto tópica, para o tratamento de dermatoses (OLSEN; CORNELL, 1986; RÁCZ et al., 2013). O CLO é um dos esteroides mais potentes, com altos níveis de efetividade em casos de patologias dermatológicas inflamatórias (OLSEN; CORNELL, 1986; FELDMAN, 2005; FONTANA; BASTOS; BECK, 2010; BADILLI; ŞEN; TARIMCI, 2011; SENYIGIT; OZER, 2012; PANONNUMMAL; JAYAKUMAR; SABITHA, 2017; XIA et al., 2018). Atualmente demonstrou-se sua efetividade no tratamento tópico de condições que acometem os FP como alopecia areata, líquen planopilaris, alopecia fibrosante frontal e psoríase do couro cabeludo (TOSTI et al., 2003; FELDMAN, 2005; MAZZOTTA et al., 2007; KANG et al., 2008; SENYIGIT; OZER, 2012; UCAK et al., 2012; JALES et al., 2012; KRAGBALLE et al., 2013; BANKA et al., 2014; LENANE et al., 2014; LAJEVARDI et al., 2015; JUNG et al., 2017; TRÜEB; DIAS, 2018; LANGASCO et al., 2018).

A atividade terapêutica dos corticosteroides se dá devido aos seus efeitos vasoconstritores, anti-inflamatórios, imunossupressores e antiproliferativos. Em patologias relacionadas ao FP, eles agem combatendo reações imunes, em que as células do bulbo são atacadas por linfócitos (COTSARELIS; MILLAR, 2001; UCAK et al., 2012; LANGASCO et al., 2018).

Pesquisas indicam que a pomada de CLO a 0,05% sob oclusão é eficaz em induzir o crescimento do cabelo em pacientes com alopecia (Figura 2.3). Em estudos em que o fármaco foi aplicado em locais específicos, como metade do couro cabeludo, ocorreu regeneração do crescimento, demonstrando que a eficácia do tratamento é um resultado do efeito local do fármaco (TOSTI et al., 2003).



**Figura 2.3** Pacientes com alopecia universalis e alopecia totalis A) antes e B) após 2 meses de tratamento com pomada de propionato de clobetasol 0,05%, sob oclusão. Fonte: Tosti et al, 2003. Reproduzida mediante autorização.

Uma das grandes vantagens do CLO é a resposta mais prolongada em relação a outros esteroides tópicos (OLSEN; CORNELL, 1986). Estudos demonstram que, após 24 semanas de tratamento com creme de CLO a 0,05%, houve redução significativa da área com perda de cabelo (96,5%) em comparação ao uso de hidrocortisona a 1,0% (LENANE et al., 2014).

O CLO também apresenta resposta rápida no tratamento de algumas patologias, como a diminuição dos sintomas em 75% dos pacientes com psoríase do couro cabeludo, tratados com loção de CLO 0,05%, aplicado duas vezes diariamente, após apenas uma semana de uso do produto (RAJABI-ESTARABADI et al., 2018).

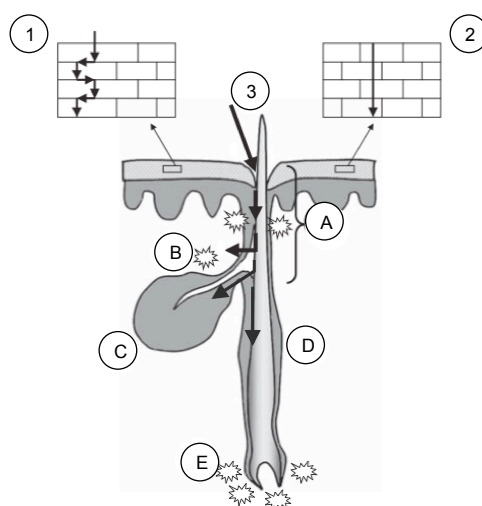
No entanto, mesmo apesar das aplicações serem tópicas, efeitos adversos são frequentemente relatados, como prurido, foliculite e telangiectasia (UCAK et al., 2012; LENANE et al., 2014; PEREIRA et al., 2018; STRAZZULLA et al., 2018). Além disso, estudos sugerem que a possibilidade de absorção sistêmica do clobetasol pode contribuir para que a terapia seja associada a eventos adversos mais severos, como hipertensão, diabetes e síndrome de Cushing, principalmente em patologias como alopecia areata, em que o tratamento se faz por uso contínuo do fármaco (CARRUTHERS; AUGUST; STAUGHTON, 1975; SCHÄCKE; DÖCKE; ASADULLAH, 2002; HENGGE et al., 2006; LENANE et al., 2014; PEREIRA et al., 2018). Isso pode ocorrer especialmente em tratamentos no couro cabeludo, uma vez que essa é uma área amplamente vascularizada (LANGASCO et al., 2018). Outra insatisfação dos pacientes diz respeito às formulações usadas, pois cremes, pomadas e géis são de difícil aplicação no couro cabeludo, além de interferirem na estética dos cabelos (FELDMAN, 2005; SENYIGIT; OZER, 2012).

Assim, a possibilidade de desenvolvimento de uma formulação com o potencial de direcionar a liberação do fármaco diretamente ao FP mostra-se mais vantajosa em relação à administração oral de corticosteroides ou à sua aplicação tópica tradicional, podendo levar à diminuição dos efeitos adversos, além da possibilidade de redução da dose. Adicionalmente, é necessário que a formulação não apenas direcione o acúmulo de fármaco no FP, mas que o faça de forma sustentada, de modo que o intervalo de administrações possa ser prolongado, resultando em aplicações menos frequentes e maior adesão dos pacientes.

### **2.3 Vias de administração epidérmica e folicular**

Devido à sua ampla superfície, a pele representa uma via de administração atrativa, por ser menos invasiva e mais conveniente que as vias oral e parenteral. Embora sua função mais importante seja a proteção do organismo ao ambiente externo, ela não funciona como

barreira totalmente impermeável. Quando formulações tópicas são aplicadas, a depender de suas características físico-químicas, elas podem permanecer sobre a pele ou atravessar o EC. Atualmente, três vias de penetração são propostas (Figura 2.4): 1) a via intercelular, através das camadas de lipídios que cercam os corneócitos, 2) a via transcelular e 3) a via de penetração através de apêndices cutâneos e (PATZELT; LADEMANN, 2013).



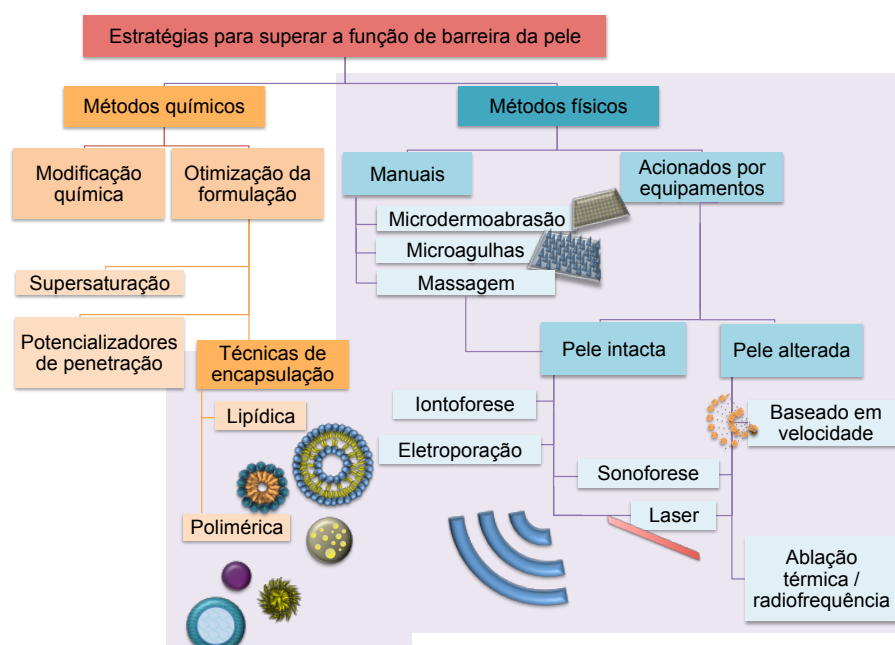
**Figura 2.4** Representação esquemática das possíveis vias de penetração cutânea: (1) via de penetração intercelular, em torno dos corneócitos, (2) via de penetração intracelular através dos corneócitos, (3) via de penetração folicular. Morfologia do folículo piloso: (A) região do infundíbulo, (B) antígenos próximos ao infundíbulo, (C) glândula sebácea, (D) segmento intermediário (istmo), (E) antígenos ao redor do bulbo. Adaptada de: Patzelt & Lademann, 2013. Reproduzida mediante autorização.

Em diferentes regiões do corpo, os FP estão distribuídos de maneiras distintas. No antebraço, por exemplo, correspondem a cerca de 0,1% da área de superfície da pele, com densidade histológica de cerca de 18 FP/cm<sup>2</sup>. Por outro lado, essas invaginações representam mais de 10% da área total da cabeça, com densidade de até 615 FP/cm<sup>2</sup> (BARTH, 1987; OTBERG et al., 2004). Estudos de permeação cutânea *in vitro* realizados com o bloqueio de FP demonstram a importância dessa via de penetração, fazendo com que possam servir como a principal via para fármacos aplicados topicamente (MEIDAN; BONNER; MICHNIAK, 2005; KNORR et al., 2009; LADEMANN et al., 2015; SANTOS et al., 2018). Adicionalmente, é importante ressaltar que o FP pode atuar como um reservatório do fármaco, o qual é liberado gradativamente do seu interior (BLUME-PEYTAVI et al., 2010).

A depender de características do fármaco e da formulação, o transporte pode ser realizado pelo FP ou para o FP. Desse modo, esforços têm sido direcionados para o

desenvolvimento de formulações que permitam a penetração e armazenamento seletivos no próprio sítio-alvo terapêutico. Nesse contexto, a utilização da via folicular pode ser modulada através da aplicação de certas abordagens e entre elas está a utilização de nano e microssistemas (MEIDAN; BONNER; MICHNIAK, 2005; BLUME-PEYTAVI; VOGT, 2011; LADEMANN et al., 2015; NAFISI; MAIBACH, 2018).

## 2.4 Abordagens para aprimoramento da penetração de fármacos na pele



**Figura 2.5** Principais estratégias utilizadas para o aprimoramento da permeação tópica e transdérmica de fármacos. Adaptado de: Borgheti-Cardoso et al., 2016. Reproduzido mediante autorização.

Estratégias inovadoras para a administração tópica e transdérmica de fármacos podem ser basicamente divididas em dois tipos: métodos químicos e métodos físicos (Figura 2.5).

No âmbito do primeiro tipo, a modificação de formulações por uso de potencializadores de penetração foi utilizada extensivamente nas últimas décadas. Contudo, devido a efeitos tóxicos, sensibilização, comprometimento da integridade da pele e baixa efetividade em alguns casos, outras alternativas têm sido buscadas (JOHN; LAUDAHN, 1967; LASHMAR; HADGRAFT; THOMAS, 1989; FINNIN; MORGAN, 1999; SINHA; PAL KAUR, 2000). Assim, o uso de nano e microssistemas biocompatíveis tem revolucionado o tratamento dermatológico por aumentar a penetração do fármaco, ao mesmo

tempo em que promove liberação controlada e prolongada, além de atuarem como reservatório, diminuindo a necessidade de aplicações repetidas (NAAHIDI et al., 2013; ABDEL-MOTTALEB et al., 2014; NAFISI; MAIBACH, 2018).

Já no âmbito dos métodos físicos, as tecnologias vêm avançando com o emprego de materiais mais seguros e dispositivos portáteis e fáceis de usar (MERINO; KALIA; GUY, 2003; LADEMANN et al., 2007; GRATIERI et al., 2010; LOPEZ et al., 2011; POLAT et al., 2011; PROW et al., 2011; TRAUER et al., 2014; SHAHZAD et al., 2015; BAROLET; CHRISTIAENS; HAMBLIN, 2016; LEITE-SILVA et al., 2016; PORTANTIOLO LETTNIN et al., 2016; CANAVESE et al., 2018).

#### **2.4.1 Nano/Microsistemas de aplicação tópica**

Nanopartículas são estruturas com dimensão em nanoescala. Muito embora alguns autores limitem o uso do termo para partículas entre 1 e 100 nm, este termo vem sendo empregado para quaisquer partículas de até 500 nm ou mesmo até 1000 nm, quando passam a ser classificadas como micropartículas (SINGH et al., 2010; NAFISI; MAIBACH, 2018).

Em preparações farmacêuticas, o uso de nano/microsistemas para encapsular substâncias pode agregar à formulação características importantes, como aumento de estabilidade (MANOSROI et al., 2008a, 2008b), mascaramento de características organolépticas indesejadas (DINGLER et al., 1999) e liberação prolongada de substâncias ativas (CEVC; VIERL, 2010). Além disso, as propriedades físico-químicas das partículas (ex.: tamanho, carga superficial, forma e hidrofília) podem ser projetadas de modo a aumentar a liberação da substância ativa no sítio-alvo (RYMAN-RASMUSSEN; RIVIERE; MONTEIRO-RIVIERE, 2006; SONAVANE et al., 2008; LOPEZ et al., 2011; KIM et al., 2013; NAFISI; MAIBACH, 2018).

Micro e nanopartículas podem ter origem polimérica ou lipídica. Entre os de origem lipídica, as nanopartículas lipídicas sólidas (NLS) e os carreadores lipídicos nanoestruturados (CLN) compreendem os sistemas mais explorados para administração dérmica de medicamentos e cosméticos, e essa tecnologia já vem sendo encontrada em produtos comerciais há alguns anos (PARDEIKE; HOMMOSS; MÜLLER, 2009; BELOQUI et al., 2016). Eles são biocompatíveis e apresentam menor toxicidade em relação a sistemas poliméricos (NAFISI; MAIBACH, 2018). As NLS são partículas matriciais compostas de lipídios sólidos e tensoativos dispersos em meio aquoso. Embora apresentem as vantagens citadas anteriormente, possuem algumas limitações, como expulsão do fármaco e agregação

de partículas durante armazenamento. Para superar esses obstáculos, foram desenvolvidos os CLN, a partir da incorporação de lipídios líquidos na matriz sólida da partícula. Além de aumentar a capacidade de carga de fármaco, os CLN demonstraram outras vantagens: maior estabilidade físico-química e melhor perfil de liberação dos componentes ativos (PARDEIKE; HOMMOSS; MÜLLER, 2009; BELOQUI et al., 2016; PEREIRA et al., 2018; SOLEIMANIAN et al., 2018b).

A pesquisa sobre a utilização de nano/micropartículas para a veiculação de fármacos no tratamento de afecções cutâneas que envolvem os FP tem se intensificado consideravelmente nos últimos anos (MEIDAN; BONNER; MICHNIAK, 2005; KIM; RUTKA; CHAN, 2010; GELFUSO et al., 2011; DELOUISE, 2012; VOGT; BLUME-PEYTAVI, 2014; BELOQUI et al., 2016; LADEMANN et al., 2016; KANDEKAR et al., 2018; PEREIRA et al., 2018). Estudos indicam que, com variação no tamanho de partícula, diferentes locais dentro do FP podem ser seletivamente alcançados. Nesse sentido, nanopartículas parecem alcançar maior penetração e retenção no FP em relação a micropartículas (PATZELT et al., 2011; PATZELT; LADEMANN, 2013). Adicionalmente, o FP pode servir como compartimento de armazenamento das partículas, o que permite uma exposição prolongada do sítio-alvo ao fármaco, além de atuar também como reservatório para liberação sustentada (OSSADNIK et al., 2006; PATZELT; LADEMANN, 2013; VOGT; BLUME-PEYTAVI, 2014).

A literatura reporta alguns estudos de nano/microsistemas de CLO para penetração transdérmica de fármacos, visando ao tratamento de desordens cutâneas tais como psoríase e dermatites (HU et al., 2002; SCHÄFER-KORTING; MEHNERT; KORTING, 2007; LACARRUBBA et al., 2009; FONTANA; BASTOS; BECK, 2010; SENYIĞIT et al., 2010; LINGAN et al., 2011; SILVA et al., 2012; ALI et al., 2013; PATEL et al., 2013; ROTHER, 2013; NAGAICH; GULATI, 2016). Recentemente, um grupo de pesquisa desenvolveu nanopartículas poliméricas de CLO e avaliou sua penetração através do FP (MATHES et al., 2016). Contudo, há uma carência de mais relatos no desenvolvimento de diferentes sistemas contendo CLO com características específicas para retenção folicular.

#### **2.4.2 Métodos físicos para aumento da penetração cutânea de fármacos**

Outra abordagem para melhorar a penetração de fármacos na pele é a utilização de métodos físicos. A literatura reporta o uso de diferentes mecanismos para aumentar a penetração de substâncias contidas em micro e nanopartículas através da pele. Alguns desses

métodos são microagulhas, microdermoabrasão, iontoforese, eletroporação, bombardeamento de micropartículas, sonoforese, radiofrequência e laser (BORGHETI-CARDOSO et al., 2016).

O mecanismo associado à maioria dos métodos físicos está relacionado a mudanças estruturais cutâneas, de modo a permitir que até mesmo partículas penetrem através da pele (BARUA; MITRAGOTRI, 2014). Dentre as técnicas que podem alterar temporariamente a pele, mas mantêm a sua integridade, destacam-se o uso de IV, US e aplicação de massagem.

O uso de calor para aumentar a penetração cutânea começou a ser reportado experimentalmente na década de 60 (FRITSCH; STOUGHTON, 1963). Desde então, a modulação de temperatura tem sido usada para alterar a permeabilidade da barreira cutânea. As fontes de calor variam entre sauna, água quente, adesivos elétricos e dispositivos emissores de irradiação (SHAHZAD et al., 2015). A radiação IV (760 nm–1 mm) é uma das radiações eletromagnéticas emitidas pelo sol, juntamente com a radiação ultravioleta (200–400 nm) e a luz visível (400–760 nm). A IV pode ser classificada em três bandas: IV-A (760–1400 nm), IV-B (1400–3000 nm) e IV-C (3000 nm–1mm). Ela representa cerca de 54% da luz solar e pode atingir diferentes profundidades através da pele, com a IV-A alcançando o tecido subcutâneo e a IV-C as camadas mais superficiais (PORTANTIOLO LETTNIN et al., 2016). Por esse motivo, fontes artificiais de IV vêm sendo utilizadas na terapêutica, tanto isoladamente quanto em conjunto com a administração tópica de fármacos (DOVER; PHILLIPS; ARNDT, 1989; TZUNG et al., 2009; BAROLET; CHRISTIAENS; HAMBLIN, 2016; TSAI; HAMBLIN, 2017).

US é uma forma de energia mecânica definida como uma onda longitudinal em uma frequência acima da capacidade humana de audição ( $\geq 20$  kHz). Essa onda é capaz de mover partículas através do meio em que se propaga. A utilização de US na terapêutica é conhecida como sonoforese ou fonoforese e classifica o US em baixa frequência (20–100 kHz) ou alta frequência (0,7–16 MHz). A faixa intermediária ainda não apresenta estudos substanciais para aplicação terapêutica (MERINO; KALIA; GUY, 2003; POLAT et al., 2011). O uso do US para administração tópica de fármacos tem demonstrado melhora na penetração não só de substâncias ativas, como também de micro e nanopartículas (EL-KAMEL; AL-FAGIH; ALSARRA, 2008; DAHLAN; ALPAR; MURDAN, 2009; GOU et al., 2009; LOPEZ et al., 2011; CANAVESE et al., 2018).

Por fim, a massagem é um movimento mecânico de aplicação tópica de formulações que estimula a absorção cutânea de substâncias isoladas ou carregadas em partículas. Ela pode ser realizada manualmente ou utilizando-se dispositivos específicos e está relacionada a um aumento de temperatura na área aplicada, bem como a um favorecimento de penetração de



substâncias através do EC e dos apêndices cutâneos (LADEMANN et al., 2007; GRATIERI et al., 2010; PROW et al., 2011; TRAUER et al., 2014; LEITE-SILVA et al., 2016).

## 3 OBJETIVOS

### 3.1 Objetivo geral

O objetivo deste trabalho foi produzir uma formulação contendo CLO, que propicie o acúmulo do fármaco no FP, e avaliar a aplicação de métodos físicos, a fim de aumentar a eficácia do tratamento tópico de patologias associadas aos pelos, couro cabeludo e outras condições inflamatórias da pele.

### 3.2. Objetivos específicos

- Desenvolver e validar um método analítico capaz de quantificar o CLO extraído dos FP após experimentos de permeação cutânea *in vitro*;
- Produzir um nanossistemas lipídico nanoestruturado contendo CLO, com características adequadas para retenção nos FP;
- Caracterizar os nanossistemas e estudar sua estabilidade;
- Avaliar a permeação cutânea *in vitro* do CLO a partir da formulação produzida;
- Avaliar o efeito dos métodos físicos de irradiação IV, US com ou sem vibração mecânica e massagem manual aplicados ao sistema de nanopartículas em estudo.

## 4 SEÇÃO EXPERIMENTAL

Com base nos objetivos, a seção experimental da tese foi organizada em três capítulos:

- Capítulo 4.1: Desenvolvimento e validação de método analítico para quantificação do propionato de clobetasol em folículos pilosos e diferentes camadas da pele;
- Capítulo 4.2: Produção de carreadores lipídicos nanoestruturados e avaliação da retenção de propionato de clobetasol no folículo piloso;
- Capítulo 4.3: Aplicação de métodos físicos a nanossistema contendo propionato de clobetasol.

## 4.1 DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODO ANALÍTICO PARA QUANTIFICAÇÃO DO PROPIONATO DE CLOBETASOL EM FOLÍCULOS PILOSOS E DIFERENTES CAMADAS DA PELE

Trechos deste capítulo foram publicados em:

**ANGELO, T.;** CUNHA-FILHO, M. S. S.; GELFUSO, G. M.; GRATIERI, T. Chromatographic method for clobetasol propionate determination in hair follicles and in different skin layers. **Biomedical Chromatography**, v. 31, n. e3804, p. 1-7, 2017.

A reprodução nesta tese foi autorizada por meio da licença *Copyright* de número 4330980180862.

### 4.1.1 Introdução

O desenvolvimento de formulações tópicas visando à retenção folicular do fármaco requer a utilização de um método analítico adequado para a sua quantificação seletiva nos FP e camadas da pele, após experimentos de permeação cutânea *in vitro*.

Algumas metodologias para análise do CLO por HPLC (Cromatografia Líquida de Alta Eficiência, do inglês: *High Performance Liquid Chromatography*) são encontradas na Farmacopeia dos Estados Unidos e outras referências científicas (FONTANA; BASTOS; BECK, 2010; BADILLI et al., 2012; USP, 2014). No entanto, em estudos de permeação cutânea, a extração do fármaco retido na pele, uma matriz complexa, origina uma amostra com muitos interferentes que podem eluir simultaneamente com o analito, comprometendo a análise. Mesmo um método capaz de determinar seletivamente o CLO na matriz da epiderme ou derme (SILVA et al., 2012) não se mostrou capaz de separar o pico do fármaco dos interferentes do FP. De fato, o único método encontrado na literatura para a quantificação de CLO extraído do FP, após realização de *tape-stripping* diferencial, utiliza Cromatografia Líquida acoplada à Espectrometria de Massas (MATHES et al., 2016), que requer um equipamento caro e nem sempre acessível. Assim, o objetivo do estudo deste capítulo foi desenvolver e validar um método analítico simples, rápido, preciso e específico para a determinação do CLO em FP e outras camadas da pele, a fim de ser utilizado no desenvolvimento e análise de formulações tópicas para retenção folicular de CLO.

#### **4.1.2 Material**

O CLO foi adquirido da Sigma-Aldrich (Steinheim, Alemanha). Os solventes com grau cromatográfico foram obtidos da Tedia Brazil (Rio de Janeiro, Brasil) ou VWR Chemicals (Radnor, Estados Unidos da América). A água utilizada nas análises foi purificada por sistema MilliQ (Millipore, Illkirch-Graffenstaden, França). Para o processo de *tape stripping* diferencial, foi utilizada a fita a Scotch Book Tape No. 845 (3M, St. Paul, Estados Unidos da América) e a cola de cianoacrilato Super Bonder, Loctite-Henkel (Dublin, Irlanda).

A pele foi retirada de orelhas de porco, gentilmente doadas por um abatedouro local, imediatamente após o abate do animal e antes da sua escalda (Bonasa, Brasília, Brasil ou Färber, Zweibrücken, Alemanha).

#### **4.1.3 Métodos**

##### **4.1.3.1 Preparo das soluções de CLO**

Soluções estoque de CLO (200 µg/mL) foram preparadas a partir de 5 mg do fármaco em 25 mL de metanol. As soluções de trabalho foram obtidas posteriormente, por diluição das soluções estoque.

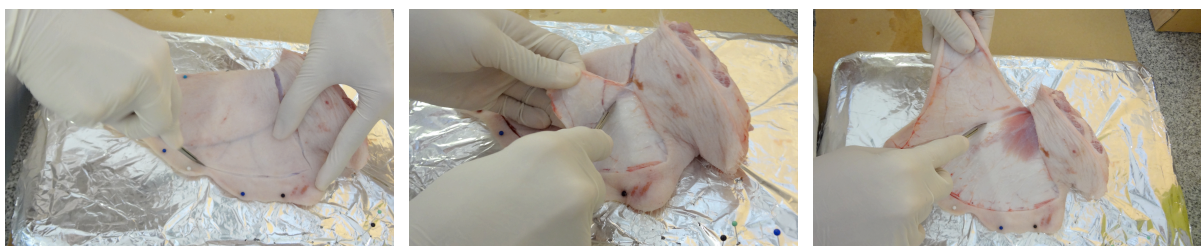
##### **4.1.3.2 Determinação do comprimento de onda de absorção máxima do CLO**

Para a determinação do comprimento de onda de absorção máxima para o fármaco, o CLO foi solubilizado em metanol, na concentração 0,5 µg/mL. Em seguida, foi realizada uma varredura dessa solução em um espectrofotômetro de UV/Vis (Ultravioleta/Visível) (Shimadzu, UV 1800), utilizando-se cubetas de quartzo de 1,00 cm de caminho óptico. O comprimento de onda de máxima absorção no UV/Vis foi selecionado para análise do CLO por HPLC-UV.

##### **4.1.3.3 Tratamento da orelha de porco**

Entre a coleta e o preparo das amostras, as orelhas de porco foram armazenadas a 4°C para transporte até o laboratório. Após limpeza com água corrente fria, as orelhas foram secas com papel-toalha e fixadas com alfinetes sobre uma placa de isopor recoberta por papel

laminado. Com o auxílio de bisturi, a pele foi separada da cartilagem (Figura 4.1.1). A camada adiposa e os vasos sanguíneos foram removidos e os pelos foram aparados com uma tesoura. Amostras de pele com lesões foram descartadas e as peles visivelmente íntegras foram envoltas em papel laminado e congeladas a  $-20^{\circ}\text{C}$  por um período máximo de três meses antes do seu uso.



**Figura 4.1.1** Obtenção da pele de orelha de porco para estudos de permeação cutânea *in vitro*.

#### 4.1.3.4 Preparo das amostras de pele

##### 4.1.3.4.1 Técnica de remoção diferencial

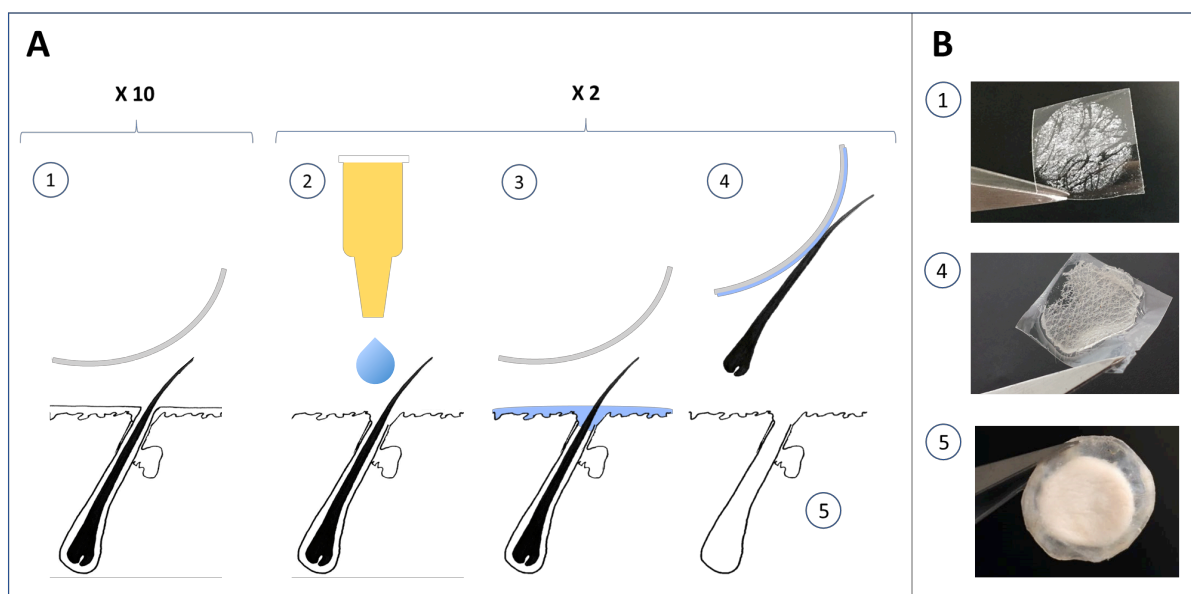
Uma lâmina de vidro foi utilizada como suporte para a pele. Entre a lâmina e a pele foi disposto um pedaço de papel de filtro embebido com tampão HEPES pH 7,4, para evitar o ressecamento cutâneo durante o procedimento. A área da pele a ser utilizada foi delimitada por uma fita adesiva laminada previamente cortada, com um círculo de 15 mm de diâmetro (Figura 4.1.2).



**Figura 4.1.2** Pele de porco disposta sobre papel de filtro embebido com tampão HEPES pH 7,4. A área da pele foi delimitada por fita adesiva laminada com círculo de 15 mm de diâmetro.

A técnica de *tape-stripping*, ou remoção diferencial, primeiramente descrita na década de 70 (FRITSCH et al., 1979) e amplamente utilizada em experimentos de investigação de FP (PATZELT; LADEMANN, 2013), foi realizada a fim de separar as camadas da pele (

Figura 4.1.3).



**Figura 4.1.3** Esquema representativo (A) e fotografias (B) do método de remoção diferencial. Dez fitas adesivas são utilizadas para remover o estrato córneo (1). Em seguida, o conteúdo do folículo piloso é removido com auxílio de cola de cianoacrilato com duas fitas adesivas (2-4). Por fim, a pele remanescente é obtida, após as bordas da área delimitada serem cortadas (5).

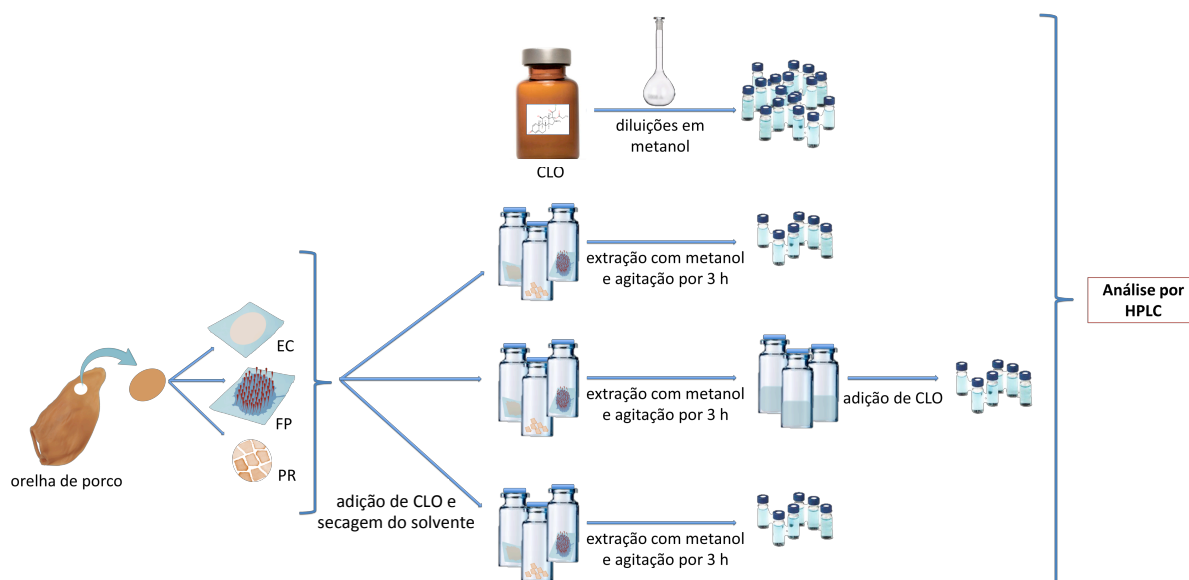
O EC foi removido com o auxílio de 10 fitas adesivas, com movimento rápido e com mudança de direção, a cada nova fita usada (1). Em seguida, para determinar o conteúdo acumulado no FP, uma gota de cianoacrilato foi aplicada sobre a superfície da pele e do infundíbulo folicular (2). Uma fita foi colocada sobre a cola e pressionada levemente, até sua secagem (3). Após polimerização do cianoacrilato, a fita foi retirada, removendo o pelo e o conteúdo do FP (4). Este processo foi repetido, totalizando 2 fitas para coleta do FP. Em seguida, a pele foi retirada do suporte (5) e as bordas externas à área delimitada foram cortadas, obtendo-se, assim, a PR.

#### 4.1.3.4.2 Preparo de extratos de pele

Após remoção diferencial das camadas da pele, as fitas com o EC, as fitas com o FP e a PR foram dispostas em frascos de vidro individuais fechados, contendo 5 mL de metanol.

Para determinar o melhor método de extração do CLO, foram realizados, separadamente, três testes diferentes: ultrassom (10 minutos), agitação por vórtex (3 ciclos de 2 minutos) ou agitação magnética (300 rpm, durante 3 h). O solvente foi, em seguida, filtrado

através de uma membrana hidrofóbica de PTFE com poro de diâmetro 0,22  $\mu\text{m}$ , produzindo as amostras de extrato de pele. Variações dos extratos de pele contendo CLO também foram produzidas para a etapa de validação do método analítico (Figura 4.1.4).



**Figura 4.1.4** Esquema representativo do preparo de amostras de propionato de clobetasol e extrato de pele para análise por HPLC.

#### 4.1.3.5 Desenvolvimento do método analítico

O fármaco foi quantificado com o auxílio de um equipamento de HPLC, modelo Shimadzu LC 20-AD, composto por duas bombas (LC 20-AT), um injetor automático (9SIL-20AD) e um forno (CTO-20AS), acoplados a um detector espectrofotométrico (SPD-M20A) e a um computador equipado com o programa de análise cromatográfica Shimadzu LC. Foi utilizada uma coluna de fase reversa C18 (4,6 mm x 15 cm x 5  $\mu\text{m}$ ), temperatura do forno de 30°C e volume de injeção de 50  $\mu\text{L}$ . Diferentes fases móveis e vazões foram testadas até obtenção do método com melhor resolução do CLO (Tabela 4.1.2).

#### 4.1.3.6 Validação do método analítico

O método desenvolvido para a quantificação do CLO foi validado, avaliando-se os parâmetros analíticos de seletividade, linearidade, robustez, precisão, exatidão, limite de detecção e limite de quantificação (BRASIL, 2003; ICH, 2005).



#### 4.1.3.6.1 Seletividade

Para testar a seletividade do método para CLO em relação a compostos endógenos presentes na pele, uma solução do fármaco (7,5 µg/mL) foi avaliada na ausência e na presença de cada extrato de pele (Figura 4.1.4). Todos os ensaios foram realizados com seis fontes independentes de cada matriz. Os resultados foram analisados considerando-se a área e tempo de retenção (TR) do pico.

#### 4.1.3.6.2 Robustez

Para avaliar a robustez do método, foi realizado um desenho fatorial ( $2^3$ ). Foram estudados dois níveis, codificados em baixo (-1) e alto (+1), para as seguintes variáveis analíticas: temperatura do forno (T), porcentagem de água na fase móvel (W) e vazão da fase móvel (VFM), conforme indica a Tabela 4.1.1. Os níveis de variação foram aproximados em  $\pm 5\%$  em relação aos valores estabelecidos no método desenvolvido, quais sejam T de 30°C, W de 35%, e VFM de 1,2 mL/min. Todos os ensaios foram realizados em triplicata.

**Tabela 4.1.1** Desenho fatorial para avaliação de robustez do método desenvolvido para quantificação do propionato de clobetasol

Teste	Níveis codificados			Níveis decodificados		
	T	W	VFM	T (°C)	W (%)	VFM (mL/min)
1	-1	-1	-1	28	32	1,14
2	+1	-1	-1	32	32	1,14
3	-1	+1	-1	28	38	1,14
4	+1	+1	-1	32	38	1,14
5	-1	-1	+1	28	32	1,26
6	+1	-1	+1	32	32	1,26
7	-1	+1	+1	28	38	1,26
8	+1	+1	+1	32	38	1,26

T: temperatura do forno; W: porcentagem de água na fase móvel; VFM: vazão da fase móvel.

Uma equação preditiva foi proposta para cada resposta (área do pico e TR), utilizando-se análise de regressão múltipla. O modelo foi validado por análise de variância (ANOVA)

com um nível de significância de  $\alpha = 0,05$ . As análises estatísticas foram realizadas com o *software Design-Expert*, versão 9.

#### 4.1.3.6.3 Linearidade

Para verificar a linearidade do método analítico, foram preparadas soluções de CLO nas concentrações de 0,5; 1,0; 2,5; 5,0; 7,5; 10,0; 12,5 e 15,0  $\mu\text{g/mL}$ . Três curvas de calibração independentes foram injetadas e ajustadas por regressão linear, pelo método dos mínimos quadrados.

#### 4.1.3.6.4 Limites de detecção e quantificação

O limite de detecção (LD) teórico foi calculado a partir da divisão do desvio padrão dos coeficientes lineares das curvas de calibração dos ensaios de linearidade pela média dos coeficientes angulares das respectivas curvas multiplicada por 3,3, de acordo com a Equação I (BRASIL, 2003; ICH, 2005):

$$LD = \frac{3,3 \sigma}{S} \quad (\text{Equação I})$$

Onde:  $\sigma$  = Desvio Padrão dos coeficientes lineares  
S = Média dos coeficientes angulares

O limite de quantificação (LQ) teórico foi calculado de acordo com a Equação II (BRASIL, 2003; ICH, 2005):

$$LQ = \frac{10 \sigma}{S} \quad (\text{Equação II})$$

Onde:  $\sigma$  = Desvio Padrão dos coeficientes lineares.  
S = Média dos coeficientes angulares

Após o cálculo dos limites teóricos, soluções de CLO nas concentrações calculadas e em concentrações abaixo e acima dos LD e LQ calculados foram analisadas por HPLC.

#### 4.1.3.6.5 Precisão

A precisão foi determinada por meio da análise de repetibilidade (intracorrída), precisão intermediária (intercorrída) e reprodutibilidade (interlaboratorial).

A repetibilidade do método foi verificada com 3 determinações de três concentrações da curva de calibração (0,5; 7,5 e 15,0 µg/mL). A precisão intermediária foi avaliada em dois dias distintos, com amostras preparadas por analistas diferentes. Os ensaios de reprodutibilidade foram realizados no *Institut für Biopharmazie und Pharmazeutische Technologie*, da *Universität des Saarlandes*, Alemanha, utilizando-se um equipamento de HPLC-UV ThermoFisher Scientific Ultimate 3000, com sistema quaternário Dionex UVD 340.

Os resultados de precisão foram expressos matematicamente por meio do coeficiente de variação (CV), segundo a Equação III (BRASIL, 2003; ICH, 2005):

$$CV = \frac{DP}{média} \times 100 \quad (\text{Equação III})$$

Onde: CV = Coeficiente de Variação  
DP = Desvio Padrão

#### 4.1.3.6.6 Exatidão

A exatidão foi verificada pela relação entre a concentração média determinada experimentalmente e a concentração teórica correspondente.

Os resultados de exatidão foram expressos matematicamente aplicando-se a Equação IV (BRASIL, 2003; ICH, 2005):

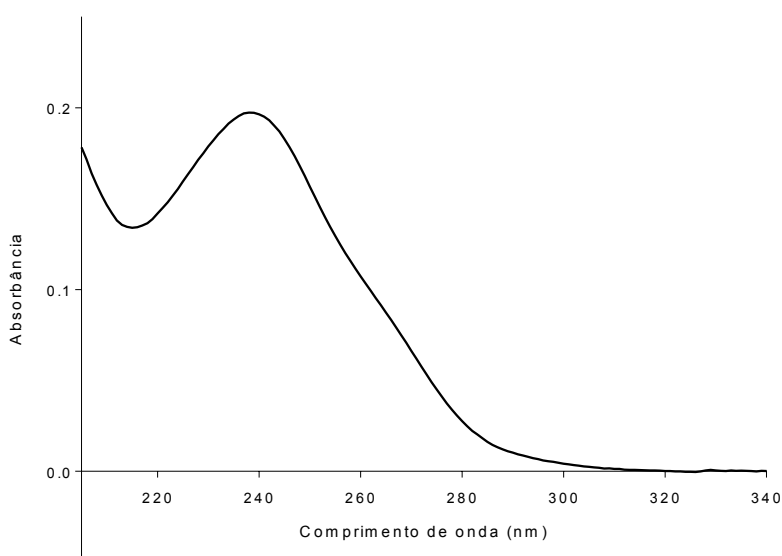
$$\text{Exatidão} = \frac{\text{valor mensurado}}{\text{valor teórico}} \times 100 \quad (\text{Equação IV})$$

Estudos de recuperação do CLO foram realizados em relação ao EC, FP e PR obtidos pelo método de remoção diferencial. Para tanto, as fitas com EC, FP e a PF foram dopadas com uma solução do fármaco correspondente a três concentrações finais (0,5; 7,5 e 12,5 µg/mL). Após evaporação do solvente, o EC, FP e PF foram levados a extração com 5 mL de metanol. O conteúdo dos frascos foi filtrado e o CLO recuperado foi quantificado. Esse experimento foi realizado em triplicata para cada concentração analisada em cada um dos extratos de pele (Figura 4.1.4).

#### 4.1.4 Resultados e discussão

##### 4.1.4.1 Determinação do comprimento de onda de absorção máxima do CLO

A varredura espectrofotométrica da solução metanólica de CLO apresentou absorção máxima no comprimento de onda 240 nm (Figura 4.1.5) – resultado que está de acordo com a monografia descrita pela USP 37-NF 32 (USP, 2014). Este comprimento de onda foi aplicado para a análise em equipamento de HPLC.



**Figura 4.1.5** Representação do espectro de absorção da solução de propionato de clobetasol em metanol na concentração 0,5 µg/mL

##### 4.1.4.2 Desenvolvimento do método analítico

Diferentes estudos fornecem metodologias de HPLC-UV para quantificação do CLO (FONTANA; BASTOS; BECK, 2010; BADILLI et al., 2012; SILVA et al., 2012; USP, 2014). No entanto, nenhum dos métodos se mostrou seletivo para o CLO após extração do fármaco a partir da pele, uma vez que a matriz biológica produz extratos complexos com muitos interferentes que podem eluir no mesmo TR do fármaco, comprometendo a análise. Desse modo, buscou-se desenvolver uma nova metodologia para quantificar o CLO após experimentos *in vitro* de permeação na pele, e, mais especificamente, o fármaco retido no FP.

Durante o desenvolvimento, a solução de CLO (7,5 µg/mL) e os extratos de SC, FP e PR foram injetados para cada uma das metodologias testadas. Em seguida, os cromatogramas e seus parâmetros foram analisados (Tabela 4.1.2).

**Tabela 4.1.2** Variações nas condições analíticas para desenvolvimento de metodologia para quantificar propionato de clobetasol retido no folículo piloso e nas camadas da pele após experimentos de permeação cutânea *in vitro*

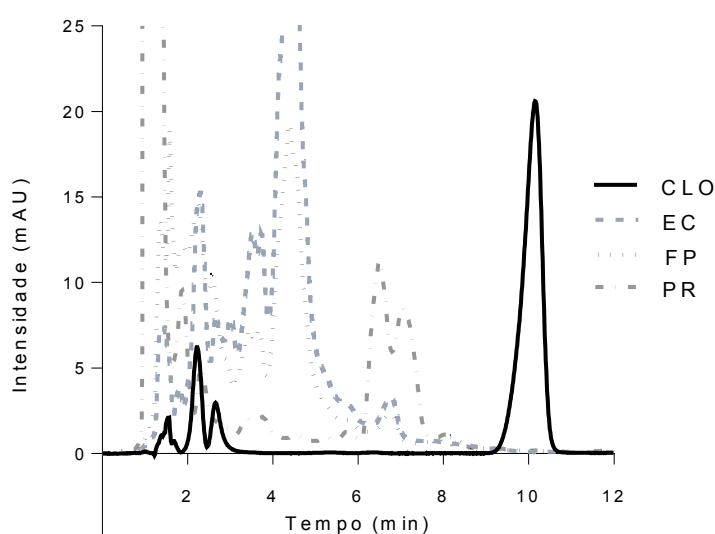
Teste	Fase móvel (v/v)	Vazão (mL/min)	Tempo de retenção (min)	Pratos teóricos	Fator de cauda	Resultado
1	Metanol: água (80:20)	1,0	4,207	1955	0,981	Picos sobrepostos
2	Metanol: água (70:30)	1,0	11,237	1086	0,765	Picos sobrepostos
3	Metanol: água (60:40)	1,0	18,634	777	0,727	Picos sobrepostos
4	Metanol: água (50:50)	1,0	27,820	342	0,867	Picos sobrepostos
5	Acetonitrila: água (70:30)	1,0	4,843	1955	0,981	Picos sobrepostos
6	Acetonitrila: água (65:35)	1,0	5,256	2299	0,915	Picos sobrepostos
7	Acetonitrila: água (60:40)	1,0	7,006	2587	0,859	Picos sobrepostos
8	Metanol: acetonitrila: água (50:20:30)	1,0	7,732	958	0,857	Picos sobrepostos
9	Metanol: acetonitrila: água (50:15:35)	1,0	12,518	1318	0,852	Baixa eficiência
<b>10</b>	<b>Metanol: acetonitrila: água (50:15:35)</b>	<b>1,2</b>	<b>10,148</b>	<b>2413</b>	<b>0,889</b>	<b>Método adequado</b>

Como esperado, diferentes misturas na fase móvel, apresentaram diferentes TR para o CLO, devido à interação entre o analito e o sistema de solventes (MCNAIR; POLITE, 2007). Uma vez que o critério mais importante para o método proposto é a resolução do CLO, foram realizados ajustes, com o propósito de isolar a eluição do pico do CLO dos interferentes provenientes da pele (Tabela 4.1.2). A resolução satisfatória não foi alcançada pelos primeiros 8 métodos testados, nos quais foram observadas sobreposições dos picos de CLO e matrizes biológicas no mesmo TR. Portanto, nenhum desses métodos se mostrou adequado para a aplicação proposta.

No teste número 9, houve separação completa do pico de CLO do pico das matrizes. No entanto, o método apresentou baixa eficiência, com número de pratos teóricos abaixo do valor recomendado de 2000 (FDA, 1994; SHABIR, 2003). Uma vez que a eficiência pode ser afetada por parâmetros como posição do pico, temperatura da coluna e vazão da fase móvel (FDA, 1994), o método número 10 foi testado. Neste método, a vazão foi modificada resultando em eficiência adequada. A resolução entre o pico do CLO e o pico de interferente mais próximo foi de 2,424, estando de acordo com o valor >2,0 preconizado (FDA, 1994). Por fim, uma vez que a quantificação do pico no cromatograma é dependente da sua integração, o formato do pico é importante, já que fatores de cauda elevados dificultam a

determinação da largura do pico. Em todos os métodos testados, a simetria do pico de CLO foi adequada, com fator de cauda próximo a 1,0, o que está de acordo com o valor preconizado de  $\leq 2.0$  (FDA, 1994).

Como resultado, a metodologia final consiste em utilizar coluna C18 de fase reversa (4,6 mm x 15 cm x 5  $\mu$ m), fase móvel composta por metanol: acetonitrila: água (50:15:35, v/v), em uma vazão de 1,2 mL/min, com temperatura de forno de 30°C, volume de injeção de 50  $\mu$ L e detecção a 240 nm. Esse método possibilitou uma corrida de 12 minutos, com TR do CLO em 10,1 minutos (Figura 4.1.6).



**Figura 4.1.6** Sobreposição de cromatogramas representativos de CLO: propionato de clobetasol, EC: estrato córneo, FP: folículo piloso e PR: pele remanescente. Método de HPLC-UV: coluna RP-C18 (4.6 mm x 15 cm x, 5  $\mu$ m), fase móvel composta por metanol: acetonitrila: água (50:15:35, v/v), vazão de 1,2 mL/min, temperatura de 30 °C, volume de injeção de 50  $\mu$ L e detecção a 240 nm.

#### 4.1.4.3 Validação do método analítico

Para se assegurar que um método seja coerente, verificações necessitam ser realizadas sob as condições nas quais ele deve ser aplicado. Essas verificações são coletivamente conhecidas como validação. O termo validação surgiu em meados de 1970, proposto por Ted Byers e Bud Loftus e foi inicialmente aplicado a produtos parenterais. Posteriormente o termo foi expandido e passou a designar também métodos de avaliação de confiabilidade (SCYPINSKI et al., 2002).

A NBR ISO/IEC 17025:2001 define que: “[...] métodos não normalizados, métodos criados/desenvolvidos pelo próprio laboratório, métodos normalizados usados fora dos escopos para os quais foram concebidos, ampliações e modificações de métodos normalizados devem ser validados”. Uma vez que o método proposto foi desenvolvido no laboratório, foi necessária sua validação de acordo com os parâmetros preconizados, quais sejam: seletividade, robustez, linearidade, precisão, exatidão, limites de detecção e quantificação (BRASIL, 2003; ICH, 2005).

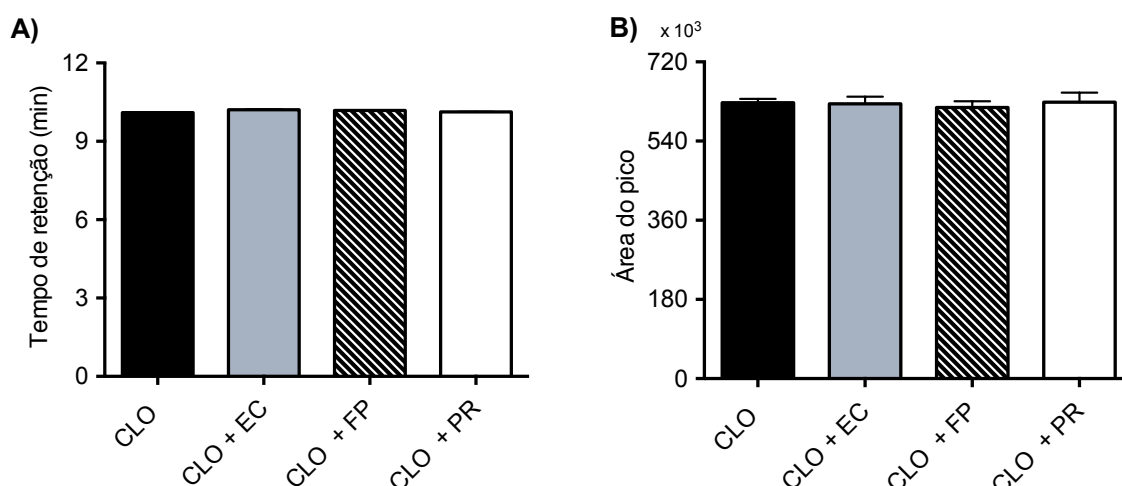
#### **4.1.4.3.1 Seletividade**

Seletividade é a capacidade que o método possui de medir exatamente um composto em presença de outros componentes, tais como impurezas, produtos de degradação e componentes da matriz. A seletividade de um método se refere à extensão até a qual ele pode determinar analito(s) específico(s) numa mistura complexa, sem interferência dos outros componentes na mistura (BRASIL, 2003; ICH, 2005).

Para verificar a seletividade do método, foram testados diferentes métodos de extração do CLO a partir das camadas da pele. Os extratos produzidos forneceram diferentes perfis cromatográficos, na utilização de ultrassom, agitador vórtex ou agitação magnética. Os dois primeiros testes apresentaram cromatogramas com excessivos picos de interferentes, além de apresentar picos de CLO com menor área, quando comparados com o método de agitação magnética. Os resultados sugerem que nos dois primeiros testes houve reações entre o fármaco e outros componentes ou degradação do fármaco. Por esse motivo, a agitação magnética por 3 horas foi o método de extração escolhido para obter extratos do CLO retido em diferentes camadas da pele.

Os cromatogramas apresentados na Figura 4.1.6 demonstram que, após extração, todos os contaminantes da pele eluíram em TR diferentes do TR do CLO.

Adicionalmente, a Figura 4.1.7 demonstra que os componentes da pele não alteraram o TR do fármaco. Do mesmo modo, a área do pico do CLO não foi afetada pela presença das matrizes biológicas. Assim, o método cromatográfico se provou seletivo para quantificar o analito na presença dos interferentes.



**Figura 4.1.7** Seletividade do método para quantificação do propionato de clobetasol (CLO). Quantificação do CLO (7,5 µg/mL) isolado e adicionado aos extratos de pele. Análises em termos de A) tempo de retenção e B) área do pico de CLO. n = 6. EC: estrato córneo, FP: folículo piloso, PR: pele remanescente.

#### 4.1.4.3.2 Robustez

A fim de simular variações operacionais mínimas que podem ocorrer normalmente em análises de rotina, foram estudados os parâmetros de T, W e VFM, em um desenho fatorial (2<sup>3</sup>). A resposta foi avaliada em termos de área de pico e TR do CLO.

**Tabela 4.1.3** Resumo estatístico das respostas do desenho experimental (2<sup>3</sup>) para análise de robustez do método de quantificação do propionato de clobetasol (CLO)

Análise fatorial	Área do pico de CLO	Tempo de retenção do pico de CLO
VFM	< 0,0001*	< 0,0001*
T	0,9960	< 0,0001*
W	0,2209	< 0,0001*
valor de <i>p</i> dos termos		
VFM·T	0,1628	0,4857
VFM·W	0,0785	< 0,0001*
T·W	0,4022	< 0,0001*
VFMT·W	0,0235*	0,3674
valor de <i>p</i> do modelo	< 0,0001*	< 0,0001*
R <sup>2</sup>	0,9440	0,9978

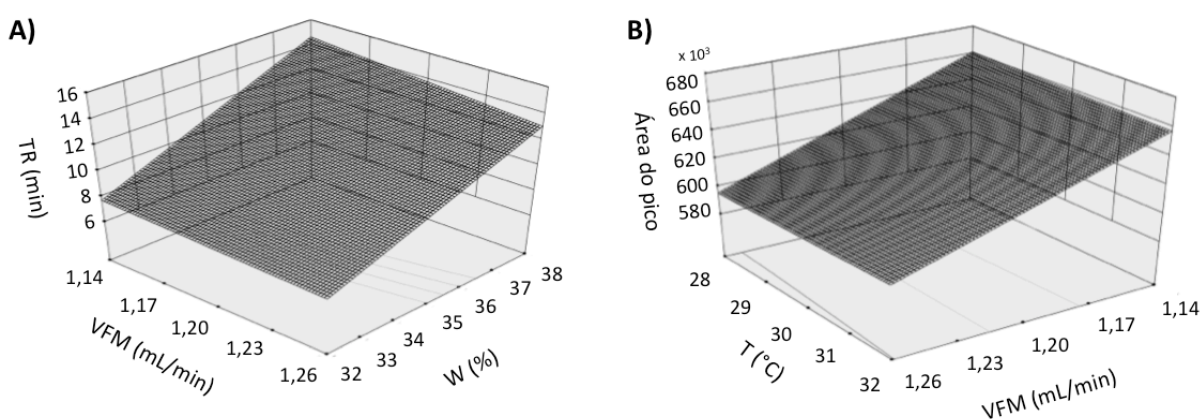
VFM: vazão da fase móvel, em mL/min; T: temperatura do forno, em °C; W: porcentagem de água na fase móvel, expressa em % (v/v). O asterisco indica valor de *p* significativo.



A Tabela 4.1.3 demonstra que o método se provou robusto quanto a modificações na área do pico de CLO, o que repercute adequadamente na quantificação do fármaco. Modificações tanto em T quanto em W não alteraram significativamente essa resposta. A única variável experimental que afeta significativamente ( $p < 0,0001$ ) as respostas é a VFM. O efeito do coeficiente negativo no termo também pode ser notado na Figura 4.1.8, na qual se observa que reduções na VFM aumentam a área do pico.

Apenas a tripla interação entre os fatores T, W e VFM foi estatisticamente significativa, entretanto, essa interação teve contribuição mínima para a resposta de área do pico. O modelo preditivo proposto demonstrou alta habilidade preditiva ( $p < 0,0001$ ) e alta correlação dos termos experimentais ( $R^2 = 0,944$ ) (Tabela 4.1.3).

Por outro lado, o TR foi afetado por todas as variáveis isoladamente, conforme descrito pelo valor de  $p$  na Tabela 4.1.3. Apesar de pequenas mudanças no TR geralmente terem efeito mínimo na quantificação, mudanças na posição do pico do analito e dos interferentes podem ocorrer em proporções desiguais, o que pode afetar a resolução do cromatograma. O fator que mais afetou o TR foi W (Figura 4.1.8), de forma que o aumento da polaridade na fase móvel interferiu na afinidade do analito pela coluna, como esperado (KAZAKEVICH, 2007). Adicionalmente, diferentes interações entre os fatores também repercutiram no TR.



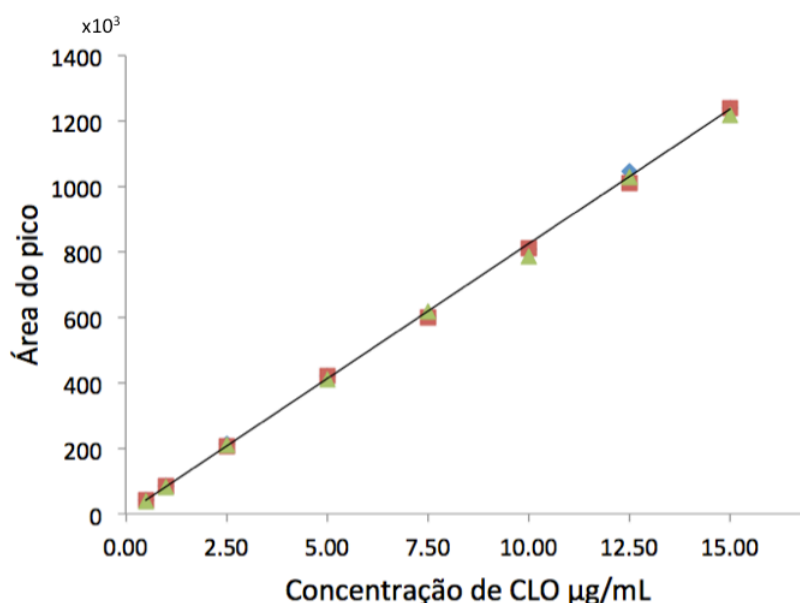
**Figura 4.1.8** Gráficos de superfície de resposta para o ensaio de robustez do método de quantificação do propionato de clobetasol, correspondentes ao efeito de variações analíticas na A) tempo de retenção (TR) e B) área do pico do propionato de clobetasol. T: temperatura do forno; VFM: vazão da fase móvel; W: porcentagem de água na fase móvel.

Apesar da avaliação da robustez não ser um critério exigido para a maioria dos guias de validação, o teste explica como o método pode ser afetado por variáveis operacionais. Os resultados do teste contribuem para determinar se o método necessita de revalidação, caso

algum dos parâmetros avaliados demonstrem-se críticos (RAMBLA-ALEGRE; ESTEVE-ROMERO; CARDA-BROCH, 2012). Nesse sentido, o teste demonstrou que, no método desenvolvido para quantificação do CLO, alterações na composição e vazão da fase móvel devem ser cuidadosamente controladas. A manutenção preventiva do equipamento deve ser suficiente para assegurar a operação adequada das bombas, evitando oscilações nesses parâmetros (MCNAIR; POLITE, 2007).

#### 4.1.4.3.3 Linearidade

A curva analítica do CLO nas concentrações de 0,5 a 15,0 µg/mL em metanol está representada na Figura 4.1.9. A análise de regressão linear pelo método dos mínimos quadrados demonstrou um coeficiente de correlação  $r = 0,9996$ , valor que comprova a linearidade do método na faixa de concentração estudada.



**Figura 4.1.9** Representação gráfica da curva analítica do propionato de clobetasol (CLO) na faixa de concentração de 0,5 a 15,0 µg/mL;  $n = 3$ . Equação da reta:  $y = 81698,6x - 1321,6$ ; coeficiente de correlação linear:  $r = 0,9996$ .

Os dados referentes às três curvas de calibração e suas respectivas estatísticas estão apresentados na Tabela 4.1.4, demonstrando que todos os requisitos para a linearidade foram cumpridos (SHABIR, 2004). De acordo com a inclinação da reta, pode-se afirmar que o método apresentou alta sensibilidade. A inclinação foi diferente de zero e o intercepto

estatisticamente igual a zero. A linearidade do método pode ser ratificada pelo CV dos fatores de resposta abaixo de 2%.

**Tabela 4.1.4** Dados e estatística para teste de linearidade da curva analítica (0.5 – 15.0 µg/mL) para quantificação de propionato de clobetasol

Curva de calibração		Requisito	Resultado
Inclinação	valor	-	81698,6
	intervalo de confiança	não deve incluir zero	de 80351 a 83045
Intercepto	valor	-	1321,6
	intervalo de confiança	deve incluir zero	de -10046 a 12689
Coeficiente de correlação		mínimo de 0,999	0,9996
Resíduos		sem tendência	distribuídos randomicamente
Coeficiente de variação dos fatores de resposta		não mais que 5%	1,97%

#### 4.1.4.3.4 Limites de detecção e quantificação

A partir das curvas de calibração, obteve-se o valor do desvio padrão dos coeficientes lineares e a média dos respectivos coeficientes angulares. Substituindo-se estes valores nas equações I e II, o LD do CLO foi de 0,02 µg/mL e o LQ de 0,07 µg/mL.

Após o cálculo dos limites teóricos, foram analisadas soluções de CLO em concentrações correspondentes aos LD e LQ e em concentrações abaixo e acima dos valores calculados. Os resultados demonstraram que os valores experimentais foram consistentes com os valores teóricos (Tabela 4.1.5). Tais limites são suficientes para determinação da quantidade de CLO nos experimentos de permeação.

**Tabela 4.1.5** Limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) do propionato de clobetasol

CT CLO (µg/mL)	CM CLO (µg/mL)	Concordância (%)	CV (%)
0,01	*	*	*
0,02	0,037	185,00	15,03
0,04	0,060	150,00	2,25
0,06	0,073	121,67	4,87
0,07	0,073	104,29	1,55
0,08	0,083	103,75	1,02

LD e LQ estão sombreados. n = 3. CLO: propionato de clobetasol; CT: concentração teórica; CM: concentração mensurada; CV: coeficiente de variação; \*: não foi obtido pico detectável.

#### 4.1.4.3.5 Precisão

Os ensaios inter e intracorrida apresentaram CV abaixo de 2%, demonstrando que o método é preciso (Tabela 4.1.6). Uma vez que as amostras da precisão intermediária foram preparadas por um analista diferente, 24 h antes da realização do teste, a estabilidade das amostras nas condições de armazenamento de refrigeração também cumpriram os critérios determinados, abaixo de 2% (SHABIR, 2003). Ensaios interlaboratoriais também confirmaram a precisão do método, como demonstrado na Tabela 4.1.7. Desse modo, todos os resultados para testes de precisão estão abaixo do valor de 5% preconizado para esse tipo de ensaio (BRASIL, 2003; ICH, 2005).

**Tabela 4.1.6** Repetibilidade e precisão intermediária do método de quantificação de propionato de clobetasol

CT CLO ( $\mu\text{g/mL}$ )	Repetibilidade		Precisão intermediária	
	CM CLO ( $\mu\text{g/mL}$ )	CV (%)	CM CLO ( $\mu\text{g/mL}$ )	CV (%)
0,5	0,49	0,56	0,49	1,60
7,5	7,45	0,50	7,40	1,04
15,0	15,11	0,29	14,96	0,78

n = 3. CLO: propionato de clobetasol; CT: concentração teórica;  
CM: concentração mensurada; CV: coeficiente de variação.

**Tabela 4.1.7** Reprodutibilidade do método de quantificação de propionato de clobetasol

CT CLO ( $\mu\text{g/mL}$ )	CM CLO ( $\mu\text{g/mL}$ )	CV (%)
0,5	0,49	3,03
7,5	7,75	2,74
15,0	15,48	3,64

n = 3. CLO: propionato de clobetasol; CT: concentração teórica;  
CM: concentração mensurada; CV: coeficiente de variação.

#### 4.1.4.3.6 Exatidão

A exatidão foi avaliada em termos de recuperação do CLO retido nas camadas de pele (EC, FP e PR). Os CV abaixo de 15% (Tabela 4.1.8) estão de acordo com as recomendações para métodos bioanalíticos (SHAH et al., 2000; BANSAL; DESTEFANO, 2007). Os valores de recuperação obtidos (maiores que 85,0%) estão de acordo com as taxas de recuperação

encontradas na literatura, em que valores acima de 70% são aceitáveis para ensaios de recuperação cutânea (VÁVROVÁ et al., 2007; DE PAULA; MARTINS; BENTLEY, 2008; CAMPOS; PRAÇA; BENTLEY, 2016).

**Tabela 4.1.8** Recuperação do método de quantificação de propionato de clobetasol

CT CLO (µg/mL)	Estrato Córneo			Folículo Piloso			Pele Remanescente		
	CM CLO (µg/mL)	CV (%)	Recuperação (%)	CM CLO (µg/mL)	CV (%)	Recuperação (%)	CM CLO (µg/mL)	CV (%)	Recuperação (%)
<b>0,5</b>	0,43	2,29	86,40	0,46	2,24	91,95	0,44	3,36	88,00
<b>7,5</b>	7,61	0,55	101,53	7,80	0,72	103,99	7,07	0,56	94,20
<b>15,0</b>	14,42	0,66	96,13	14,97	0,37	99,80	13,22	0,26	88,13

n = 3. CLO: propionato de clobetasol; CT: concentração teórica;  
CM: concentração mensurada; CV: coeficiente de variação.

#### 4.1.5 Conclusão

Foi desenvolvido e validado um método de HPLC-UV para quantificação de CLO após experimentos de permeação cutânea. O método apresentou alta capacidade de determinação do fármaco extraído do FP e das diferentes camadas da pele. Desse modo, obteve-se uma ferramenta simples e específica para a determinação de CLO em análises de rotina e durante o desenvolvimento de formulações de uso tópico contendo CLO.

## 4.2 PRODUÇÃO DE CARREADORES LIPÍDICOS NANOESTRUTURADOS E AVALIAÇÃO DA RETENÇÃO DE PROPIONATO DE CLOBETASOL NO FOLÍCULO PILOSO

**A formulação produzida nesse capítulo teve sua patente depositada como:**

TAVEIRA, S. F.; MARRETO, R. N.; GRATIERI, T.; GELFUSO, G. M.; **DAMASCENO, T. A. O. S.**; ANDRADE, L. M.; SILVA, L. A. D. Natureza: Patente de Invenção. Número do registro: BR1020160017394. Título: “Composição farmacêutica compreendendo nanopartículas lipídicas contendo propionato de clobetasol para administração tópica no tratamento da alopecia”. Instituição de registro: INPI - Instituto Nacional da Propriedade Industrial. Brasil, 2016.

### 4.2.1 Introdução

A pele pode atuar como reservatório de substâncias aplicadas topicamente, diminuindo a necessidade de repetições frequentes de aplicação. Na camada mais externa, o EC pode armazenar substâncias até uma profundidade de cerca de 5  $\mu\text{m}$ . Contudo, devido à renovação da pele e descamação fisiológica ou por atrito mecânico, esse não é um reservatório tão eficiente. Por outro lado, estudos indicam que o FP, com profundidade de até 4000  $\mu\text{m}$ , atua como reservatório de longo prazo, especialmente para formulações particuladas (LADEMANN et al., 2007; LAUTERBACH; MÜLLER-GOYMANN, 2015). Após penetrarem a abertura dos FP, as partículas estão relativamente protegidas de descamação, atrito e outros fatores ambientais, sendo expelidas apenas por crescimento do pelo ou extravasamento de sebo (SCHNEIDER et al., 2009).

Nanopartículas lipídicas, como CLN, apresentam biocompatibilidade, biodegradabilidade e estabilidade adequadas, tornando-se candidatos interessantes para aplicação em formulações tópicas e, mais especificamente, direcionadas para a via folicular (PARDEIKE; HOMMOSS; MÜLLER, 2009; BELOQUI et al., 2016; SOLEIMANIAN et al., 2018b). Desse modo, o objetivo do estudo deste capítulo foi produzir um nanossistema de CLN contendo CLO a fim de promover aumento da retenção do fármaco no FP.

## 4.2.2 Material

A obtenção do CLO, solventes com grau cromatográfico, material para *tape stripping* diferencial e pele estão descritos na seção 4.1.2.

Para produção das nanopartículas, foram utilizados ácido esteárico e ácido oleico da Merck (Darmstadt, Alemanha), taurodesoxicolato de sódio da Sigma-Aldrich (Steinheim, Alemanha) e lecitina de soja S100 doada pela Lipoid (Ludwigshafen, Alemanha). Tampões MES e HEPES foram produzidos com sais provenientes da Sigma-Aldrich (Steinheim, Alemanha).

Nos estudos de permeação cutânea e liberação, foram utilizados lauril sulfato de sódio (LSS) e membrana de diálise 12.000 Da MWCO da Sigma-Aldrich (Steinheim, Alemanha).

Para estudos de fluorescência, foram testados os corantes verde malaquita G (Merck, Darmstadt, Alemanha), fucsina básica (VWR, Radnor, Estados Unidos da América), rodamina 6G (R6G) (Fluka, Steinheim, Alemanha), violeta de metila e cumarina (Sigma-Aldrich, Steinheim, Alemanha).

Estudos de permeação cutânea *ex vivo* com amostra fluorescente foram realizados com FBS Bio Whittaker (Lonza, Basileia, Suíça), DMEM e penicilina-estreptomicina (Fisher Scientific, Hampton, Estados Unidos da América).

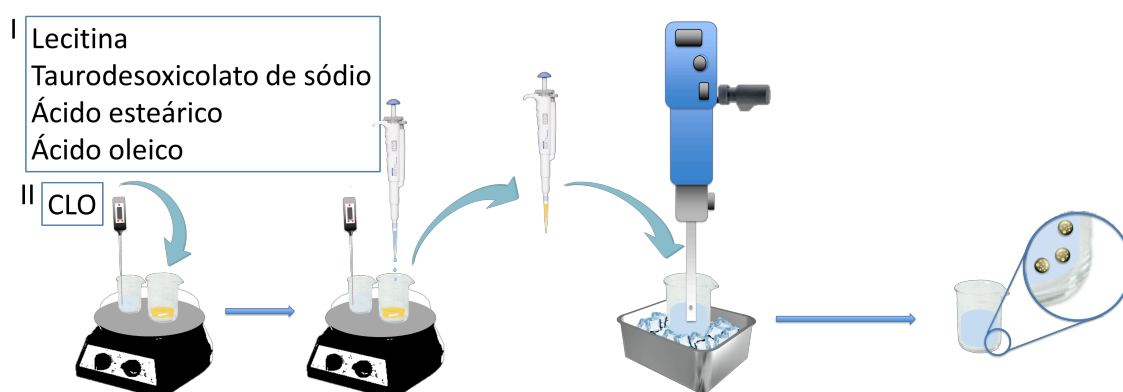
## 4.2.3 Métodos

### 4.2.3.1 Obtenção das formulações

Os CLN foram obtidos em parceria com o laboratório Nanosys, da Universidade de Goiás, pelo método da diluição da microemulsão, desenvolvido por Gasco e colaboradores e adaptado por diferentes pesquisadores (GASCO, 1993; SOUZA et al., 2011; SILVA et al., 2012). Durante o período do estudo, houve produção da formulação no LTMAC, da Universidade de Brasília, e no *Institut für Biopharmazie und Pharmazeutische Technologie*, da *Universität des Saarlandes*, Alemanha.

A microemulsão teve como fase oleosa uma mistura de 300 mg de ácido esteárico e 100 mg de ácido oleico. Os tensoativos utilizados foram 200 mg de lecitina de soja e 50 mg de taurodesoxicolato de sódio. Os componentes da fase oleosa e os tensoativos foram levados à total fusão em placa de aquecimento. Em seguida, 10 mg de CLO foram adicionados e homogeneizados, com auxílio de agitação magnética (300 rpm, 10 minutos). Após adição de

250  $\mu\text{L}$  de água, a mistura foi mantida sob constante agitação até se tornar translúcida e, então, foi gotejada em uma solução tampão MES (0,1 M, pH 5,5) mantida em banho de gelo. A diluição da microemulsão foi realizada sob agitação em homogeneizador Ultra-turrax<sup>®</sup> T-25, com dispersor S25N-25F (IKA, Campinas, Brasil) a 13.500 rpm por 10 minutos (Figura 4.2.1). A proporção microemulsão:tampão foi de 1:20. O volume da dispersão final foi de 20 mL.



**Figura 4.2.1** Esquema representativo do preparo dos carreadores lipídicos nanoestruturados contendo propionato de clobetasol (CLO).

### 4.2.3.2 Caracterização das formulações

#### 4.2.3.2.1 Rendimento

O rendimento foi determinado avaliando-se a relação entre a massa de matéria-prima utilizada e a massa de formulação obtida, de acordo com a seguinte equação:

$$\text{Rendimento} = \frac{m_f}{m_0} \times 100 \quad (\text{Equação V})$$

Onde:  $m_0$  = massa inicial das matérias-primas  
 $m_f$  = massa final da formulação

#### 4.2.3.2.2 Análise morfológica

A morfologia das partículas foi avaliada por microscopia eletrônica de varredura (MEV). Para tanto, a formulação de CLN-CLO foi diluída em água ultrapurificada na



proporção 1:500 (v/v). Uma gota da suspensão foi depositada sobre um *grid* de silício, o qual foi montado em suporte metálico com auxílio de fita adesiva de carbono. O suporte foi disposto em um dessecador para evaporação do meio líquido durante a noite. Em seguida, as amostras foram revestidas com ouro, sob uma atmosfera de argônio, utilizando-se o revestidor por aspersão Q150RES (Quorum Technologies Ltd., Laughton, Reino Unido). As imagens de MEV foram obtidas em um microscópio EVO HD15 (Carl Zeiss Microimaging, Jena, Alemanha).

#### **4.2.3.2.3 Análise granulométrica**

O diâmetro hidrodinâmico médio e o PDI (índice de polidispersividade, do inglês: *Polydispersity Index*) foram analisados por espalhamento de luz dinâmico (Zetasizer Nano ZS). Para tanto, 10 µL de cada formulação foram suspensos em 990 µL de água ultrapura, agitados em vórtex por 30 segundos e levados ao aparelho para análise.

#### **4.2.3.2.4 Potencial zeta**

O potencial zeta foi analisado por mobilidade eletroforética. Para avaliação desse parâmetro, 10 µL de cada formulação foram suspensos em 990 µL de água ultrapura, agitados em vórtex por 30 segundos e a suspensão resultante foi analisada no Zetasizer Nano ZS.

#### **4.2.3.2.5 Fármaco total**

O fármaco total ao final do processo foi determinado adicionando-se uma alíquota da formulação em metanol na proporção 1:25. Em seguida, a mistura foi agitada em vórtex por 2 minutos para desintegração das nanopartículas. Por fim, a amostra foi analisada por HPLC, de acordo com as condições descritas na seção 4.1.4.2.

#### **4.2.3.2.6 Eficiência de encapsulação (EE) e carga do fármaco (CF)**

A EE foi determinada por método indireto, avaliando-se a quantidade de fármaco livre em suspensão e a quantidade de fármaco total na formulação. Para tanto, 500 µL da formulação foram centrifugados a 4000 rcf por 20 minutos. Após o sobrenadante ser

desprezado, o precipitado foi ressuspenso em 1 mL de metanol e o CLO foi quantificado. A EE foi calculada de acordo com a equação VI.

$$EE = \frac{FT-FL}{FT} \times 100 \quad (\text{Equação VI})$$

Onde: EE = eficiência de encapsulação  
 FT = quantidade total de fármaco na formulação  
 FL = quantidade de fármaco livre na formulação

A fim de assegurar que o método apenas precipitava fármaco livre e não partículas, uma dispersão do CLN sem o fármaco foi também submetida ao mesmo protocolo de centrifugação. Uma vez que não foi observada precipitação nestas condições, o método é viável para o objetivo proposto.

A CF foi determinada pela relação entre a quantidade do fármaco encapsulado e a quantidade de lipídio empregado, segundo a Equação VII.

$$CF = \frac{FT-FL}{QL} \times 100 \quad (\text{Equação VII})$$

Onde: FT = quantidade total de fármaco na formulação  
 FL = quantidade de fármaco livre na formulação  
 QL = quantidade de lipídios na formulação

#### 4.2.3.2.7 Estudos de estabilidade

Estudos de estabilidade foram conduzidos com a formulação armazenada em frascos de vidro transparentes sob as temperaturas de 5, 25 e 40°C. Alíquotas foram coletadas nos tempos 0, 7, 15 e 30 dias e avaliadas quando à granulometria, PdI, potencial zeta, pH, fármaco total e eficiência de encapsulação. Os experimentos foram realizados com três amostras independentes para cada uma das condições analisadas.

#### 4.2.3.3 Avaliação da solubilidade do CLO

A fim de determinar o meio da solução receptora, foram realizados testes de solubilidade do fármaco. Uma vez que o CLO não é solúvel em água, foi avaliada a sua solubilidade em solução de LSS. Para tanto, CLO em excesso foi adicionado a frascos contendo soluções aquosas de LSS nas concentrações 0,5; 1,0; 1,5 e 2,0% (m/v), que, após fechados, foram deixados em agitação magnética a 300 rpm por 12 h. Ao fim do tempo, a agitação foi interrompida, o excesso de fármaco decantou e o sobrenadante foi filtrado e quantificado por HPLC, segundo condições descritas na seção 4.1.4.2. Foram avaliadas três replicatas para cada concentração.

Adicionalmente, foi determinada a solubilidade de CLO em solução hidroalcoólica contendo etanol, nas seguintes proporções: 30, 35, 40, 45 e 50% (v/v). Nesse estudo, foi utilizado o mesmo protocolo descrito para o teste de solubilidade de CLO em LSS.

#### 4.2.3.4. Estudo de liberação

Os ensaios de liberação *in vitro* foram realizados utilizando-se células de difusão do tipo Franz (Figura 4.2.2). No compartimento doador (superior) há uma abertura de 15 mm de diâmetro e o compartimento receptor (inferior) possui capacidade de volume de 12 mL. Entre os compartimentos da célula utilizou-se uma membrana de diálise. A solução receptora foi constituída por solução aquosa de LSS 0,5% e foi mantida em agitação magnética a 300 rpm. As células foram dispostas em incubadora a 32°C. Amostras da solução receptora foram coletadas nos tempos 1, 2, 4, 6, 12, 24, 48, 72, 96 e 120 h e analisadas por HPLC.

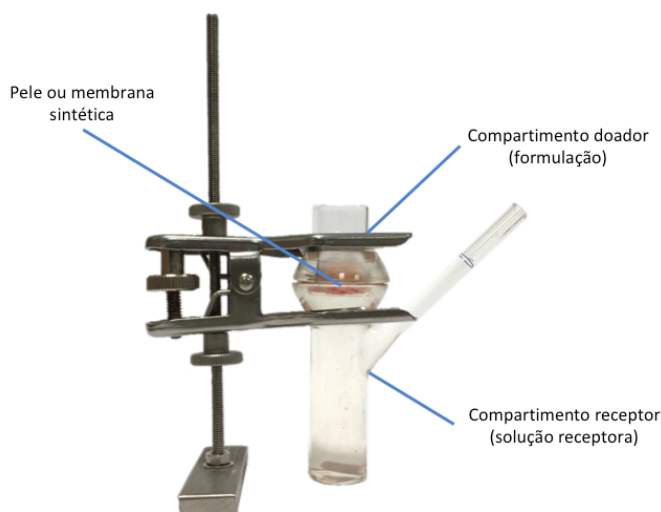


Figura 4.2.2 Célula de difusão do tipo Franz.

Os estudos de liberação foram realizados com a formulação de CLN-CLO e os controles de fármaco livre em solução hidroetanólica (etanol: água 45:55, v/v) e creme comercial.

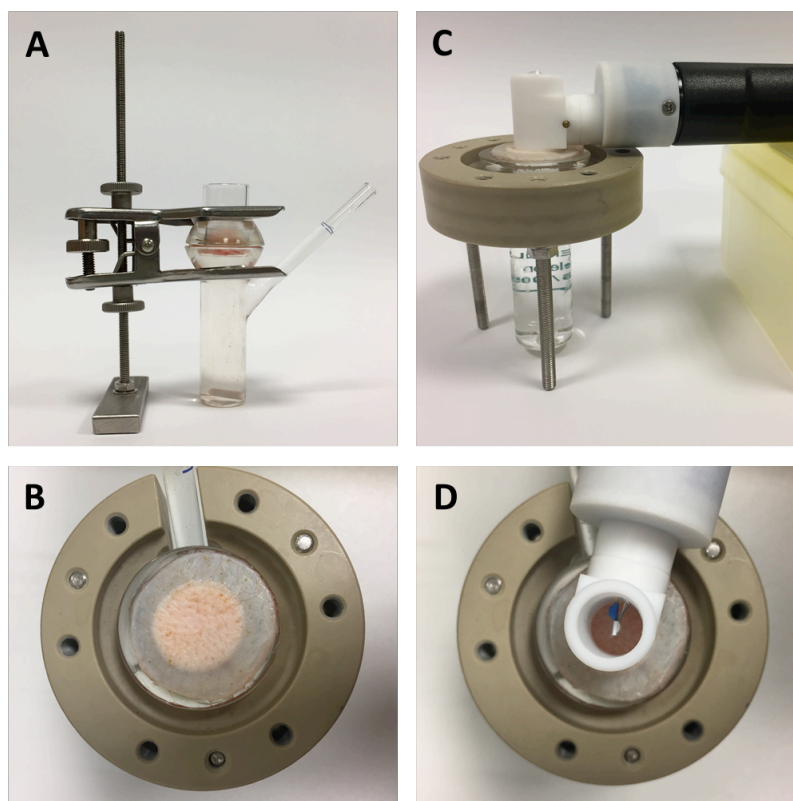
#### **4.2.3.5 Avaliação *in vitro* da permeação/penetração cutânea e acúmulo folicular do fármaco**

##### **4.2.3.5.1 Montagem do sistema de permeação**

O preparo da pele está descrito na seção 4.1.3.3. Peles de porco congeladas por, no máximo, três meses foram cortadas em círculos de 25 mm de diâmetro. As células de Franz foram montadas de modo que a pele se localizou entre os compartimentos superior e inferior. O compartimento receptor foi preenchido com 12 mL de solução aquosa de LSS 0,5% (m/v) e foi mantida em agitação magnética constante a 300 rpm. A fim de simular as condições fisiológicas da pele, as células foram dispostas em incubadora, com temperatura de 32°C. Apenas após climatização por pelo menos 30 minutos os experimentos foram iniciados. Esse período é necessário para que haja estabilidade na temperatura. Também é importante que seja evaporada a água da superfície da pele, resultante do descongelamento, uma vez que a umidade influencia de modo significativo a penetração de fármacos na pele (ANGELO et al., 2016).

##### **4.2.3.5.2 TEWL**

A perda de água transepidérmica por meio da medida TEWL (do inglês: *Transepidermal Water Loss*) foi utilizada como medida de verificação da integridade da pele, e foi realizada para todas as amostras, antes dos experimentos de permeação cutânea *in vitro* (Figura 4.2.3).



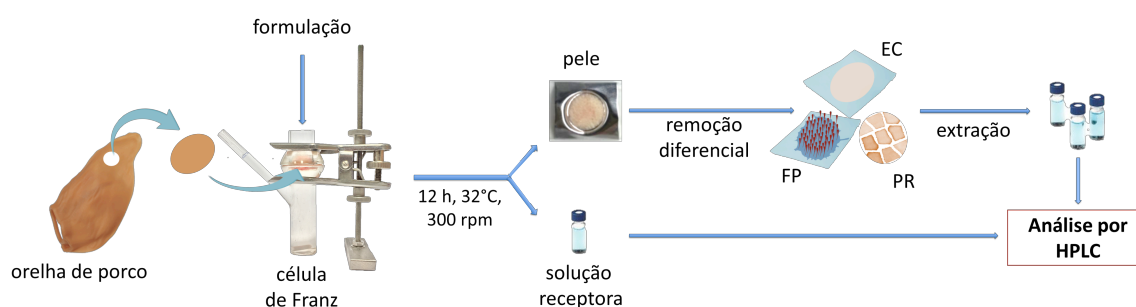
**Figura 4.2.3** Medida de perda de água. A) a pele é montada na célula de Franz e deixada em repouso por 30 minutos; B) o compartimento doador é retirado; C e D) o sensor é posicionado sobre a pele e a medida é realizada.

Para tanto, foram utilizados o Tewameter<sup>®</sup> TM 300 e o sensor de condição ambiental RHT 100 acoplados ao Multi Probe Adapter 5 (Courage and Khazaka, Köln, Alemanha). O *software* CK MPA Multi Probe Adapter foi configurado para medir continuamente, na taxa de uma medida por segundo, com no mínimo 20 repetições e até que o desvio padrão fosse menor ou igual a 0,2 nas últimas cinco medidas, indicando estabilidade de medida. Amostras de pele com valores superiores a  $25 \text{ g/h/m}^2$  foram descartadas. A medida TEWL também foi realizada após os experimentos de permeação cutânea *in vitro*, a fim de verificar se as formulações promoveram alguma alteração significativa na perda de água, indicando alterações na função barreira da pele.

Foram realizados experimentos de permeação cutânea *in vitro* por 12 horas, utilizando-se pele de orelha de porco em células de difusão tipo Franz (Figura 4.2.2). A solução receptora foi mantida em agitação magnética a 300 rpm. As células foram dispostas em uma estufa com circulação de ar, mantida a  $32^\circ\text{C}$ . Após o sistema atingir o equilíbrio da temperatura, a formulação de CLN-CLO (500  $\mu\text{L}$ ), a solução de fármaco livre (500  $\mu\text{L}$ ) ou a formulação de creme comercial (500 mg) foi disposta no compartimento doador. Cada

formulação foi testada em sextuplicata.

Ao final de 12 h, a solução receptora foi coletada, a pele foi retirada da célula de Franz, o excesso de formulação foi removido e a pele foi limpa com algodão. Em seguida, foi realizada a remoção diferencial (conforme descrito na seção 4.1.3.4.1) e o CLO foi extraído de cada camada da pele, utilizando-se metanol e agitação magnética (300 rpm, durante 3 h). O solvente foi, em seguida, filtrado através de uma membrana hidrofóbica de PTFE com poro de diâmetro 0,22  $\mu\text{m}$ , produzindo as amostras de extrato de pele. A solução receptora e os extratos foram quantificados por HPLC (Figura 4.2.4).



**Figura 4.2.4** Esquema representativo do ensaio de permeação cutânea *in vitro*. EC: estrato córneo; FP: foliculo piloso; HPLC: cromatografia líquida de alta eficiência (do inglês: *High Performance Liquid Chromatography*) PR: pele remanescente.

#### 4.2.3.6 Amostras fluorescentes e microscopia confocal

Para marcação dos nanossistemas, foi realizada triagem entre as seguintes substâncias, quanto à fluorescência e miscibilidade com componentes do CLN: cumarina, corante verde malaquita G, fucsina, violeta de metila e rodamina 6G. Para tanto, as misturas foram preparadas à mesma temperatura de preparo dos CLN-CLO (seção 4.2.3.1) e observadas no Microscópio Confocal Zeiss, LSM 710 (Oberkochen, Alemanha).

Escolhida a substância mais adequada, foram produzidos CLN fluorescentes, de acordo com a seção 4.2.3.1, sendo o CLO substituído pela mesma quantidade da substância fluorescente. Os CLN produzidos foram caracterizados quanto à granulometria e potencial zeta e a formulação teve seu pH avaliado.

Os CLN contendo a substância fluorescente e seu controle em EtOH<sub>(aq)</sub> 45% (v/v) foram submetidos ao ensaio de permeação, conforme descrito na seção 4.2.3.5.3, contudo, não foi realizada a etapa de *tape stripping* diferencial ou quantificação por HPLC. Após 12 h de incubação, cada formulação foi limpa da pele, com auxílio de algodão, e a pele foi

congelada com uso de CO<sub>2</sub>. As amostras de pele foram, então, armazenadas a -80°C, para posterior corte manual com bisturi. Cada replicata (n = 3) de pele gerou cerca de dez cortes, que foram posicionados sobre lâminas de vidro e analisados por microscopia confocal. Para obtenção das imagens, foram utilizadas objetivas EC Plan-Neofluar 10x/0,30 M27 e *beam splitter* (vias de fluorescência) MBS 458/561. O comprimento de onda de excitação foi 561 nm e a faixa de detecção de emissão foi 600-700 nm. A potência do laser (0,5048%) e o ganho (600) foram ajustados para amostras de pele sem aplicação de formulação, para cancelamento da sua autofluorescência.

#### 4.2.3.6.1 Estudos de permeação cutânea *ex vivo* com amostra fluorescente

A permeação da formulação fluorescente foi observada em amostras de pele *ex vivo*, por um período de 7 dias. Tais amostras foram coletadas no abatedouro e tratadas, conforme descrito na seção 4.1.3.3, contudo, a pele não foi congelada e foi utilizada imediatamente após tratamento.

A metodologia de cultura de cabelo humano a partir de FP isolados, chamada *human hair follicle organ culture* (HFOC), e a metodologia de cultura de pele humana, chamada *human organotypic skin explant in culture method* (HOSEC), foram adaptadas para este estudo (PHILPOTT; GREEN; KEALEY, 1990; LANGAN et al., 2015). Na primeira, são realizadas biópsias dos FP, que são mantidos imersos em meio de cultura para realização dos ensaios. Já na segunda metodologia, cortes transversais de pele são dispostos em placas contendo meio de cultura, sem que, contudo, o meio cubra a pele.

No presente estudo, a pele foi montada na célula de Franz e o compartimento receptor foi preenchido com meio de cultura composto por DMEM, FBS e penicilina-estreptomicina na proporção 100:10:1. O canal coletor da célula foi fechado com algodão e parafilme (Figura 4.2.5).

A formulação de CLN fluorescente foi depositada no compartimento doador e a célula foi disposta em incubadora a 37°C e ambiente com 5% de CO<sub>2</sub>. Passadas 12 h iniciais, a formulação foi retirada e a pele foi limpa com algodão. O meio de cultura foi trocado a cada 48 h. Houve coleta de amostras de pele nos tempos 1, 3, 6, 12, 24, 72 e 168 h. O processo de preparo da pele para visualização no microscópio confocal e sua análise foram realizados conforme descrito na seção anterior.



**Figura 4.2.5** Célula de Franz montada para estudo de permeação cutânea *ex vivo*.

#### 4.2.3.7 Análise estatística

Durante e após a finalização dos experimentos, os dados foram avaliados qualitativa e estatisticamente. Os dados foram expressos como média  $\pm$  desvio padrão das replicatas. O nível de significância foi fixado em  $\alpha = 0,05$ .

#### 4.2.4 Resultados e discussão

##### 4.2.4.1 Caracterização da formulação

A formulação constituída de CLN-CLO apresentou-se como líquido branco-amarelado (Figura 4.2.6).



**Figura 4.2.6** Aspecto visual da formulação constituída de carreadores lipídicos nanoestruturados contendo propionato de clobetasol.



#### 4.2.4.1.1 Rendimento

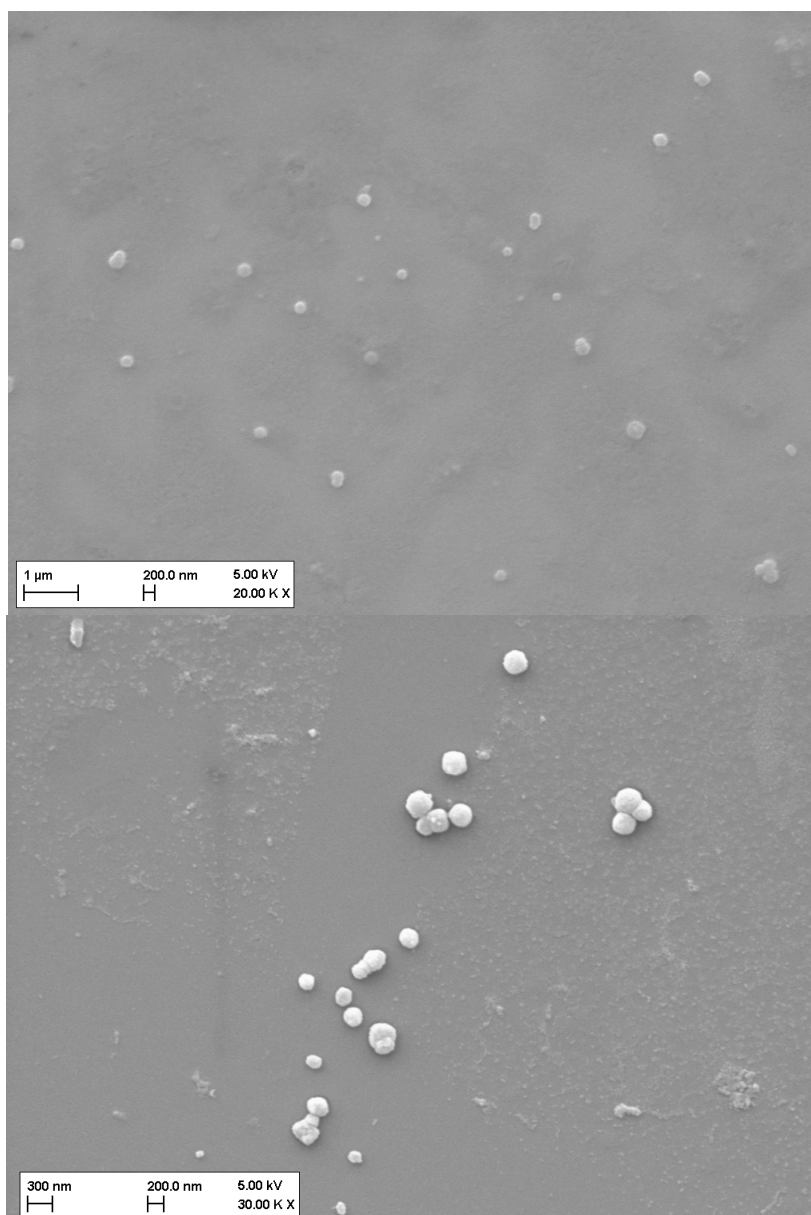
A produção da formulação de CLN-CLO alcançou rendimento de 81,55%. Este é um valor adequado para preparo de CLN em escala laboratorial. Rendimentos entre 75 e 97% são reportados com a técnica de diluição da microemulsão, variando conforme o tipo e quantidades de lipídios e tensoativos utilizados no processo (GASCO, 1993).

Cabe ressaltar que a produção de CLN pode ser facilmente escalonada para fabricação industrial, com técnicas que garantam rapidez, custo acessível e bons rendimentos (PARDEIKE; HOMMOSS; MÜLLER, 2009; BELOQUI et al., 2016; GANESAN; NARAYANASAMY, 2017).

#### 4.2.4.1.2 Análise morfológica

Em um sistema particulado, um parâmetro importante para transporte e liberação de fármacos é a superfície de contato da partícula. A forma esférica apresenta uma proporção ideal entre volume e área de superfície (DAUM et al., 2012). Imagens obtidas por MEV revelam que a formulação de CLN-CLO possui nanopartículas de forma esférica (Figura 4.2.7). Morfologia semelhante foi observada na produção de CLN por outros pesquisadores (HEJRI et al., 2013; SOLEIMANIAN et al., 2018a).

As imagens demonstram partículas com diâmetros em torno de 200 nm ou menos. Embora seja possível analisar os diâmetros de cada uma das partículas individualmente para geração de dados como média e desvio padrão, a secagem do solvente da formulação e a necessidade de submissão da amostra ao vácuo para recobrimento com ouro pode alterar levemente a dimensão das partículas (BHATTACHARJEE, 2016). Além disso, as imagens demonstram uma área limitada da amostra. Assim, para determinação do tamanho da partícula, é aconselhável a utilização de um método mais robusto, capaz de analisar uma quantidade maior de partículas, e, preferencialmente em ambiente solvatado, como na formulação original.

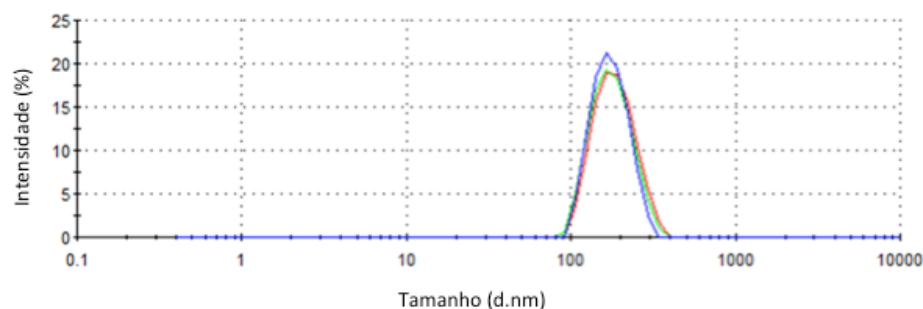


**Figura 4.2.7** Imagens dos carreadores lipídicos nanoestruturados contendo propionato de clobetasol obtidas por microscopia eletrônica de varredura. Escalas = 1 µm e 200 nm (superior); 300 e 200 nm (inferior).

#### 4.2.4.1.3 Análise granulométrica

A fim de se obter dados mais precisos acerca do tamanho das partículas, utilizou-se a técnica de espalhamento de luz dinâmico. Nessa técnica, a formulação é diluída e submetida diretamente à análise no equipamento, sem outras etapas adicionais de preparo. Os CLN-CLO apresentaram diâmetro hidrodinâmico médio de 173,80 ( $\pm 1,35$ ) e PdI de 0,158 ( $\pm 0,032$ ). As partículas apresentaram uma distribuição de tamanho monomodal (Figura 4.2.7) e tiveram suas dimensões na ordem de nanômetros, sendo, portanto, caracterizadas como nanopartículas.

Estudos realizados com partículas poliméricas sugerem que a aplicação cutânea de nanopartículas com tamanhos entre 100 e 200 nm pode proporcionar acúmulo das mesmas no FP a uma profundidade de 500 a 800  $\mu\text{m}$  (PATZELT et al., 2011). Assim, os CLN-CLO produzidos possuem dimensão adequada para a aplicação a que se propõem.



**Figura 4.2.8** Gráfico de distribuição de tamanho de partícula da formulação de CLN-CLO por intensidade de espalhamento de luz.

#### 4.2.4.1.4 Potencial zeta

O potencial zeta relaciona-se ao potencial de uma partícula coloidal mover-se sob ambiente com campo elétrico. Ele reflete a diferença entre a carga superficial da partícula e da camada dispersante ao redor da partícula em movimento, em direção ao eletrodo de carga oposta à sua (BHATTACHARJEE, 2016).

Os CLN-CLO apresentaram potencial zeta de  $-42,20 \pm 3,27$  mV. A literatura sugere que cargas eletrostáticas superiores a  $\pm 30$  mV podem ser vantajosas, uma vez que tendem aumentar a repulsão, diminuindo a aglomeração das partículas em condições de armazenamento, aumentando, assim, a estabilidade da formulação. CLN com cargas negativas também foram observados por outros pesquisadores (GOMES et al., 2014; LEE et al., 2014; GRAFU; BADEA; BALACI, 2015; PUGLIA et al., 2017; FATHI et al., 2018; SOLEIMANIAN et al., 2018a).

#### 4.2.4.1.5 Fármaco total

O total de CLO quantificado na formulação teve concentração de  $0,41 \pm 0,01$  mg/mL. A perda de fármaco durante a produção é justificável e prevista, uma vez que a técnica de

diluição da microemulsão envolve múltiplas etapas e a produção em escala laboratorial leva a perdas durante o processo.

#### 4.2.4.1.6 EE e CF

A EE refere-se à quantidade de fármaco encapsulado no interior da partícula. Para os CLN-CLO, a EE foi de  $80,83 \pm 2,28\%$ . EE acima de 70% também foram obtidos por outros pesquisadores na produção de CLN com diferentes composições e contendo diferentes fármacos (ABURAHMA, 2014; BILIA et al., 2014; VITORINO et al., 2014; PUGLIA et al., 2017; FATHI et al., 2018; SOLEIMANIAN et al., 2018a).

Em inglês *drug loading*, a CF reflete a relação entre a massa de fármaco e a massa da matriz na partícula (MÜLLER et al., 2000). Para o estudo em questão, em condições ideais, caso 100% do fármaco adicionado fosse incorporado à matriz, a CF seria de 1,54%. Para os CLN-CLO produzidos, a CF foi de  $1,24 \pm 0,07\%$ . Assim, tendo em vista as perdas do processo de produção da formulação, considera-se o valor de CF adequado.

Cabe salientar que não foi estudada a capacidade de carga do sistema, que corresponde à quantidade máxima do fármaco que é possível ser incorporada na matriz da partícula. Para determiná-la, outros ensaios devem ser realizados, com valores crescentes de massa de fármaco. Uma vez que o CLO é um fármaco potente, a sua quantidade utilizada nessa formulação foi o equivalente a 0,05%, que é a dose usual para sua aplicação tópica, e suficiente para o estudo proposto.

#### 4.2.4.1.7 Estudos de estabilidade

Foram realizados estudos de estabilidade da formulação de CLN-CLO a 5, 25 e 40°C. As amostras foram analisadas nos tempos 0, 7, 15 e 30 dias. Para cada condição foram utilizadas três amostras independentes (Tabela 4.2.1).

Não foi observada alteração importante no diâmetro hidrodinâmico de partícula, contudo o PDI teve aumento considerável com o tempo para as amostras armazenadas a 25 e 40 °C, provavelmente devido à aglomeração de partículas (BHATTACHARJEE, 2016). Já o potencial zeta e o pH mantiveram-se sem alterações significativas para todas as condições de estudo.

**Tabela 4.2.1** Caracterização da formulação de carreadores lipídicos nanoestruturados contendo propionato de clobetasol após estudos de estabilidade

Dia	Diâmetro hidrodinâmico (nm)	PdI	Potencial zeta (mV)	pH	CLO total (mg/mL)	CLO total (%)	EE (%)	
0	173,80 ± 1,35	0,158 ± 0,0032	-42,20 ± 3,27	5,56 ± 0,02	0,41 ± 0,01	100 ± 2,47	80,83 ± 2,28	
7	178,00 ± 4,20	0,164 ± 0,0035	-41,10 ± 3,40	5,55 ± 0,02	0,40 ± 0,01	98,83 ± 2,69	80,98 ± 4,01	
5 °C	15	176,10 ± 2,50	-39,70 ± 0,90	5,65 ± 0,02	0,41 ± 0,02	100,16 ± 3,79	78,87 ± 4,45	
	30	211,40 ± 4,02	0,207 ± 0,0210	-42,10 ± 0,71	5,58 ± 0,02	0,41 ± 0,01	99,13 ± 2,93	82,41 ± 2,61
7	189,40 ± 2,62	0,211 ± 0,0230	-40,70 ± 2,08	5,55 ± 0,02	0,41 ± 0,01	99,45 ± 3,40	80,83 ± 2,28	
25 °C	15	175,50 ± 2,53	0,296 ± 0,0080	-41,00 ± 1,40	5,63 ± 0,02	0,41 ± 0,02	99,90 ± 5,19	78,98 ± 3,45
	30	267,50 ± 2,68	0,497 ± 0,0140	-41,70 ± 3,02	5,50 ± 0,03	0,40 ± 0,01	98,74 ± 3,08	80,62 ± 4,89
7	179,10 ± 2,31	0,307 ± 0,0750	-40,70 ± 3,64	5,53 ± 0,02	0,35 ± 0,03	86,05 ± 7,23	77,03 ± 4,48	
40 °C	15	181,00 ± 2,53	0,222 ± 0,0080	-40,00 ± 1,40	5,50 ± 0,02	0,34 ± 0,02	83,36 ± 3,46	74,31 ± 3,45
	30	171,10 ± 9,89	0,431 ± 0,0620	-38,00 ± 2,65	5,28 ± 0,06	0,34 ± 0,02	83,66 ± 4,74	71,48 ± 5,05

Resultados apresentados como média ± DP; n = 3. CLO: propionato de clobetasol; EE: eficiência de encapsulação; PdI: índice de polidispersividade.

O armazenamento a 40°C resultou em degradação do fármaco total, bem como diminuição da EE. É possível que, nessa condição, o CLO incorporado na partícula tenha sido expulso para o meio e sofrido reações físico-químicas de degradação. De fato, o estresse térmico tende a desorganizar a matriz lipídica (SEVERINO et al., 2011), promovendo a expulsão do fármaco. Uma característica que corrobora com a suposição da degradação é o fato de que houve alteração de cor da formulação, passando a levemente amarronzada. É evidente que lipídios são passíveis de oxidação quando expostos ao calor, e nesse processo, produzem radicais livres capazes de reagir com moléculas disponíveis no meio (SHAHIDI; ZHONG, 2010).

Com base nos dados expostos, é aconselhável que a formulação seja mantida armazenada refrigerada, condição na qual mostrou-se fisicamente mais estável durante o período de estudo.

#### 4.2.4.2 Avaliação da solubilidade do CLO

Tanto para ensaios de liberação quanto de permeação cutânea *in vitro* é necessário observar a condição *sink* da solução. Em tal condição, a concentração do fármaco na solução receptora não deve exceder 10% da solubilidade do fármaco naquele meio. Esta condição deve ser mantida durante todo o período experimental (WHO, 2006), garantindo que o meio não seja saturado e a difusão do fármaco não fique comprometida.

Ensaio de permeação cutânea utilizam preferencialmente meio aquoso como solução receptora. Uma vez que a solubilidade do CLO em água é apenas cerca de 4 µg/mL, optou-se por utilizar uma solução aquosa contendo o tensoativo LSS para aumentar a sua solubilidade. Considerando-se que nos ensaios propostos a concentração do CLO na formulação é de 500 µg/mL, e o volume da formulação é de 500 µL, a quantidade de fármaco no compartimento doador da célula de Franz não excede 250 µg. Considerando-se ainda que o volume do compartimento receptor é de 12 mL, caso todo fármaco passasse do compartimento doador ao receptor, a concentração final de CLO seria de aproximadamente 20,83 µg/mL. Assim, todas as amostras testadas de LSS seriam adequadas para garantir condição *sink* (Tabela 4.2.2). Por esse motivo, foi selecionada a menor concentração de LSS, qual seja 0,5% (m/v).

**Tabela 4.2.2** Solubilidade do propionato de clobetasol em solução aquosa de lauril sulfato de sódio

LSS <sub>(aq)</sub> (% m/v)	CLO recuperado (µg/mL)
0,5	245,89 ± 12,18
1,0	624,67 ± 5,51
1,5	940,53 ± 34,51
2,0	1284,26 ± 55,16

Resultados apresentados como média ± DP; n = 3.  
CLO: propionato de clobetasol; LSS: lauril sulfato de sódio.

A fim de se estabelecer uma amostra controle de fármaco livre em solução para comparação de performance com o CLN, optou-se inicialmente por usar LSS<sub>(aq)</sub> 1,0% (m/v). Contudo, estudos posteriores de liberação (Figura 4.2.9) demonstraram que tal sistema proporcionou uma liberação lenta. Por esse motivo, novos ensaios de solubilidade do CLO foram realizados, dessa vez com solução hidroetanólica (Tabela 4.2.3). De acordo com os

resultados, optou-se por usar EtOH<sub>(aq)</sub> 45% (v/v) para a solução controle de fármaco livre, uma vez que essa solução pode proporcionar a dissolução do CLO na concentração 500 µg/mL.

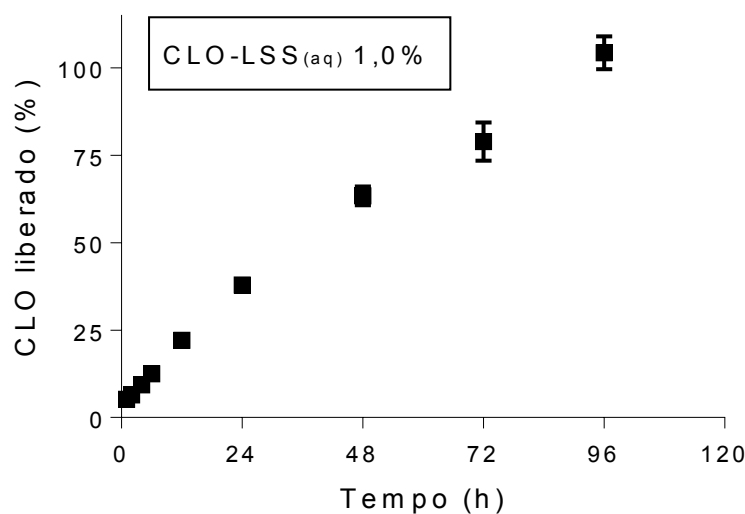
**Tabela 4.2.3** Solubilidade do propionato de clobetasol em solução hidroetanólica

EtOH <sub>(aq)</sub> (% v/v)	CLO recuperado (µg/mL)
30	64,81 ± 0,91
35	167,49 ± 3,58
40	353,01 ± 13,79
45	663,11 ± 29,50
50	1424,60 ± 15,07

Resultados apresentados como média ± DP; n = 3.  
CLO: propionato de clobetasol.

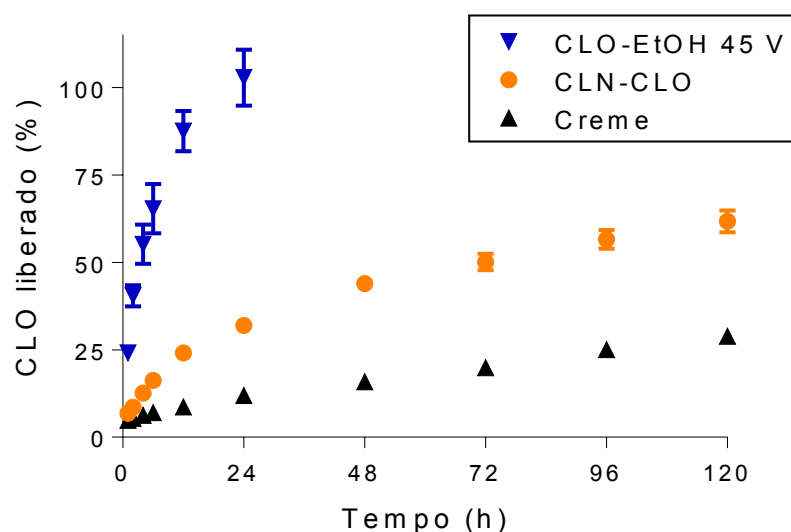
#### 4.2.4.3 Estudo de liberação

Inicialmente, o CLO foi solubilizado em solução aquosa de LSS 1,0% (m/v) para atuar como formulação controle de fármaco livre em solução. Contudo, ensaios de liberação demonstraram uma liberação lenta, de cerca de três dias (Figura 4.2.9).



**Figura 4.2.9** Perfil de liberação do propionato de clobetasol (CLO) em solução aquosa de lauril sulfato de sódio (LSS) 1,0%. Resultados apresentados como média ± DP; n = 6.

Uma vez que a concentração micelar crítica do LSS é 0,125% (m/v) (NANGIA et al., 1998), pode-se supor que, nas condições testadas, o fármaco foi encapsulado em um sistema de micelas, afetando, assim, sua liberação. Por esse motivo, a amostra de CLO em solução de LSS 1,0% (m/v) foi descartada como controle do fármaco livre e, em substituição, foi utilizado o CLO em solução hidroetanólica.



**Figura 4.2.10** Perfil de liberação das formulações. Resultados apresentados como média  $\pm$  DP;  $n = 6$ . CLN-CLO: carreador lipídico nanoestruturado contendo propionato de clobetasol; CLO-EtOH 45 V: CLO livre em EtOH<sub>(aq)</sub> (45%, v/v).

A Figura 4.2.10 demonstra que o controle do fármaco livre em EtOH<sub>(aq)</sub> 45% (v/v) entrou em equilíbrio nas primeiras 24 h. Já as nanopartículas demonstraram liberação sustentada do fármaco, chegando a cerca de 50% de liberação no terceiro dia. O perfil de liberação do creme comercial foi o mais lento, contudo isso não é indicativo de liberação sustentada e ocorreu somente devido à sua alta viscosidade em comparação aos sistemas constituídos de dispersões. Ademais, a formulação em creme apresentou baixa retenção nas camadas da pele e especialmente no FP, após experimentos de permeação cutânea *in vitro*, como descrito na próxima seção.

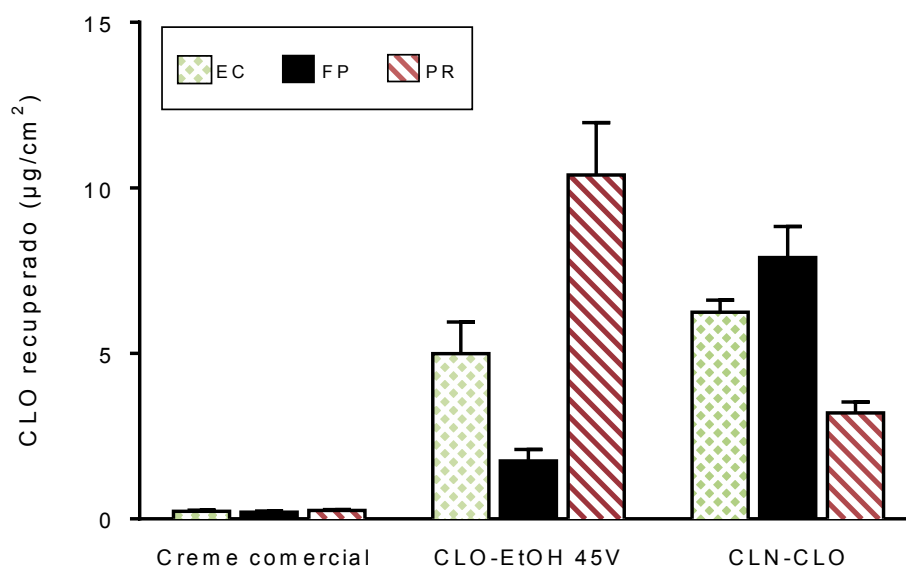
Um perfil de liberação sustentado como o apresentado pelas nanopartículas é desejável, especialmente quando a formulação visa atuar como reservatório do fármaco na pele (PARDEIKE; HOMMOSS; MÜLLER, 2009). Portanto, a formulação de CLN-CLO



apresenta características de liberação adequadas ao objetivo proposto, possibilitando a diminuição da necessidade de reaplicação da formulação.

#### 4.2.4.4 Avaliação da permeação/penetração cutânea e acúmulo folicular do fármaco

Nos estudos de permeação cutânea *in vitro*, o acúmulo de CLO no FP a partir das formulações estudadas seguiu a seguinte ordem: creme comercial < solução hidroetanólica < CLN. Não foi observado CLO na solução receptora para nenhuma das amostras analisadas (Figura 4.2.11).



**Figura 4.2.11** Quantificação do propionato de clobetasol (CLO) após ensaios *in vitro* de permeação cutânea em células de Franz com aplicação passiva das formulações. Não foi observado CLO na solução receptora. Resultados apresentados como média  $\pm$  DP; n = 6. CLN: carreador lipídico nanoestruturado; CLO-EtOH 45 V: CLO livre em EtOH<sub>(aq)</sub> (45%, v/v); EC: estrato córneo; FP: foliculo piloso; PR: pele remanescente.

Em comparação ao creme comercial, houve maior penetração do CLO a partir da solução hidroalcoólica, para todas as camadas da pele. Esse efeito se deve principalmente a dois mecanismos. Primeiramente, o etanol funciona como cossolvente, proporcionando maior solubilidade e partição do fármaco para dentro da pele, aumentando, assim, o seu fluxo. Em segundo lugar, o solvente atua como um potencializador de penetração ao desorganizar os lipídios do EC, que funciona como barreira à penetração de substâncias (SINHA; PAL KAUR,

2000; BENSON, 2005; BABITA et al., 2006). De todo modo, a maior penetração do fármaco a partir da formulação CLO-EtOH 45V foi observada na PR e não no FP, que é o sítio-alvo do presente estudo. Ainda, o etanol é conhecidamente relacionado a reações de sensibilização, principalmente no uso prolongado, que poderia agravar a condição tratada (STOTTS; ELY, 1977; BASKETTER; SAFFORD, 2016).

A formulação de CLN-CLO aumentou a retenção do fármaco tanto no EC, quanto na PR, em relação ao creme comercial. A composição do CLN favorece a maior penetração de substâncias na pele. Estudos indicam que nanopartículas lipídicas aplicadas de modo passivo não penetram na epiderme, mas ficam primordialmente retidas no EC ou em apêndices cutâneos (HSU et al., 2011; IANNUCELLI et al., 2013; LEITE-SILVA et al., 2016). O conteúdo lipídico dos CLN faz com que as partículas tenham alta afinidade com os ácidos graxos presentes naturalmente no EC, de onde liberam o seu conteúdo e se difundem para a PR (BABITA et al., 2006; BOLZINGER et al., 2012). Em relação à retenção folicular, a formulação de CLN foi capaz de aumentar a quantidade de CLO no FP cerca de 4,5 vezes em comparação com a solução hidroalcoólica de CLO. Em relação ao creme comercial, estes valores atingiram cerca de 40 vezes. Diversas pesquisas evidenciam que formulações nanoparticuladas promovem a permeação cutânea e folicular do seu conteúdo de forma mais eficiente quando comparadas às formulações correspondentes, sem nanopartículas (BLUME-PEYTAVI; VOGT, 2011; RABER et al., 2014; SHAMSHINA; ROGERS, 2014; MATOS et al., 2015; NAFISI; MAIBACH, 2018). Contudo, não foram encontrados resultados tão pronunciados quanto os obtidos no presente estudo.

Não apenas a penetração, mas, também, o armazenamento a longo prazo de substâncias no FP são favorecidos por formulações particuladas. Estudos *in vivo* com humanos voluntários em que se aplicou um corante em solução ou nanopartículas poliméricas contendo o corante, demonstraram que no primeiro grupo só houve detecção da substância no FP por 3 dias subsequentes à aplicação, enquanto para o grupo de nanopartículas, o corante foi detectado por até 10 dias (LADEMANN et al., 2007). A maior penetração e retenção a longo prazo ocorre devido às características próprias dos materiais particulados, que possuem uma relação entre volume e área de superfície ideais, de modo a promover maior interação com as superfícies da pele e invaginações (LADEMANN et al., 2007; BLUME-PEYTAVI; VOGT, 2011).

Os FP são invaginações na epiderme, que podem alcançar profundidades de até 4000 µm e atingir o tecido subcutâneo. Na parte superior do FP, há uma camada semelhante ao EC e na parte inferior há células com junções estreitas, que fornecem uma barreira à passagem de

partículas para a epiderme viável (SCHNEIDER et al., 2009; LAUTERBACH; MÜLLER-GOYMANN, 2015). Assim, ao entrarem no FP, as partículas podem ser armazenadas e liberarem seu conteúdo gradativamente.

Lademann e colaboradores (2009) indicam que, além do acúmulo no FP, as nanopartículas se acumulam na superfície do pelo, que, devido à organização da estrutura da queratina, forma um zigzag com bolsões de cerca de 320 nm no pelo de porco e 530 nm no humano. Assim, os pelos também poderiam servir de reservatório e seu movimento natural funcionaria como um sistema de bombeamento das partículas para o interior do FP em modelos *in vivo*. Embora o grupo de Lademann sugira que o tamanho de partícula ideal para a penetração folicular eficiente esteja entre 300 e 600 nm (LADEMANN et al., 2009), outras pesquisas também demonstram resultados promissores em faixas de 100 a 200 nm (PATZELT et al., 2011; TRAUER et al., 2014; MOGENSEN et al., 2018).

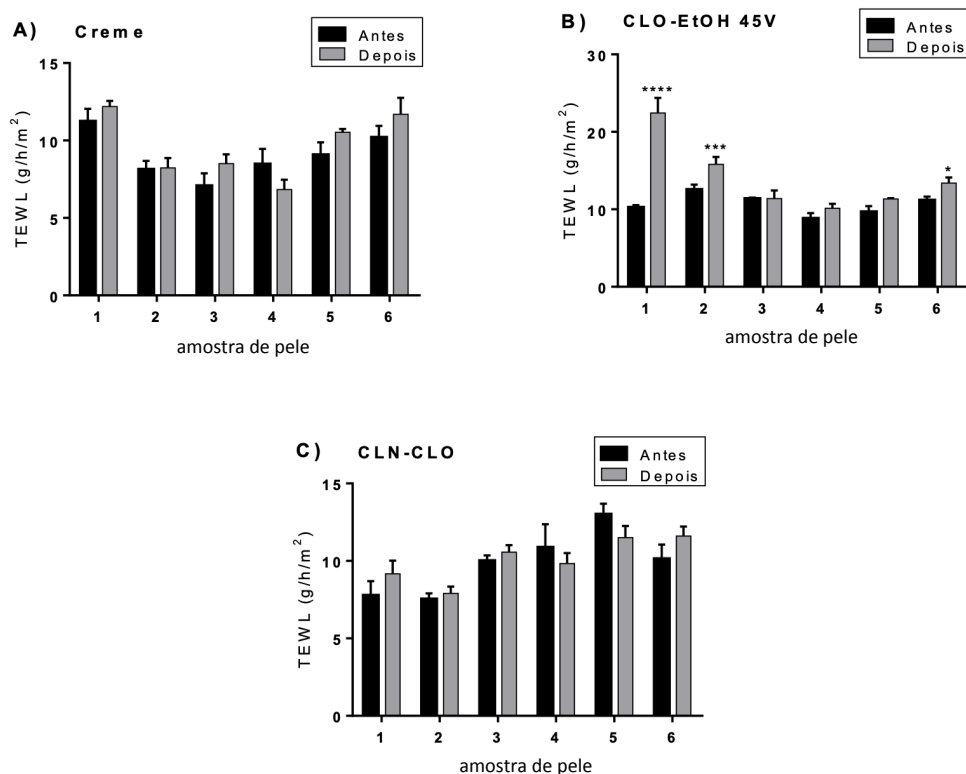
Além disso, devido às características lipídicas dos CLN, essas nanopartículas apresentam alta afinidade pelo sebo no FP e pelas glândulas sebáceas, encontrando ali mais um sítio de armazenamento (MEIDAN; BONNER; MICHNIAK, 2005; BLUME-PEYTAVI; VOGT, 2011; SHAMSHINA; ROGERS, 2014; VOGT; BLUME-PEYTAVI, 2014; LAUTERBACH; MÜLLER-GOYMANN, 2015; PEREIRA et al., 2018). A composição dos CLN permite alta tolerabilidade para aplicação dérmica, devido à sua biodegradabilidade e baixa toxicidade. A lecitina e o taurodesoxicolato são biocompatíveis, por serem substâncias produzidas pelo corpo, com função de emulsificação (HSIEH; BROCK, 2017). Este último tem demonstrado propriedades anti-inflamatórias em estudos com camundongos (CHANG et al., 2018). Já o ácido oleico é um componente natural da pele e, em formulações, pode agir como potencializador de penetração cutânea (BABITA et al., 2006), assim como o ácido esteárico (BOLZINGER et al., 2012; LOHAN et al., 2016). Adicionalmente, a presença de lipídios líquidos e sólidos proporciona características adequadas para manter o fármaco encapsulado na formulação, mas promover a liberação do seu conteúdo quando em contato com a pele (PARDEIKE; HOMMOSS; MÜLLER, 2009; ATTAMA; MOMOH; BUILDERS, 2012; MONTENEGRO et al., 2016).

Por fim, não foi observada penetração do CLO na solução receptora para nenhuma das formulações nas condições de estudo, o que significa dizer que o fármaco ficou retido nas camadas da pele.

Esses dados indicam que o desenvolvimento das formulações contendo CLN-CLO para o direcionamento do fármaco especificamente para o FP representa uma estratégia muito promissora para o tratamento de patologias inflamatórias associadas ao pelo e ao couro

cabeludo. A adoção de tal formulação, pode levar a uma redução significativa na dosagem do fármaco, aumentando a eficácia do tratamento.

#### 4.2.4.4.1 TEWL



**Figura 4.2.12** Efeito das formulações sobre a perda de água transepidérmica após única exposição da pele às formulações por 12 h. Resultados apresentados como média  $\pm$  DP; n = 6. Foram realizadas 3 análises por cada amostra. Cada análise consistiu em uma medida por segundo, com no mínimo 20 repetições e até que o desvio padrão fosse menor ou igual a 0,2 nas últimas cinco medidas. CLN-CLO: carreador lipídico nanoestruturado contendo propionato de clobetasol; CLO-EtOH 45 V: CLO livre em EtOH(aq) (45%, v/v); TEWL: perda de água transepidérmica (do inglês: *Transepidermal Water Loss*); \* = p < 0,05; \*\*\* = p < 0,01; \*\*\*\* = p < 0,0001

Uma das funções da pele é agir como uma barreira contra a entrada de substâncias estranhas e contra a perda excessiva de água. Pela medida de evaporação de água da pele pode-se avaliar sua integridade, uma vez que o aumento desse valor pode indicar danos cutâneos. O dispositivo Tewameter<sup>®</sup> mede o gradiente de evaporação por meio de uma sonda, com um sensor de temperatura e um sensor de umidade relativa. Baseado na Lei de difusão de Adolf Fick, o *software* acoplado calcula a taxa de evaporação, que é expressa em g/h/m<sup>2</sup> (DABBOUE et al., 2015).

Após experimentos de permeação cutânea *in vitro*, não foi observada variação significativa nas amostras de pele expostas ao CLN-CLO ou ao creme comercial, indicando que, nas condições testadas, tais formulações não alteram a integridade da barreira da pele. Já as peles expostas à solução hidroetanólica contendo CLO apresentaram alteração significativa nos valores de TEWL para metade das amostras testadas (Figura 4.2.12).

A medida TEWL é um método bem estabelecido e amplamente usado. Embora estudos indiquem que ela não seja capaz de detectar pequenos danos no EC, a técnica demonstra efetividade em detectar distúrbios severos à integridade da barreira cutânea, tais como utilização de *tape-stripping*, uso de microagulhas, uso de lâmina de barbear ou exposição a algumas substâncias químicas (NETZLAFF et al., 2006; DABBOUE et al., 2015).

Uma vez que foram observadas alterações significativas nas medidas antes e após utilização da solução hidroetanólica, pode-se dizer que tal solução é capaz de produzir danos importantes na pele. De fato, o etanol possui propriedades de desidratação e desnaturação proteica, que podem afetar a estrutura do EC e até extrair os lipídios dessa camada da pele (BABITA et al., 2006). A literatura reporta que solventes orgânicos podem destruir a barreira cutânea. Estudos com aplicação de uma mistura de clorofórmio: metanol (2:1% v/v) sobre a pele indicam que a medida de TEWL aumentou em mais de 5 vezes após exposição à mistura de solventes (NANGIA et al., 1998).

É importante salientar que, no presente estudo, em experimentos com exposição de apenas 12 h já foi detectada alteração na função barreira com o uso de CLO-EtOH. Assim, é possível supor que o uso da solução hidroetanólica a longo prazo pode gerar lesões ainda mais severas à pele, além das possíveis reações de sensibilização mencionadas. Por esse motivo, é importante considerar opções alternativas.

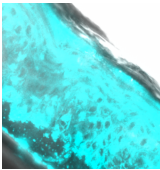

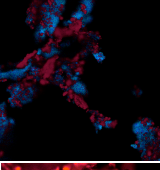
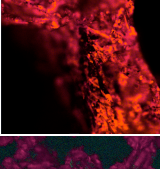
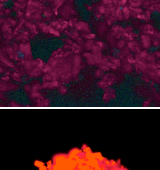

Adicionalmente, estudos sugerem que a aplicação de CLN na pele proporcione a formação de um filme lipídico, causando efeito de oclusão e prevenindo a perda de água transepidérmica (PARDEIKE; HOMMOSS; MÜLLER, 2009; LAUTERBACH; MÜLLER-GOYMANN, 2015; BELOQUI et al., 2016). Tal característica pode gerar benefícios em tratamentos a longo prazo, especialmente em condições cutâneas com comprometimento do EC.

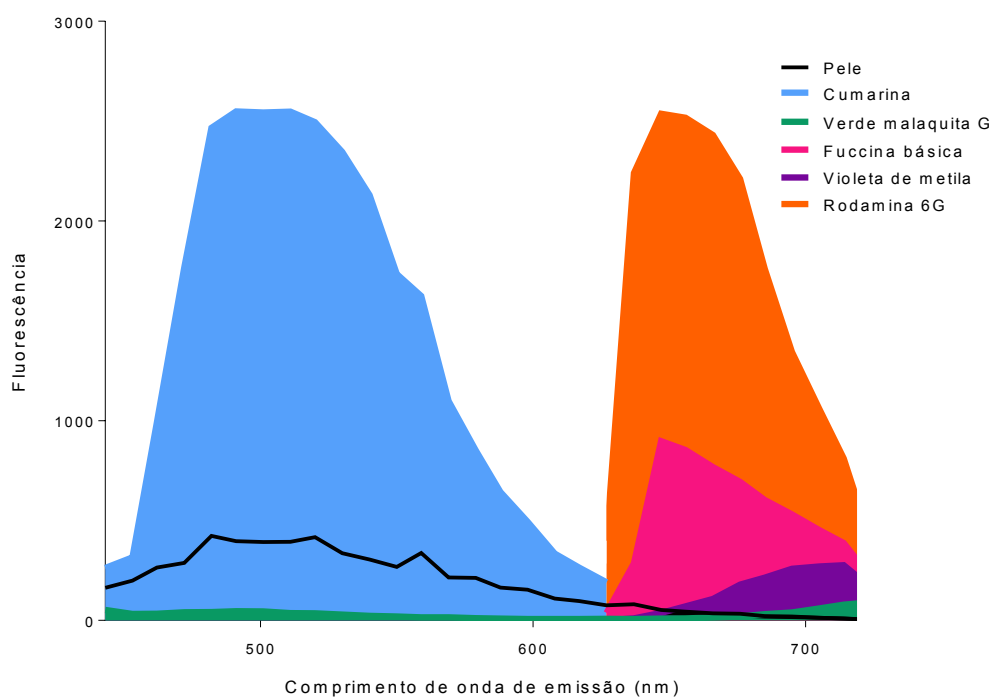
#### **4.2.4.5 Amostras fluorescentes e microscopia confocal**

A fim de se produzirem CLN fluorescentes, para observar sua localização na pele após experimentos de permeação cutânea *in vitro*, foi realizada triagem com diferentes substâncias quanto à miscibilidade com componentes do CLN e fluorescência (Tabela 4.2.4).

A pele humana e a pele de porco são muito similares quanto à morfologia e composição celular e, por esse motivo, guardam também certa similaridade em relação à fluorescência. Elas apresentam autofluorescência quando excitadas, devido a cromóforos endógenos absorventes como melanina e hemoglobina, e fluoróforos como colágeno e elastina (DRAKAKI et al., 2007).

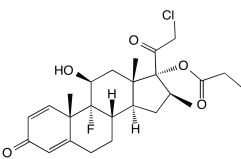
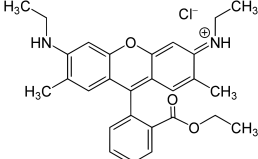
**Tabela 4.2.4** Comparação entre fluorescência da pele e substâncias candidatas para produção de carreadores lipídicos nanoestruturados

Substância	Excitação (nm)	Emissão máx. (nm)	Imagem	Resultado
Pele de porco	405, 561	482		Possui autofluorescência
Cumarina	405	491		Fluorescência na mesma faixa que pele
Verde malaquita G	405	714		Imiscível com componentes do CLN
Fucsina básica	561	647		Aprovada
Violeta de metila	561	714		Aprovada
Rodamina 6G	561	647		Aprovada



**Figura 4.2.13** Sobreposição dos espectros de substâncias fluorescentes.

**Tabela 4.2.5** Comparação entre características do propionato de clobetasol e rodamina 6G e as nanopartículas produzidas com estas substâncias

	CLO	R6G
Molécula		
MM (g/mol)	466,97	479,02
LogP	3,49	6,36
Solubilidade em água (µg/mL)	3,860	0,496
CLN		
Diâmetro (nm)	173,8 ± 1,3	188,1 ± 3,5
PdI	0,158 ± 0,032	0,146 ± 0,016
Potencial zeta (mV)	-42,2 ± 3,2	-54,4 ± 1,5
pH da formulação	5,56 ± 0,02	5,51 ± 0,02

CLN: carreador lipídico nanoestruturado; CLO: propionato de clobetasol; MM: massa molar; R6G: rodamina 6G; PdI: índice de polidispersividade.

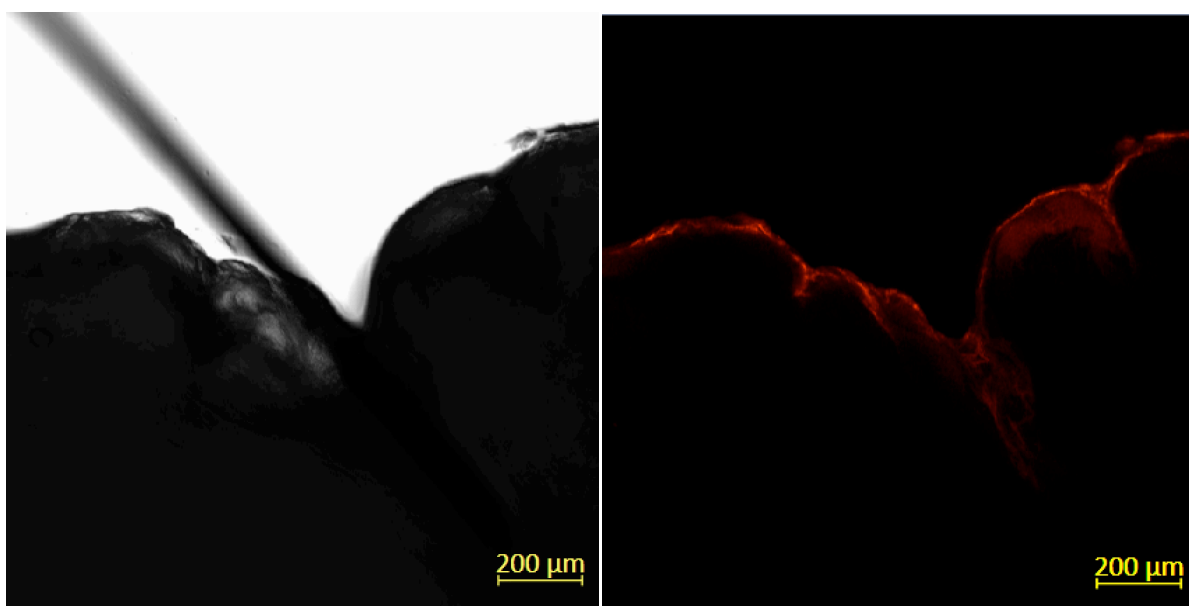
Para que uma substância fluorescente seja observada sobre a pele após ensaio de permeação cutânea *in vitro*, a substância em estudo não deve emitir fluorescência na mesma

faixa que a pele, ou deve emitir uma fluorescência muito maior que a pele. Entre as substâncias aprovadas quanto à fluorescência e miscibilidade com os componentes do CLN, foi escolhida a R6G, por possuir fluorescência em maior intensidade (Figura 4.2.13). Além disso, a R6G possui propriedades físico-químicas próximas às do CLO. Por fim, os CLN-R6G produzidos apresentaram características semelhantes aos dos CLN-CLO (Tabela 4.2.5).

Após preparo dos CLN-R6G, foram conduzidos estudos de permeação com o controle de R6G 0,05% em EtOH<sub>(aq)</sub> 45% (v/v) e com as nanopartículas de R6G.

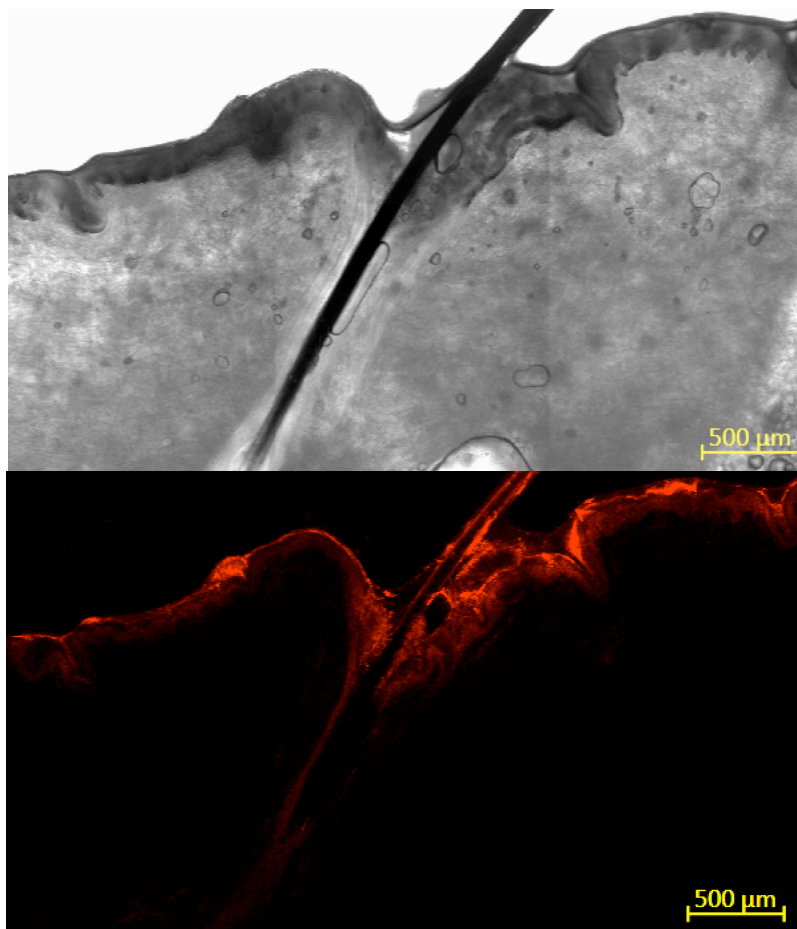
O corante em solução penetrou menos no FP que as nanopartículas, como pode ser observado nas Figuras 4.2.14 e 4.2.15. Os CLN-R6G proporcionam fluorescência dentro do FP, em profundidade superior a 900  $\mu\text{m}$ , confirmando a liberação específica no sítio-alvo desejado.

Tais resultados evidenciam o que já havia sido observado de forma quantitativa: a formulação de nanopartículas escolhida é capaz de direcionar o acúmulo da substância em estudo especificamente ao FP.



**Figura 4.2.14** Folículo piloso após ensaios *in vitro* de permeação cutânea em células de Franz com aplicação passiva de solução hidroetanólica de rodamina 6G. Imagens obtidas por microscopia óptica (esquerda) e confocal (direita). Escala = 200  $\mu\text{m}$ .





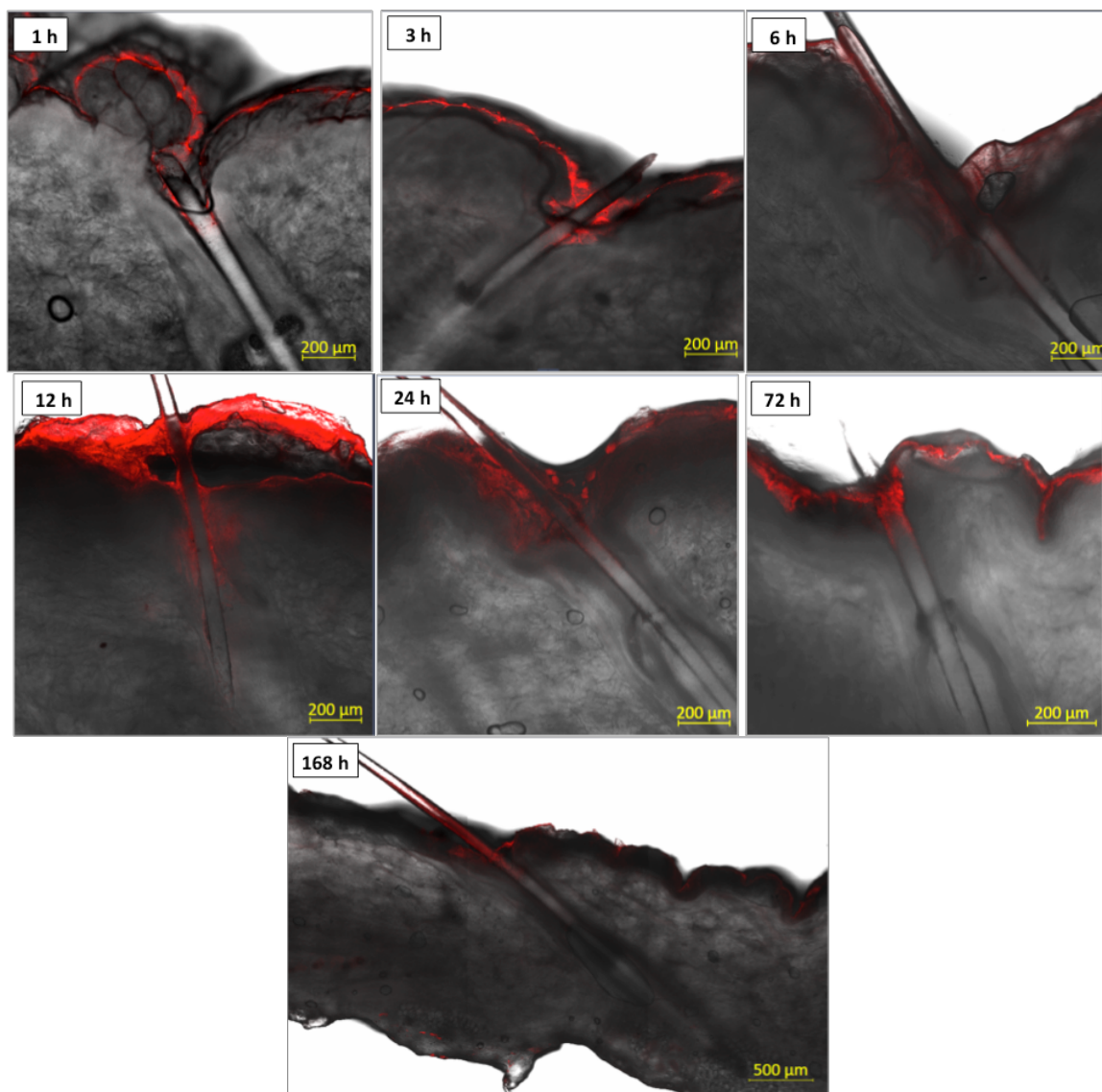
**Figura 4.2.15** Folículo piloso após ensaios *in vitro* de permeação cutânea em células de Franz com aplicação passiva de formulação constituída de carreadores lipídicos nanoestruturados contendo rodamina 6G. Imagens obtidas por microscopia óptica (superior) e confocal (inferior). Escala = 500 µm.

#### 4.2.4.6.1 Estudos de permeação cutânea *ex vivo* com amostra fluorescente

A técnica HFOC, primeiramente descrita na década de 90 (PHILPOTT; GREEN; KEALEY, 1990), utiliza FP isolados mantidos em meio de cultura e vem sendo utilizada nos últimos anos em estudos de endocrinologia, imunologia, neurobiologia, dentre outros. Na área farmacêutica, sua aplicação ocorre principalmente em pesquisas de substâncias para promoção do crescimento capilar (LANGAN et al., 2015). Já a técnica HOSEC, utiliza cultura de pele *ex vivo* e se propõe a servir como modelo alternativo a testes animais em estudos pré-clínicos para eficácia de cosméticos (FRADE et al., 2015). Ambas metodologias demonstram viabilidade dos modelos por mais de 7 dias de ensaio.

No presente estudo, baseando-se na HFOC e na HOSEC, foi desenvolvido um novo método para ensaios de permeação cutânea *ex vivo*, a fim de se observar a penetração de

substâncias fluorescentes na pele. Após experimentos com CLN-R6G, as imagens obtidas por microscopia confocal foram capazes de demonstrar a penetração progressiva da substância através do EC e no interior do FP (Figura 4.2.16).



**Figura 4.2.16** Folículo piloso após ensaios *ex vivo* de permeação cutânea em células de Franz com aplicação passiva de formulação constituída de carreadores lipídicos nanoestruturados contendo rodamina 6G nos tempos 1, 3, 6, 12, 24, 72 e 168 h. Imagens sobrepostas de microscopia óptica e microscopia confocal.

A fluorescência alcançou profundidade máxima na pele após 12 h de ensaio, e ainda pôde ser observada após 7 dias do início do experimento. Amostras de pele coletadas em tempos subsequentes a 12 h apontam que, com o passar do tempo, a fluorescência apresentou uma tendência a ficar em regiões mais superficiais. É possível que, com o tempo, as partículas ou substância fluorescente depositadas mais profundamente passem a ser metabolizadas ou degradadas pelas células do sistema imune (WHO, 2006). Outra possível explicação para esse

fenômeno é a eliminação da substância devido ao crescimento do pelo, que pode chegar até cerca de 0,3 mm por dia (PHILPOTT; GREEN; KEALEY, 1990) ou eliminação do sebo, que, *in vivo*, pode chegar a 0,1 mg/cm<sup>2</sup> de pele/hora (MEIDAN; BONNER; MICHNIAK, 2005).

Tais resultados podem ajudar a elucidar o mecanismo de deposição de substâncias no FP a partir de formulações produzidas, seguida da sua subsequente eliminação. Os dados obtidos a partir desse experimento podem encontrar importância no auxílio da determinação da dose e frequência de aplicação da formulação, a fim de se obter maior eficácia do tratamento proposto.

#### 4.2.5 Conclusão

Foi produzida uma formulação composta por CLN contendo CLO. As nanopartículas apresentaram forma esférica, diâmetro em torno de 180 nm, PDI abaixo de 0,20, potencial zeta negativo e mantiveram-se estáveis por 30 dias sob refrigeração. Avaliações de TEWL e viabilidade celular demonstraram segurança de seu uso, nas condições testadas. Os CLN apresentaram um perfil de liberação sustentada, por mais de cinco dias. Em ensaios de permeação cutânea *in vitro*, os CLN foram capazes de aumentar a retenção folicular do CLO cerca de 4,5 vezes em relação à solução hidroalcoólica de CLO. Em comparação ao creme comercial, esses valores atingiram cerca de 40 vezes. Não foi observado CLO no meio receptor, indicando que o fármaco ficou retido nas camadas da pele. Ensaios de permeação *in vitro* com uma formulação de CLN contendo substância fluorescente ratificou o direcionamento das nanopartículas para o FP. Adicionalmente, foi desenvolvido um método para avaliação da permeação e eliminação da substância fluorescente em ensaios *ex vivo*.

A formulação de CLN-CLO apresentou grande potencial para retenção do CLO no FP. A sua utilização na terapêutica pode permitir maior eficácia e segurança para o manejo de patologias cutâneas inflamatórias.

### 4.3 APLICAÇÃO DE MÉTODOS FÍSICOS A NANOSSISTEMA CONTENDO PROPIONATO DE CLOBETASOL

#### 4.3.1 Introdução

Embora conveniente, a administração de fármacos através da pele enfrenta alguns desafios, como vencer a barreira imposta pelo EC e superar as limitações físico-químicas das substâncias aplicadas. Por esse motivo, nas últimas décadas, tem-se buscado aplicar abordagens como modificações na formulação e aplicação de métodos físicos para alterar, ainda que temporariamente, a estrutura da pele (BORGHETI-CARDOSO et al., 2016).

Entre os métodos físicos, destacam-se a utilização de IV, US e massagem. Tais métodos são de aplicação acessível, uma vez que dispositivos e equipamentos já são utilizados na prática clínica e encontram-se disponíveis comercialmente. O aumento de permeação cutânea pelo uso do IV está relacionado à promoção de hipertermia (SHAHZAD et al., 2015), que pode ser otimizada utilizando-se partículas metálicas como adjuvantes (ZHOU et al., 2014; SHEN et al., 2015). O US, por sua vez, promove a desorganização da estrutura da pele, por meio do processo de cavitação e efeito térmico (POLAT et al., 2011; PARK et al., 2014). Já a massagem estimula a penetração de substâncias através do EC e dos anexos cutâneos devido a um efeito mecânico (PROW et al., 2011; RADTKE et al., 2017). Estes três métodos vêm sendo empregados com sucesso para melhorar a penetração não só de fármacos, como também de partículas através da pele (MERINO; KALIA; GUY, 2003; LADEMANN et al., 2007; GRATIERI et al., 2010; LOPEZ et al., 2011; POLAT et al., 2011; TRAUER et al., 2014; BAROLET; CHRISTIAENS; HAMBLIN, 2016; LEITE-SILVA et al., 2016; PORTANTIOLO LETTNIN et al., 2016; CANAVESE et al., 2018).

Nesse cenário, uma abordagem dupla de aplicação de métodos físicos junto a formulações inovadoras torna-se cada vez mais relevante. Portanto, o estudo deste capítulo teve como objetivo avaliar o comportamento da formulação de CLN-CLO quando aplicados os métodos de IV, US ou massagem, observar o acúmulo folicular do fármaco e elucidar os mecanismos relacionados a cada um dos processos.

#### 4.3.2 Material

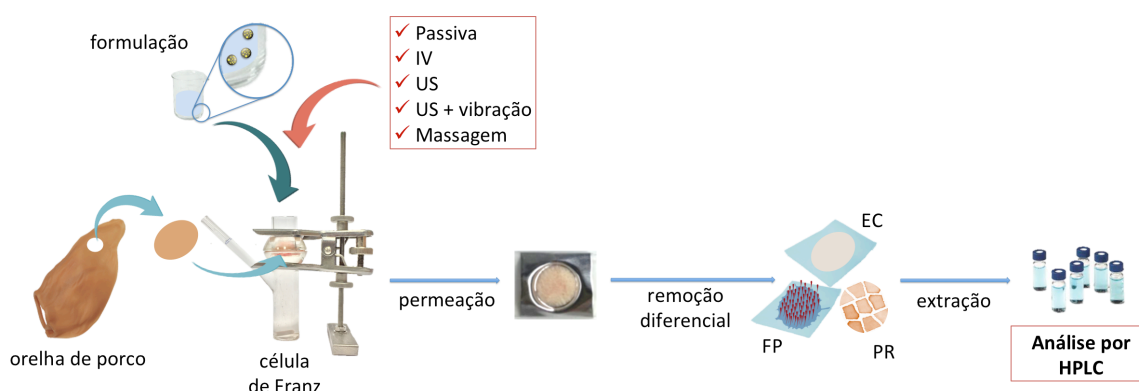
A obtenção do CLO, solventes com grau cromatográfico, material para *tape stripping* diferencial e pele estão descritos na seção 4.1.2.

Os materiais para produção das nanopartículas e execução dos experimentos de permeação cutânea *in vitro* podem ser encontrados na seção 4.2.2.

Tris(acetilacetato)ferro(III) foi obtido da Strem Chemicals, Inc. (Kehl, Alemanha), 1,2-hexadecanediol, ácido oleico, oleilamina e éter benzílico foram obtidos da Sigma-Aldrich (Steinheim, Alemanha).

### 4.3.3 Métodos

A influência de técnicas físicas aplicadas à formulação desenvolvida na permeação e acúmulo do fármaco nos FP foi avaliada de acordo com o esquema representado abaixo (Figura 4.3.1). Para isso, foi utilizada a formulação de CLN-CLO, cujo método de obtenção é descrito na seção 4.2.3.1. Já o ensaio de permeação cutânea *in vitro* encontra-se na seção 4.2.3.5.



**Figura 4.3.1** Esquema representativo do ensaio de permeação cutânea *in vitro*. Comparação entre permeação passiva e ativa. EC: estrato córneo; FP: foliculo piloso; IV: infravermelho; PR: pele remanescente; US: ultrassom.

#### 4.3.3.1 Utilização de IV

##### 4.3.3.1.1 Desenvolvimento da formulação de nanopartículas de magnetita (NPM)

NPM recobertas com ácido oleico foram desenvolvidas para posterior incorporação na formulação de CLN-CLO e aplicação de laser.

Inicialmente, no laboratório *Anorganische Festkörperchemie*, da *Universität des Saarlandes*, Alemanha, foram sintetizadas nanopartículas de magnetita, utilizando-se protocolo de Sun et al., (2004). Para isso, 2 mmol de tris(acetilacetato)ferro(III) e 10 mmol

de 1,2-hexadecanediol foram misturados com 6 mmol de ácido oleico, 6 mmol de oleilamina e 10 mL de éter benzílico. A mistura foi agitada, aquecida a 100°C e degaseificada a vácuo, a fim de tornar o ambiente anidro. Após a mistura ser exposta a ambiente de nitrogênio, a temperatura foi elevada em uma taxa de 3,3°C/min até alcançar 200°C e foi mantida nessa temperatura por 2 h, sob refluxo. Em seguida, a temperatura foi novamente aumentada, na mesma taxa, até atingir ~300°C e mantida por mais 1 h. A solução foi, então, resfriada até temperatura ambiente, finalizando a síntese. Após adição de 25 mL de etanol, a mistura foi levada à centrifugação (500 rcf). O sobrenadante foi desprezado e o precipitado foi disperso em tolueno com 50 µL de ácido oleico e 50 µL de oleilamina. A mistura foi novamente precipitada com etanol e, por fim, redispersa em 20 mL de hexano, resultando em NPM dispersas em solvente orgânico.

Para tornar as nanopartículas dispersíveis em água, adicionou-se uma nova camada de ácido oleico, com protocolo desenvolvido no *Institut für Biopharmazie und Pharmazeutische Technologie*, da *Universität des Saarlandes*, Alemanha. Para tanto, inicialmente, a água ultrapurificada a ser utilizada teve seu pH ajustado para 10,0 com auxílio de NaOH. Em seguida, foi adicionado 1% de ácido oleico. A esta solução, foi adicionada a suspensão de MNP em solvente orgânico, na proporção 1:1. O frasco foi levado ao sonicador Vibra-Cell VC 750 (Sonics, Newtown, Estados Unidos da América) com amplitude de 10%. O frasco aberto foi, em seguida, aquecido a 80°C, com agitação por 4 h em equipamento Thermomixer (Eppendorf, Hamburg, Alemanha) disposto em capela, para evaporação do solvente orgânico. Após resfriamento, a mistura foi lavada com água ultrapurificada, utilizando-se VivaSpin em 10.000 rcf, para retirada do excesso de ácido oleico. No fim do processo, obteve-se NPM em dispersão aquosa.

As NPM foram caracterizadas conforme descrito na próxima seção.

Para realização de experimentos de produção de hipertermia e permeação cutânea *in vitro*, as NPM foram dispersas na formulação de CLN previamente produzida, na concentração final de 1 mg de NPM para cada 1 mL de formulação CLN-CLO.

#### **4.3.3.1.2 Caracterização da formulação de NPM**

A concentração da formulação de NPM foi calculada após processo de liofilização. Para o cálculo, considerou-se a pesagem da formulação inicial e a pesagem do remanescente sólido após secagem.

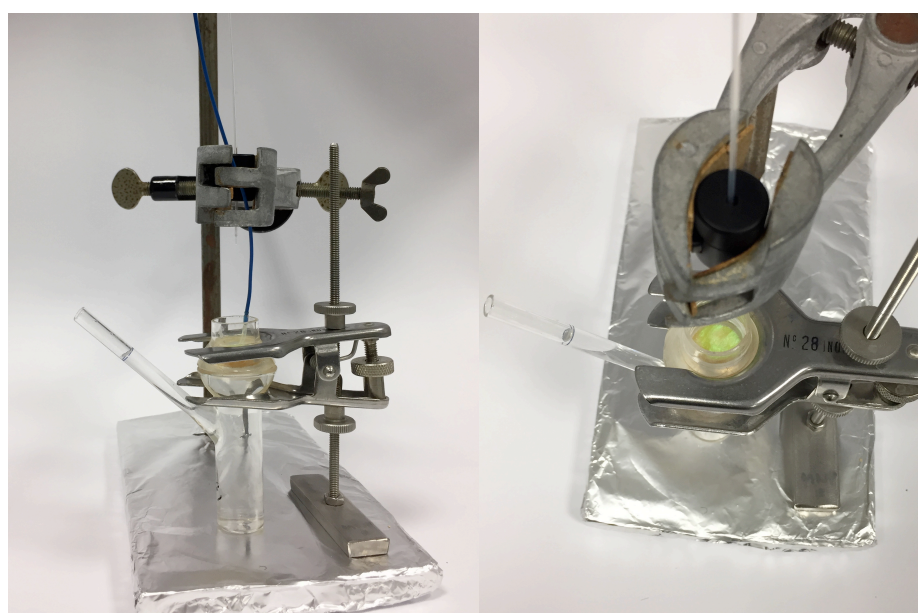
A morfologia das NPM foi avaliada por microscopia eletrônica de transmissão (MET). Uma gota da suspensão foi depositada sobre um *grid* de cobre posicionado sobre uma lâmina. Após o excesso de líquido ser cuidadosamente removido com papel, a amostra foi deixada secar. Para visualização, foi utilizado um microscópio JEM 2011 (JEOL, Freising, Alemanha) e câmera MultiScan Camera Model 794 (Gatan, Pleasanton, CA, Estados Unidos da América). Para obtenção das imagens, utilizou-se 200 keV.

Para determinar a faixa de comprimento de onda de absorção das NPM, a formulação foi diluída 10, e 200 vezes em água e foi realizada sua varredura em um espectrofotômetro Lambda 35 UV/VIS (PerkinElmer, Waltham, Estados Unidos da América). Para efeitos comparativos, analisou-se também um extrato de pele produzido após técnica de *tape stripping* e agitação magnética (seção 4.1.3.4).

#### 4.3.3.1.3 Produção de hipertermia utilizando laser

Experimentos com irradiação foram realizados na *Hochschule für Technik und Wirtschaft des Saarlandes*, Alemanha, com o laser de diodo Medilas D SkinPulse S (Dornier MedTech, Munique, Alemanha), com emissão a 940 nm.

A fibra ótica foi posicionada a 4 cm da pele, uma vez que essa foi a distância necessária para que a luz piloto cobrisse toda a área de pele exposta (1,77 cm<sup>2</sup>) na célula de Franz (Figura 4.3.2).



**Figura 4.3.2** Configuração do laser para irradiação na pele. Direita: vista lateral; Esquerda: vista superior.

O dispositivo LabMax-TOP Laser Power and Energy Meter (Coherent, Santa Clara, Estados Unidos da América) foi usado para medir a atenuação da potência medida na distância determinada.

A avaliação do efeito de aquecimento produzido pelo laser, foi avaliada adicionando-se 500 µL de CLN-CLO ou CLN-CLO + NPM (1 mg/mL) no compartimento doador das células de Franz, e irradiando a amostra com diferentes intensidades por 5 min, em modo contínuo. A elevação da temperatura do sistema foi medida com auxílio de um termômetro óptico AG Fiber Optic Temperature Sensor (Optocon, Dresden, Alemanha) e os dados foram coletados pelo software FoTemp FCT-0139 (Optocon, Dresden, Alemanha). Três diferentes células de Franz com amostras de pele foram usadas para cada medição.

Após determinação das condições ideais de potência e tempo, foram conduzidos experimentos de hipertermia da formulação aplicada sobre a pele. A irradiação do laser foi realizada no início, imediatamente após aplicação da formulação ou no final do protocolo, após 12 h do processo de permeação cutânea *in vitro* (seção 4.2.3.5.3).

#### 4.3.3.2 Utilização de US

Para avaliar o efeito do US na permeação cutânea, foi utilizado um equipamento dermatológico doméstico FC 80 (Beurer, Ulm, Alemanha), com frequência de 5 MHz e intensidade de 1,2 W/cm<sup>2</sup> (Figura 4.3.3).



**Figura 4.3.3** Equipamento doméstico de ultrassom dermatológico.

O equipamento funciona em modo pulsado e foi modificado para que a vibração mecânica extra produzida pelo sistema pudesse ser desativada. Assim, o equipamento pôde



ser utilizado em duas funções distintas: 1) apenas US pulsado; 2) US pulsado com vibração mecânica.

A pele foi disposta sobre papel de filtro embebido com tampão HEPES pH 7,4 e posicionada sobre uma lâmina de vidro. A área da pele foi delimitada por fita adesiva laminada, com círculo de 15 mm de diâmetro (Figura 4.1.2). Após administração de 40  $\mu$ L da formulação de CLN-CLO sobre a pele, o US foi aplicado por 3 minutos, com ou sem vibração. Em seguida, a pele foi submetida ao ensaio de permeação cutânea *in vitro*, conforme descrito na seção 4.2.3.5.3, completando-se o volume de formulação para 500  $\mu$ L.

#### 4.3.3.3 Utilização de massagem

A pele de porco foi delimitada, como descrito na seção anterior. Em seguida, foram aplicados 40  $\mu$ L a formulação de CLN-CLO e realizados movimentos de rotação no sentido horário por 3 minutos, usando sempre o mesmo dedo indicador (Figura 4.3.4).

Findado o tempo de massagem, a pele foi montada na célula de Franz, o volume de formulação foi completado para 500  $\mu$ L e estudos de permeação cutânea *in vitro* foram conduzidos, conforme descrito na seção 4.2.3.5.3.



**Figura 4.3.4** Montagem de pele para avaliação do efeito da massagem em estudos de permeação cutânea *in vitro*.

#### 4.3.3.4 Análise estatística

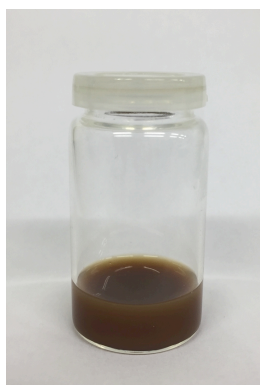
Durante e após a finalização dos experimentos, os dados foram avaliados qualitativa e estatisticamente. Os dados foram expressos como média  $\pm$  desvio padrão das replicatas. O nível de significância foi fixado em  $\alpha = 0,05$ .

#### 4.3.4 Resultados e discussão

##### 4.3.4.1 Utilização de IV

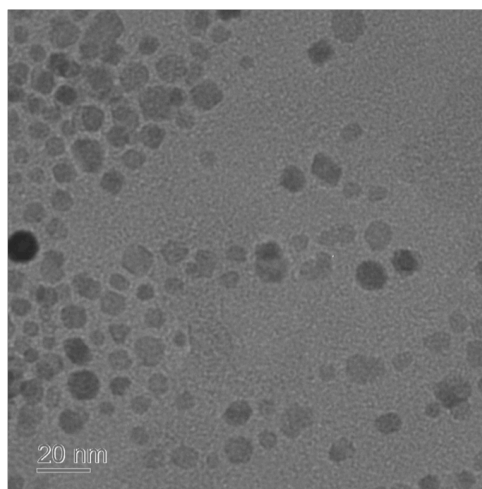
##### 4.3.4.1.1 Caracterização da formulação de NPM

Como produto, foi obtida uma dispersão coloidal estável, opaca e castanha de partículas de magnetita na água, que não pode ser separada por meio de um ímã permanente, o que não influencia o efeito de hipertermia (Figura 4.3.5). A concentração da suspensão foi de 67 mg/g.



**Figura 4.3.5** Aspecto visual da formulação contendo nanopartículas de magnetita.

Imagens de MET demonstraram que foram produzidas nanopartículas de magnetita com tamanho aproximado de 10 nm (Figura 4.3.6). Estudos indicam que partículas de óxido de ferro com tamanho menor que 100 nm e distribuição estreita de tamanho de partícula são ideais para aplicação biomédica, por serem biocompatíveis e apresentarem baixa toxicidade (LAURENT et al., 2008).



**Figura 4.3.6** Nanopartículas de magnetita. Imagens obtidas por microscopia eletrônica de transmissão. Escala = 20 nm.

#### 4.3.4.1.2 Produção de hipertermia utilizando laser

Para causar hipertermia no sistema, foi selecionado o laser Medilas D SkinPulse S, que emite radiação IV no comprimento de onda de 940 nm. O IV-A é capaz de alcançar camadas profundas da pele (PORTANTIOLO LETTNIN et al., 2016) e, portanto, pode causar efeito sobre o FP.

Inicialmente, foi analisada a atenuação da potência do laser, devido à distância entre o dispositivo emissor de IV e a pele. A 4 cm de distância, a potência medida teve metade do valor da potência nominal selecionada no equipamento laser (Tabela 4.3.1).

**Tabela 4.3.1** Medidas de potência do Medilas D SkinPulse S a 4 cm de distância

Potência nominal (W)	Potência medida (W)						Média	DP
	A	B	C	D	E	F		
1.00	0.47	0.46	0.48	0.49	0.56	0.59	0.51	0.05
2.00	0.92	0.95	0.98	1.03	1.02	1.03	0.99	0.05
3.00	1.51	1.51	1.52	1.53	1.53	1.51	1.52	0.01
4.00	2.02	2.04	2.03	2.02	2.05	2.02	2.03	0.01

Em seguida, foi analisado o efeito de aquecimento das formulações. Os experimentos de irradiação demonstraram que um aumento de 1 a 16°C pode ser alcançado, combinando-se diferentes potências e tempos de exposição. Quando a formulação de CLN foi acrescida com NPM a uma concentração de 1 mg/mL, a temperatura foi aumentada entre 2 e 3,3 vezes (Tabela 4.3.2).

**Tabela 4.3.2** Aquecimento produzido após irradiação por laser (940 nm) em diferentes intensidades e por diferentes tempos

Amostra	Potência (W)	$\Delta T$ (°C)				
		1 min	2 min	3 min	4 min	5 min
CLN-CLO	0,5	0,9 ± 0,1	1,3 ± 0,1	1,6 ± 0,2	2,1 ± 0,3	2,4 ± 0,2
	1,0	1,8 ± 0,3	2,7 ± 0,3	3,3 ± 0,2	3,8 ± 0,1	4,3 ± 0,2
	1,5	3,8 ± 0,1	5,0 ± 0,2	6,0 ± 0,1	6,9 ± 0,1	7,6 ± 0,2
CLN-CLO + NPM (1 mg/mL)	0,5	2,9 ± 0,4	4,2 ± 0,2	5,2 ± 0,3	6,0 ± 0,4	6,6 ± 0,3
	1,0	4,4 ± 0,4	6,1 ± 0,2	7,5 ± 0,3	8,3 ± 0,3	9,0 ± 0,4
	1,5	7,9 ± 0,2	10,7 ± 0,5	12,9 ± 0,3	14,3 ± 0,5	15,8 ± 0,2

CLN: carreador lipídico nanoestruturado; CLO: propionato de clobetasol;  
NPM: nanopartículas de magnetita; média ± DP; n = 3.

É observado que exposição contínua da pele a temperaturas elevadas ( $> 48^{\circ}\text{C}$ ) resultam em perda de pelos (WIKRAMANAYAKE et al., 2010). De fato, a termólise destrói as células do FP e esta abordagem tem sido utilizada na fotoepilação a laser, visando à remoção de pêlos indesejados a longo prazo (ZANDI; LUI, 2013). Portanto, para se evitar danos aos FP, o protocolo utilizado deve ser realizado em temperaturas abaixo de  $48^{\circ}\text{C}$ .

A temperatura basal média da pele é  $32^{\circ}\text{C}$  e, após exposição à luz solar, ela alcança cerca de  $36,3 \pm 1,4^{\circ}\text{C}$  (CHO et al., 2008). Estudos indicam que a luz do sol é composta por cerca de 6,8% de UV, 38,9% de luz visível e 54,3% de IV (BAROLET; CHRISTIAENS; HAMBLIN, 2016). Sob irradiação IV, quando a pele atinge  $40^{\circ}\text{C}$ , o corpo começa a produzir repostas termorregulatórias marcantes que incluem infiltração de células inflamatórias na pele (LEE et al., 2006; CHO et al., 2008). Sendo assim, para tratamento de condições inflamatórias, é preferível que o protocolo de aquecimento mantenha-se até  $40^{\circ}\text{C}$ . Adicionalmente, uma vez que a irradiação crônica de IV pode levar a efeitos adversos, como fotoenvelhecimento e carcinogênese, a terapia deve ser limitada em termos de intensidade de irradiação, tempo de exposição e frequência de aplicação (PIAZENA; KELLEHER, 2010). Considerando-se a temperatura basal da pele, as informações acima e os resultados dos experimentos, determinou-se o uso de laser na potência de 1,0 W, por 3 min, resultando em temperaturas finais de cerca de  $35,3 \pm 0,2^{\circ}\text{C}$  para CLN-CLO e  $39,5 \pm 0,3^{\circ}\text{C}$  para CLN-CLO + NPM.

#### **4.3.4.1.3 Estudos de permeação cutânea com aplicação de laser IV**

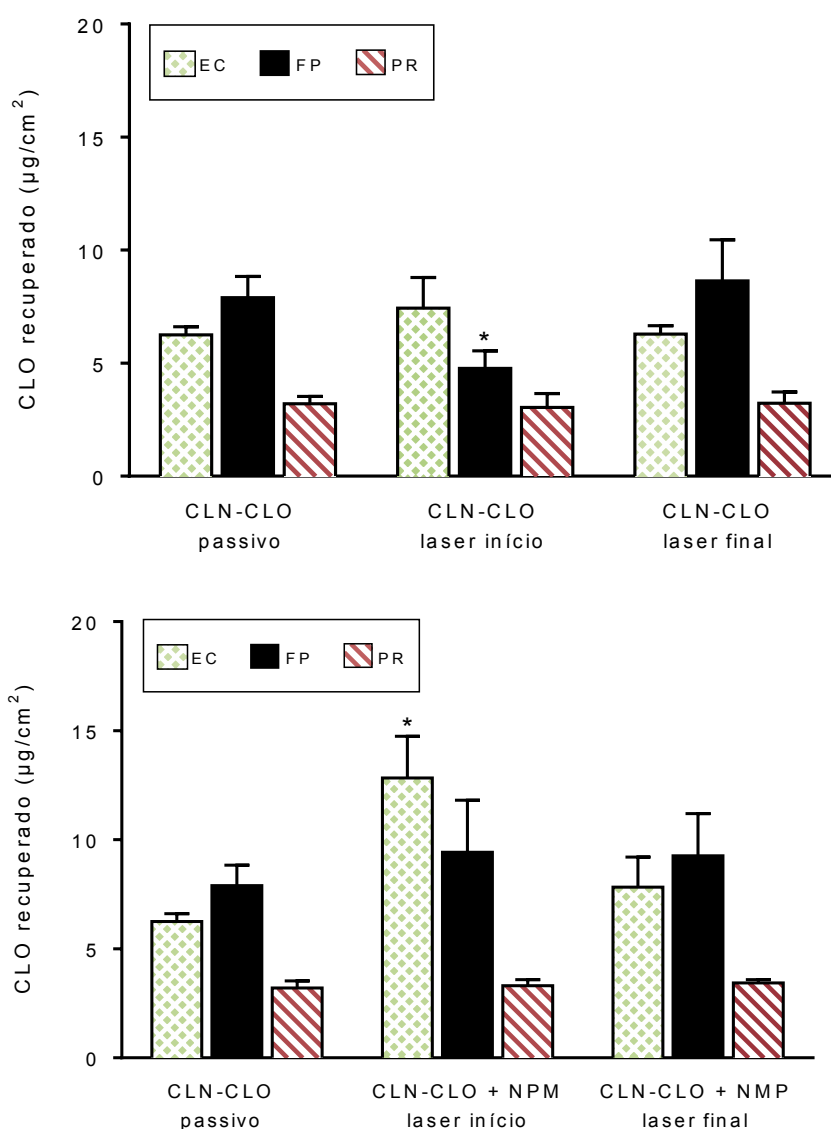
Diversas pesquisas utilizam nanopartículas metálicas para produção de hipertermia no tratamento de câncer (LAURENT et al., 2008; LABOUTA; SCHNEIDER, 2013; ZHOU et al., 2014; SHEN et al., 2015; KANG et al., 2017; KANDASAMY et al., 2018). No presente estudo, a hipertermia direcionada visava diminuir a resistência do conteúdo sebáceo dos FP, aumentando, assim, a penetração folicular dos CLN ou alterando a liberação seletiva do CLO no FP.

Foram testadas tanto a formulação de CLN-CLO quanto CLN-CLO + NPM, utilizando dois protocolos diferentes: 1) irradiação no início, imediatamente após aplicação da formulação e 2) irradiação no final do protocolo, após 12 h do processo de permeação cutânea *in vitro*.

A hipótese utilizada para o protocolo de irradiação após 12 h do ensaio de permeação era a de que o IV pudesse causar maior efeito após a penetração seletiva dos CLN e das NPM nos FP (LADEMANN et al., 2016). Em nenhum dos ensaios, contudo, o protocolo de

aplicação de laser no fim do processo resultou em diferença significativa em relação à aplicação passiva da formulação (Figura 4.3.7).

Contudo, a utilização do laser no início do protocolo, imediatamente após aplicação da formulação, apresentou diferenças estatisticamente significativas em relação à aplicação passiva. Para CLN-CLO, a diferença foi uma diminuição de 0,6 vezes no acúmulo de CLO no FP, em relação à aplicação passiva. Com a utilização da formulação CLN-CLO + NPM, por sua vez, a quantidade de CLO no EC foi de 2,4 vezes. Em nenhum dos experimentos observou-se CLO na solução receptora.



**Figura 4.3.7** Quantificação do propionato de clobetasol (CLO) após ensaios *in vitro* de permeação cutânea em células de Franz modificadas. Comparação entre aplicação passiva de CLN com aplicação de CLN+NPM e laser infravermelho imediatamente após aplicação da formulação ou ao final de 12 h de permeação. Não foi observado CLO na solução receptora. Resultados apresentados como média  $\pm$  DP; n = 6. CLN: carreador lipídico nanoestruturado; EC: estrato córneo; FP: folículo piloso; PR: pele remanescente. \* P < 0,05.

Foram realizadas análises de distribuição de tamanho de partícula e potencial zeta das formulações antes e depois da irradiação. Os resultados demonstraram que não houve diferença nas propriedades estudadas. Portanto, pode-se inferir que o laser não modificou tais características da formulação e os resultados observados devem ser associados ao efeito da irradiação na pele, bem como na modificação da interação entre nanopartículas e pele.

Nos ensaios com CLN-CLO, a elevação de temperatura foi modesta (cerca de  $3,3 \pm 0,2^\circ\text{C}$ ). Estudos indicam que o aquecimento moderado é capaz de levar as glândulas sebáceas a expelirem o sebo, que preenchem os FP, podendo bloqueá-los (MEIDAN; BONNER; MICHNIAK, 2005). Pesquisas sugerem que substâncias hidrofílicas, como manitol e sucrose, tenham sua passagem transfolicular completamente suprimida quando ocorre bloqueio dos FP devido ao conteúdo sebáceo, enquanto substâncias menos hidrofílicas, como hidrocortisona, têm seu fluxo apenas reduzido (MEIDAN, 2010). É importante salientar que, embora os CLN tenham afinidade pelo sebo, diferentemente do que ocorre com moléculas, o mecanismo de penetração de nanopartículas no FP não se dá apenas por afinidade química, partição e difusão, mas está relacionado também à superfície de contato das partículas e do FP (LADEMANN et al., 2007; BLUME-PEYTAVI; VOGT, 2011). Assim, a depender da proximidade do bloqueio sebáceo com a superfície da pele, é possível que as nanopartículas fiquem impedidas de penetrar com mais profundidade. Portanto, um possível bloqueio do FP na porção superior pode ter reduzido a penetração dos CLN de forma significativa.

Já no ensaio com CLN-CLO + MNP, a temperatura mais alta (cerca de  $7,5 \pm 0,3^\circ\text{C}$ ) pode ter promovido uma fluidização muito maior do conteúdo sebáceo, de modo que ele tenha extravasado para o EC e se depositado na superfície da pele (MEIDAN, 2010). Quando na superfície, o sebo se mistura aos lipídios do EC, formando um filme, que se funde tão firmemente ao EC a ponto de não poder ser retirado com lavagem apenas com água, mas necessitar de intervenções mais extremas para ser extraído, como uso de solventes orgânicos (CAMPBELL et al., 2012). Desse modo, os CLN podem ter encontrado ali um meio propício para sua retenção, explicando a maior quantificação de CLO nessa camada da pele.

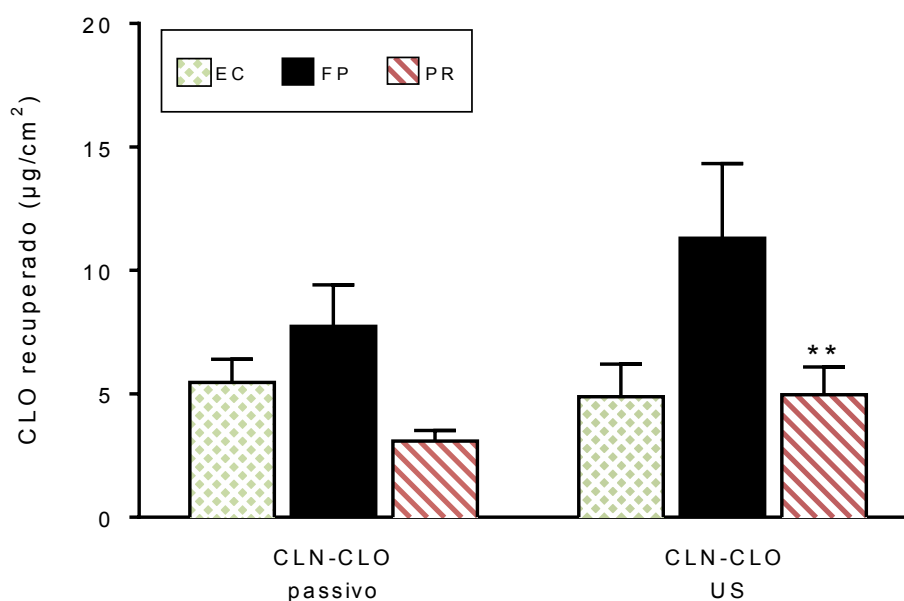
Outro aspecto a se considerar é o efeito do aquecimento sobre o EC. A elevação de temperatura provoca a desorganização na sua estrutura, devido à maior fluidez dos lipídios intercelulares (SHAHZAD et al., 2015). De fato, estudos apontam que, enquanto temperaturas entre  $80$  e  $110^\circ\text{C}$  podem causar desnaturação proteica e danos permanentes à pele, temperaturas entre  $35$  e  $40^\circ\text{C}$  apenas provocam uma transição reversível nos lipídios do EC, tornando-os mais fluidos (BOUWSTRA et al., 1992; GAY et al., 1994; LAWSON et al., 1998; OGISO et al., 1998), e, portanto, mais disponíveis para misturarem-se a substâncias

lipofílicas aplicadas topicamente. Assim, é possível compreender como o aquecimento produzido no experimento com CLN-CLO + NPM favoreceu a retenção das nanopartículas lipídicas no EC.

Embora a utilização de laser de IV não tenha demonstrado benefício em termos de acúmulo de CLO no FP, estudos adicionais com laser merecem ser investigados como adjuvante no tratamento com essa formulação. Alguns ensaios clínicos sugerem eficácia aumentada quando se utiliza luz solar ou calor moderado induzido (37°C) por turbante como adjuvante na terapêutica da alopecia (BEHRENS-WILLIAMS et al., 2001; SEKAR; SRINIVAS; SORNAKUMAR, 2010). Abordagens semelhantes também têm sido utilizadas em outras condições inflamatórias da pele, como psoríase, dermatite atópica, líquen plano, escleroderma etc. (RODRÍGUEZ-GRANADOS et al., 2007). Já pesquisas específicas com IV sugerem que o laser usado como monoterapia ou como adjuvante resulta em crescimento do cabelo em até 94% das áreas tratadas em paciente com alopecia areata (YAMAZAKI et al., 2003; WAIZ et al., 2006; TZUNG et al., 2009; WIKRAMANAYAKE et al., 2012). É possível que, nas condições testadas, o calor gerado alcance os FP, sem causar danos, devido à baixa potência utilizada. Isso pode aumentar a circulação sanguínea e suprir os FP com fatores de crescimento. Além disso, o estresse gerado pode estimular a produção de proteínas *heat shock*, as quais estão envolvidas na regulação da diferenciação celular e parecem desempenhar um papel no ciclo de vida dos FP (HASHIZUME et al., 1997; DESAI et al., 2010). Por fim, a irradiação pode, também, atenuar a ação de marcadores pró-inflamatórios, sendo útil no tratamento de diversas patologias cutâneas relacionadas ao sistema imune (AVCI et al., 2013; BAROLET; CHRISTIAENS; HAMBLIN, 2016; KESHRI et al., 2016). Assim, com estudos adicionais, o uso de IV pode se tornar um adjuvante à terapia de CLN-CLO.

#### **4.3.4.2 Utilização de US**

Foram analisadas amostras de pele após aplicação de CLN-CLO e utilização de US pulsado de alta frequência (com ou sem vibração mecânica) por 3 minutos. Os estudos sem vibração resultaram em retenção do CLO 1,6 vezes na PR, em relação à aplicação passiva da formulação (Figura 4.3.8). Não foi encontrado CLO na solução receptora para nenhuma das amostras testadas.



**Figura 4.3.8** Quantificação do propionato de clobetasol (CLO) após ensaios *in vitro* de permeação cutânea em células de Franz modificadas. Comparação entre aplicação passiva de CLN com aplicação de ultrassom (US). Não foi observado CLO na solução receptora. Resultados apresentados como média  $\pm$  DP; n = 6. CLN: carreador lipídico nanoestruturado; EC: estrato córneo; FP: folículo piloso; PR: pele remanescente. \*\* P < 0,01.

Os principais mecanismos envolvidos no aumento de permeação de substância através da pele e apêndices cutâneos pela utilização de US são cavitação e efeito térmico. A cavitação ocorre quando, a partir de variações de pressão acústica, são formadas bolhas de gás em espaços não preenchidos ou bolhas preexistentes se movem, se contraem, se expandem ou se contorcem devido às oscilações das ondas de US, causando desorganização do EC ou movendo conteúdo nos apêndices. O raio de ressonância da bolha de cavitação é inverso à frequência de US. Assim, em meio aquoso, alta frequência produz bolhas menores, em torno de 1  $\mu$ m, enquanto baixa frequência pode produzir bolhas de até 150  $\mu$ m. Cabe ressaltar que a maioria dos estudos apontam que a cavitação não causa danos à pele, pois tem efeito reversível após as bolhas colapsarem e a pele voltar à sua organização estrutural normal (MERINO; KALIA; GUY, 2003; POLAT et al., 2011; PARK et al., 2014).

Já o efeito térmico ocorre porque a onda de US agita as moléculas do meio, resultando em seu aquecimento. Esse efeito beneficia a permeabilidade da pele por aumentar a energia cinética e a difusividade do fármaco, dilatar estruturas dos anexos cutâneos e aumentar a circulação sanguínea na área tratada. Por outro lado, a exposição excessiva da pele a temperaturas elevadas pode levar a danos cutâneos e, por esse motivo, diversos estudos procuram minimizar o efeito térmico (POLAT et al., 2011; PARK et al., 2014). No presente



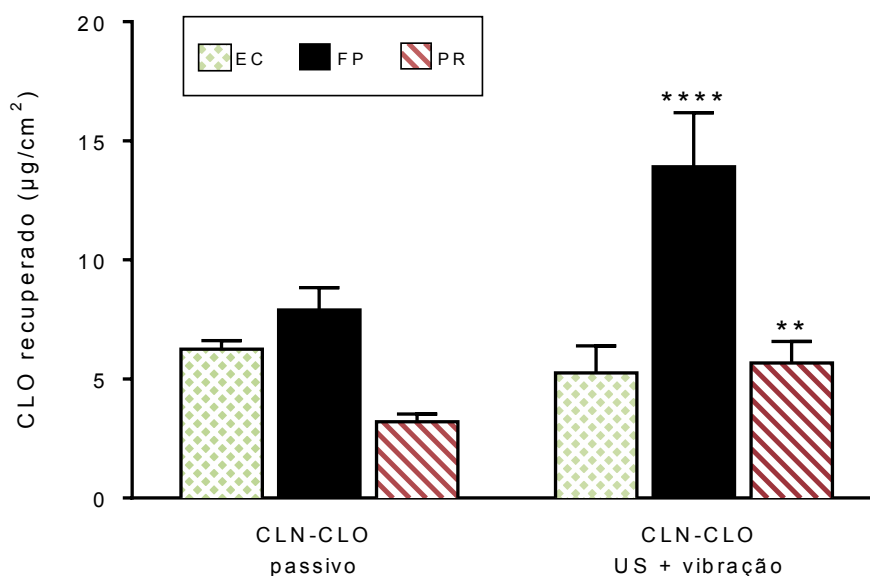
experimento, o US operou de modo pulsado, o que possibilita a dissipação de calor do meio durante o procedimento, e, portanto, o efeito térmico não teve contribuição na penetração do CLO na pele. A temperatura foi monitorada durante a realização dos ensaios.

Embora, nas últimas décadas o US de baixa frequência tenha ganhado destaque, o US de alta frequência começou a ser utilizado na década de 50, para administração tópica de corticosteroides. Somente a partir da década de 90, observou-se que ao se aplicarem frequências mais baixas de US, era possível que o fármaco alcançasse profundidades maiores de penetração e em maior quantidade. Hoje, em linhas gerais, o US de baixa frequência vem sendo mais pesquisado para administração transdérmica de fármacos, enquanto o de alta frequência para penetração local (MERINO; KALIA; GUY, 2003; POLAT et al., 2011).

De fato, estudos utilizando US de baixa frequência reportam a administração transdérmica de corticosterona (MITRAGOTRI; BLANKSCHTEIN; LANGER, 1996), metilprednisolona (SANTOIANI; NINO; CALABRO, 2004) e betametasona (MARUANI et al., 2010). Por sua vez, tratamentos locais com US de alta frequência foram pesquisados com hidrocortisona (GATEV; VATSOV, 1966; SKAUEN; ZENTNER, 1984; KOEKE et al., 2005), dexametasona (DARROW et al., 1999) e diversos outros fármacos (POLAT et al., 2011). A combinação de micro e nanopartículas e US também tem gerado benefício na penetração cutânea de substâncias (EL-KAMEL; AL-FAGIH; ALSARRA, 2008; DAHLAN; ALPAR; MURDAN, 2009; GOU et al., 2009; LOPEZ et al., 2011; CANAVESE et al., 2018).

Especificamente em relação ao CLO, um estudo *in vitro* utilizando US de baixa frequência observou absorção percutânea do fármaco, alcançando a solução receptora (FANG et al., 1999). O presente estudo, por sua vez, utilizou US de alta frequência e obteve aumento significativo de penetração do fármaco na PR (1,6 vezes CLO em relação à aplicação passiva), sem que, contudo, fosse observado fármaco na solução receptora. Adicionalmente, embora não tenha ocorrido diferença estatisticamente significativa de CLO no FP, os resultados apontam uma tendência de aumento na retenção folicular (1,4 vezes CLO em relação à aplicação passiva). Assim, o uso de US pulsado de alta frequência pode ser uma técnica eficaz para tratamentos cutâneos em que se vise retenção do CLO em camadas mais profundas da pele, sem que o fármaco alcance a circulação sistêmica.

Por outro lado, a utilização do US com vibração resultou na retenção do CLO 1,8 vezes no FP e 1,8 vezes na PR, em relação à aplicação passiva da formulação, sem quantificação de CLO na solução receptora (Figura 4.3.9).



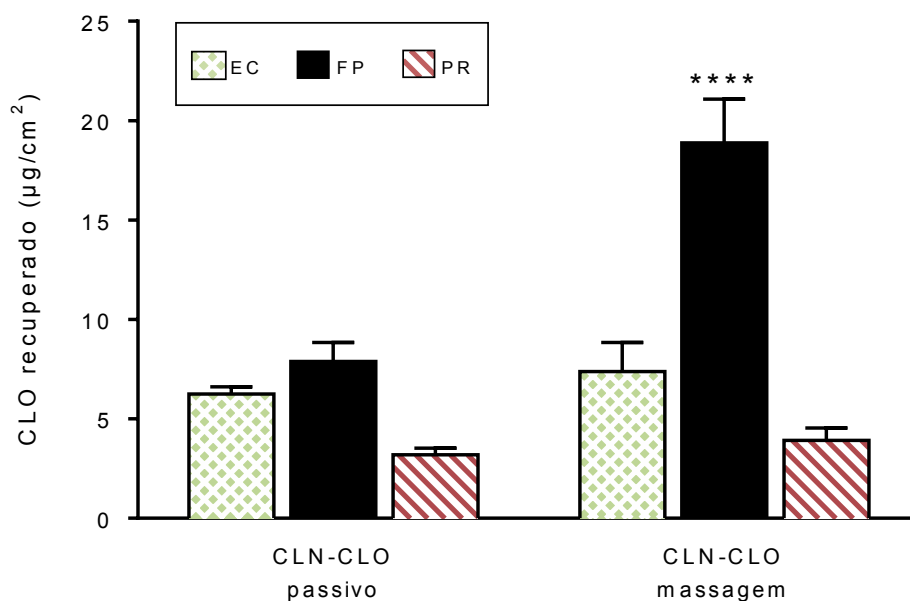
**Figura 4.3.9** Quantificação do propionato de clobetasol (CLO) após ensaios *in vitro* de permeação cutânea em células de Franz modificadas. Comparação entre aplicação passiva de CLN com aplicação de ultrassom (US) + vibração mecânica. Não foi observado CLO na solução receptora. Resultados apresentados como média  $\pm$  DP; n = 6. CLN: carreador lipídico nanoestruturado; EC: estrato córneo; FP: folículo piloso; PR: pele remanescente. \*\* P < 0,01; \*\*\*\* P < 0,001.

O acúmulo de CLO no FP, observado após uso de US com vibração mecânica, pode estar relacionado ao fato de que tal vibração se assemelhe a uma massagem semiautomática, realizada por dispositivo. Os mecanismos envolvidos na aplicação de massagem estão descritos na próxima seção.

Uma vez que o US não causa danos à pele e é considerado uma terapia segura, além de já ser amplamente utilizado na área médica, de fisioterapia e estética, a sua aplicação em pacientes com condições cutâneas inflamatórias é factível e pode melhorar sua terapêutica.

#### 4.3.4.3 Utilização de massagem

O massageamento da formulação de CLN-CLO sobre a pele por 3 minutos resultou em 2,4 vezes CLO no FP, em comparação à aplicação da formulação de forma passiva (Figura 4.3.10). Não foi observado CLO na solução receptora.



**Figura 4.3.10** Quantificação do propionato de clobetasol (CLO) após ensaios *in vitro* de permeação cutânea em células de Franz modificadas. Comparação entre aplicação passiva de CLN com aplicação de massagem. Não foi observado CLO na solução receptora. Resultados apresentados como média  $\pm$  DP; n = 6. CLN: carreador lipídico nanoestruturado; EC: estrato córneo; FP: folículo piloso; PR: pele remanescente. \*\*\*\* P < 0,001.

A massagem tem demonstrado aumentar o acúmulo de nanossistemas nos FP. Estudos com lipossomas com tamanhos entre 100 e 150 nm contendo corante fluorescente avaliaram a aplicação de massagem por 3 minutos. Para isso, uma escova elétrica foi adaptada e suas cerdas foram substituídas por uma esfera metálica. Os experimentos demonstraram penetração no FP com profundidade cerca de cinco vezes maior quando a massagem foi utilizada, em comparação aos grupos controle, sem intervenção (TRAUER et al., 2014). Nanopartículas de sílica recobertas com ouro, na dimensão de 150 nm, também apresentaram penetração no FP de até 1200  $\mu$ m após um dispositivo de massagem ser aplicado por dois ciclos de 30 segundos (MOGENSEN et al., 2018).

Possivelmente, devido à estrutura em ziguezague da cutícula do pelo, as partículas podem se acumular nas cavidades de cerca de 320 nm no pelo de porco e 530 nm no humano. Quando os pelos são movidos por massagem, essas partículas sofrem, então, um efeito de bombeamento para dentro do FP. Sugere-se também que a massagem é semelhante ao movimento fisiológico dos pelos, que crescem e se deslocam, com a movimentação constante do corpo, simulando um efeito de bombeamento. Embora a intensidade seja menor que na massagem, o movimento fisiológico é constante (LADEMANN et al., 2007, 2009). Foi observado ainda que o movimento radial, perpendicular ao eixo do pelo, favorece a

penetração para dentro do FP, enquanto o movimento axial, paralelo ao eixo, inverte a direção do fluxo de partículas (RADTKE et al., 2017). Já Prow e colaboradores (2011) sugerem que o mecanismo de maior retenção está associado também ao fato de que, durante a massagem, os pelos são deslocados lateralmente, aumentando a área disponível da abertura do infundíbulo, com consequente maior penetração de partículas pela invaginação (PROW et al., 2011). Esta hipótese pode ser fundamentada no fato de que a presença do pelo não é necessária para a penetração de partículas pela via folicular (ROLLAND et al., 1993; TOLL et al., 2004; SONAVANE et al., 2008).

A massagem manual é uma técnica acessível, que pode ser realizada pelo próprio paciente, no conforto da sua casa, sem custo adicional ao tratamento. Por outro lado, a massagem produzida por equipamentos apresenta a vantagem de reprodutibilidade na frequência, duração e intensidade dos movimentos, o que pode garantir maior eficácia do tratamento a longo prazo. Sendo assim, ambas intervenções podem ser utilizadas com a finalidade de aumentar a penetração das nanopartículas, com consequente aumento da retenção do fármaco no FP.

#### **4.3.5 Conclusão**

A aplicação de métodos físicos para aumentar a retenção folicular de CLO em experimentos de permeação cutânea *in vitro* com formulação de CLN-CLO foi avaliada. A utilização de irradiação IV não demonstrou nenhum benefício nesse sentido. Após o tratamento com US pulsado de alta frequência, a retenção de CLO aumentou na PR e apresentou uma tendência a aumentar no FP. A adição de vibração ao US resultou em maior acúmulo do fármaco tanto no FP como na PR, em comparação com a exposição passiva de CLN. A aplicação do CLN seguida de massagem resultou em mais que o dobro da quantidade de CLO especificamente no FP, em relação à aplicação passiva de CLN. O CLO não foi observado no meio receptor para nenhum dos tratamentos realizados, indicando que o fármaco foi retido nas camadas da pele.

## 5 CONCLUSÃO GERAL

A formulação de CLN avaliada neste trabalho demonstrou grande potencial para a retenção de CLO nos FP, alcançando cerca de 40 vezes mais fármaco no sítio-alvo que a amostra controle de creme comercial. A eficácia do nanossistema para o direcionamento do fármaco ao FP foi também demonstrada por meio de imagens de microscopia confocal após aplicação *in vitro* de formulação de CLN contendo substância fluorescente. A mesma formulação foi utilizada para demonstrar a penetração e eliminação da substância em estudo *ex vivo* por 7 dias. A combinação da aplicação da formulação de CLN-CLO com a utilização de métodos físicos para aumentar o acúmulo de CLO no FP demonstrou que dentre os métodos avaliados, IV, US e massagem, esta última parece ser a melhor abordagem para aumentar especificamente a retenção folicular do CLO, mais que dobrando a quantidade do fármaco no FP em comparação à aplicação passiva do CLN-CLO. Assim, o uso das estratégias apresentadas pode possibilitar a redução da dose e da frequência de aplicação do medicamento, resultando em maior segurança e eficácia para os pacientes.

## REFERÊNCIAS

- ABDEL-MOTTALEB, M. M.; TRY, C.; PELLEQUER, Y.; LAMPRECHT, A. Nanomedicine strategies for targeting skin inflammation. **Nanomedicine**, v. 9, n. 11, p. 1727–1743, 2014.
- ABRAHAM, L. S.; TORRES, F. N.; AZULAY-ABULAFIA, L. Dermoscopic clues to distinguish trichotillomania from patchy alopecia areata. **Images in Dermatology**, v. 85, n. 5, p. 723–726, 2010.
- ABURAHMA, M. H. Follicular delivery of spironolactone via nanostructured lipid carriers for management of alopecia. **International Journal of Nanomedicine**, p. 5449–5460, 2014.
- AHMAD, W. Alopecia Universalis Associated with a Mutation in the Human hairless Gene. **Science**, v. 279, n. 5351, p. 720–724, 1998.
- ALI, M. S.; ALAM, M. S.; ALAM, N.; ANWER, T.; SAFHI, M. M. A. Accelerated Stability Testing of a Clobetasol Propionate-Loaded Nanoemulsion as per ICH Guidelines. **Scientia Pharmaceutica**, v. 81, n. 4, p. 1089–1100, 2013.
- ANGELO, T.; BARBALHO, G. N.; GELFUSO, G. M.; GRATIERI, T. Minoxidil topical treatment may be more efficient if applied on damp scalp in comparison with dry scalp. **Dermatologic Therapy**, v. 29, n. 5, p. 330–333, 2016.
- ATTAMA, A. A.; MOMOH, M. A.; BUILDERS, P. F. Lipid Nanoparticulate Drug Delivery Systems: A Revolution in Dosage Form Design and Development. In: SEZER, A. D. (Ed.). **Recent Advances in Novel Drug Carrier Systems**. [s.l.] InTech, 2012. p. 107–140.
- AVCI, P.; GUPTA, A.; SADASIVAM, M.; VECCHIO, D.; PAM, Z.; PAM, N.; HAMBLIN, M. R. Low-Level Laser (Light) Therapy (LLLT) in Skin: Stimulating, Healing, Restoring. **Seminars in Cutaneous Medicine and Surgery**, v. 32, p. 41–52, 2013.
- BABITA, K.; KUMAR, V.; RANA, V.; JAIN, S.; TIWARY, A. Thermotropic and Spectroscopic Behavior of Skin: Relationship with Percutaneous Permeation Enhancement. **Current Drug Delivery**, v. 3, n. 1, p. 95–113, 2006.
- BADILLI, U.; AMASYA, G.; ÖZKAN, S.; TARIMCI, N. Simultaneous Determination of Clobetasol Propionate and Calcipotriol in a Novel Fixed Dose Emulgel Formulation by LC-UV. **Chromatographia**, v. 76, n. 3–4, p. 133–140, 2012.
- BADILLI, U.; ŞEN, T.; TARIMCI, N. Microparticulate Based Topical Delivery System of Clobetasol Propionate. **AAPS PharmSciTech**, v. 12, n. 3, p. 949–957, 2011.
- BANKA, N.; MUBKI, T.; BUNAGAN, M. J. K.; MCELWEE, K.; SHAPIRO, J. Frontal fibrosing alopecia: a retrospective clinical review of 62 patients with treatment outcome and long-term follow-up. **International Journal of Dermatology**, v. 53, p. 1324–1330, 2014.
- BANSAL, S.; DESTEFANO, A. Key Elements of Bioanalytical Method Validation for Small Molecules. **The AAPS journal**, v. 9, n. 1, p. E109–E114, 2007.
- BAROLET, D.; CHRISTIAENS, F.; HAMBLIN, M. R. Infrared and skin: Friend or foe. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 155, p. 78–85, 2016.
- BARTH, J. H. Normal hair growth in children. **Pediatric Dermatology**, v. 4, n. 3, p. 173–184, 1987.
- BARUA, S.; MITRAGOTRI, S. Challenges associated with penetration of nanoparticles

across cell and tissue barriers: A review of current status and future prospects. **Nano Today**, v. 9, n. 2, p. 223–243, 2014.

BASKETTER, D.; SAFFORD, B. Skin sensitization quantitative risk assessment: A review of underlying assumptions. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v. 74, p. 105–116, fev. 2016.

BEHRENS-WILLIAMS, S. C.; LEITER, U.; SCHIENER, R.; WEIDMANN, M.; PETER, R. U.; KERSCHER, M. The PUVA-turban as a new option of applying a dilute psoralen solution selectively to the scalp of patients with alopecia areata. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 44, n. 2, p. 248–252, 2001.

BELOQUI, A.; SOLINÍS, M. Á.; RODRÍGUEZ-GASCÓN, A.; ALMEIDA, A. J.; PRÉAT, V. Nanostructured lipid carriers: Promising drug delivery systems for future clinics. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine**, v. 12, n. 1, p. 143–161, 2016.

BENSON, H. Transdermal Drug Delivery: Penetration Enhancement Techniques. **Current Drug Delivery**, v. 2, n. 1, p. 23–33, 2005.

BHATTACHARJEE, S. DLS and zeta potential - What they are and what they are not? **Journal of Controlled Release**, v. 235, p. 337–351, 2016.

BILIA, A. R.; GUCCIONE, C.; ISACCHI, B.; RIGHESCHI, C.; FIRENZUOLI, F.; BERGONZI, M. C. Essential oils loaded in nanosystems: a developing strategy for a successful therapeutic approach. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2014, p. 651593, 2014.

BIRCH, M. P.; MESSENGER, J. F.; MESSENGER, A. G. Hair density, hair diameter and the prevalence of female pattern hair loss. **British Journal of Dermatology**, v. 144, n. 2, p. 297–304, 2001.

BLUME-PEYTAVI, U.; MASSOUDY, L.; PATZELT, A.; LADEMANN, J.; DIETZ, E.; RASULEV, U.; GARCIA BARTELS, N. Follicular and percutaneous penetration pathways of topically applied minoxidil foam. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 76, n. 3, p. 450–453, 2010.

BLUME-PEYTAVI, U.; VOGT, A. Human hair follicle: reservoir function and selective targeting. **British Journal of Dermatology**, v. 165 Suppl, p. 13–17, 2011.

BOLZINGER, M.-A.; BRIANÇON, S.; PELLETIER, J.; CHEVALIER, Y. Penetration of drugs through skin, a complex rate-controlling membrane. **Current Opinion in Colloid & Interface Science**, v. 17, n. 3, p. 156–165, 2012.

BORGHETI-CARDOSO, L. N.; ÂNGELO, T.; M. GELFUSO, G.; F.V. LOPEZ, R.; GRATIERI, T. Topical and transdermal delivery of drug-loaded nano/microsystems with application of physical enhancement techniques. **Current Drug Targets**, v. 17, n. 13, p. 1545–1559, 2016.

BOUWSTRA, J. A.; GOORIS, G. S.; VRIES, M. A. S.; VAN DER SPEK, J. A.; BRAS, W. Structure of human stratum corneum as a function of temperature and hydration: A wide-angle X-ray diffraction study. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 84, n. 3, p. 205–216, 1992.

CAMPBELL, C. S. J.; CONTRERAS-ROJAS, L. R.; DELGADO-CHARRO, M. B.; GUY, R. H. Objective assessment of nanoparticle disposition in mammalian skin after topical exposure. **Journal of Controlled Release**, v. 162, n. 1, p. 201–207, 2012.

CAMPOS, P. M.; PRAÇA, F. S. G.; BENTLEY, M. V. L. B. Quantification of lipoic acid

from skin samples by HPLC using ultraviolet, electrochemical and evaporative light scattering detectors. **Journal of Chromatography B**, v. 1019, p. 66–71, 2016.

CANAVESE, G.; ANCONA, A.; RACCA, L.; CANTA, M.; DUMONTEL, B.; BARBARESCO, F.; LIMONGI, T.; CAUDA, V. Nanoparticle-assisted ultrasound: A special focus on sonodynamic therapy against cancer. **Chemical Engineering Journal**, v. 340, p. 155–172, 2018.

CARRUTHERS, J. A.; AUGUST, P. J.; STAUGHTON, R. C. Observations on the systemic effect of topical clobetasol propionate (Dermovate). **British Medical Journal**, v. 4, n. 5990, p. 203–204, 1975.

CEVC, G.; BLUME, G.; SCHÄTZLEIN, A.; GEBAUER, D.; PAUL, A. The skin: a pathway for systemic treatment with patches and lipid-based agent carriers. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 18, n. 3, p. 349–378, fev. 1996.

CEVC, G.; VIERL, U. Nanotechnology and the transdermal route: A state of the art review and critical appraisal. **Journal of Controlled Release**, v. 141, n. 3, p. 277–299, 2010.

CHANG, S.; KIM, Y.-H.; KIM, Y.-J.; KIM, Y.-W.; MOON, S.; LEE, Y. Y.; JUNG, J. S.; KIM, Y.; JUNG, H.-E.; KIM, T.-J.; CHEONG, T.-C.; MOON, H.-J.; CHO, J.-A.; KIM, H.-R.; HAN, D.; NA, Y.; SEOK, S.-H.; CHO, N.-H.; LEE, H.-C.; NAM, E.-H.; CHO, H.; CHOI, M.; MINATO, N.; SEONG, S.-Y. Taurodeoxycholate Increases the Number of Myeloid-Derived Suppressor Cells That Ameliorate Sepsis in Mice. **Frontiers in Immunology**, v. 9, p. 1–15, 2018.

CHIEREGATO, C.; ZINI, A.; BARBA, A.; MAGNANINI, M.; ROSINA, P. Lichen planopilaris: Report of 30 cases and review of the literature. **International Journal of Dermatology**, v. 42, n. 5, p. 342–345, 2003.

CHO, S.; LEE, M. J.; KIM, M. S.; LEE, S.; KIM, Y. K.; LEE, D. H.; LEE, C. W.; CHO, K. H.; CHUNG, J. H. Infrared plus visible light and heat from natural sunlight participate in the expression of MMPs and type I procollagen as well as infiltration of inflammatory cell in human skin in vivo. **Journal of Dermatological Science**, v. 50, n. 2, p. 123–133, 2008.

COTSARELIS, G.; MILLAR, S. E. Towards a molecular understanding of hair loss and its treatment. **Trends in Molecular Medicine**, v. 7, n. 7, p. 293–301, 2001.

DABBOUE, H.; BUILLES, N.; FROUIN, É.; SCOTT, D.; RAMOS, J.; MARTI-MESTRES, G. Assessing the Impact of Mechanical Damage on Full-Thickness Porcine and Human Skin Using an in Vitro Approach. **BioMed Research International**, v. 2015, 2015.

DAHLAN, A.; ALPAR, H. O.; MURDAN, S. An investigation into the combination of low frequency ultrasound and liposomes on skin permeability. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 379, n. 1, p. 139–142, 8 set. 2009.

DARROW, H.; SCHULTHIES, S.; DRAPER, D.; RICARD, M.; MEASOM, G. J. Serum Dexamethasone Levels after Decadron Phonophoresis. **Journal of Athletic Training**, v. 34, n. 4, p. 338–341, 1999.

DAUM, N.; TSCHEKA, C.; NEUMEYER, A.; SCHNEIDER, M. Novel approaches for drug delivery systems in nanomedicine: Effects of particle design and shape. **Wiley Interdisciplinary Reviews: Nanomedicine and Nanobiotechnology**, v. 4, n. 1, p. 52–65, 2012.

DE PAULA, D.; MARTINS, C. A.; BENTLEY, M. V. L. B. Development and validation of HPLC method for imiquimod determination in skin penetration studies. **Biomedical Chromatography**, v. 22, n. 12, p. 1416–1423, 2008.



- DELOUISE, L. A. Applications of nanotechnology in dermatology. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 132, p. 964–975, 2012.
- DESAI, S.; MAHMOUD, B. H.; BHATIA, A. C.; HAMZAVI, I. H. Paradoxical hypertrichosis after laser therapy: A review. **Dermatologic Surgery**, v. 36, n. 3, p. 291–298, 2010.
- DINGLER, A.; BLUM, R. P.; NIEHUS, H.; MÜLLER, R. H.; GOHLA, S. Solid lipid nanoparticles (SLN/Lipopearls)--a pharmaceutical and cosmetic carrier for the application of vitamin E in dermal products. **Journal of Microencapsulation**, v. 16, n. 6, p. 751–767, 1999.
- DOVER, J. S.; PHILLIPS, T. J.; ARNDT, K. A. Cutaneous effects and therapeutic uses of heat with emphasis on infrared radiation. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 20, n. 2, p. 278–286, 1989.
- DRAKAKI, E.; BORISOVA, E.; MAKROPOULOU, M.; AVRAMOV, L.; SERAFETINIDES, A. A.; ANGELOV, I. Laser induced autofluorescence studies of animal skin used in modeling of human cutaneous tissue spectroscopic measurements. **Skin Research and Technology**, v. 13, n. 4, p. 350–359, 2007.
- EL-KAMEL, A.; AL-FAGIH, I.; ALSARRA, I. Effect of Sonophoresis and Chemical Enhancers on Testosterone Transdermal Delivery from Solid Lipid Microparticles: An In Vitro Study. **Current Drug Delivery**, v. 5, n. 1, p. 20–26, 2008.
- FANG, J. Y.; FANG, C. L.; SUNG, K. C.; CHEN, H. Y. Effect of low frequency ultrasound on the in vitro percutaneous absorption of clobetasol 17-propionate. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 191, n. 1, p. 33–42, 1999.
- FATHI, H. A.; ALLAM, A.; ELSABAHY, M.; FETIH, G.; EL-BADRY, M. Nanostructured lipid carriers for improved oral delivery and prolonged antihyperlipidemic effect of simvastatin. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 162, p. 236–245, 2018.
- FDA. **Reviewer Guidance - Validation of chromatographic methods**. Center for Drug Evaluation and Research, Rockville, Estados Unidos da América, 1994. .
- FELDMAN, S. R. Relative efficacy and interchangeability of various clobetasol propionate vehicles in the management of steroid-responsive dermatoses. **Current Therapeutic Research, Clinical and Experimental**, v. 66, n. 3, p. 154–171, 2005.
- FINNIN, B. C.; MORGAN, T. M. Transdermal penetration enhancers: applications, limitations, and potential. **Journal of pharmaceutical sciences**, v. 88, n. 10, p. 955–958, 1999.
- FONTANA, M. C.; BASTOS, M. O.; BECK, R. C. R. Development and validation of a fast RP-HPLC method for the determination of clobetasol propionate in topical nanocapsule suspensions. **Journal of Chromatographic Science**, v. 48, n. 8, p. 637–640, 2010.
- FRADE, M. A. C.; AGUIAR, A. F. C. L.; LEITE, M. N.; COELHO, E. B.; DE MORETTI ANDRADE, T. A.; GUEDES, F. A.; PASSOS, W. R.; DAS, P. K. Prolonged viability of human organotypic skin explant in culture method (hOSEC). **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 90, n. 3, p. 347–350, 2015.
- FRITSCH, P. O.; GSCHNAIT, F.; KAASERER, G.; BRENNER, W.; CHAIKITTISILPA, S.; HÖNIGSMANN, H.; WOLFF, K. PUVA Suppresses the Proliferative Stimulus Produced by Stripping on Hairless Mice. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 73, n. 2, p. 188–190, 1979.
- FRITSCH, W. C.; STOUGHTON, R. B. The Effect of Temperature and Humidity on the

Penetration of C14 Acetylsalicylic Acid in Excised Human Skin. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 41, n. 5, p. 307–311, 1963.

GANESAN, P.; NARAYANASAMY, D. Lipid nanoparticles: Different preparation techniques, characterization, hurdles, and strategies for the production of solid lipid nanoparticles and nanostructured lipid carriers for oral drug delivery. **Sustainable Chemistry and Pharmacy**, v. 6, p. 37–56, 2017.

GATEV, S.; VATSOV, E. Attempt to treat essential pruritus vulvae and some inflammatory gynecologic diseases with hydrocortisone phonophoresis. **Akusherstvo i ginekologija**, v. 5, n. 2, p. 123–128, 1966.

GAY, C. L.; GUY, R. H.; GOLDEN, G. M.; MAK, V. H. W.; FRANCOEUR, M. L. Characterization of low-temperature (i.e., < 65 °C) lipid transitions in human stratum corneum. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 103, n. 2, p. 233–239, 1994.

GELFUSO, G. M.; GRATIERI, T.; SIMÃO, P. S.; DE FREITAS, L. A. P.; LOPEZ, R. F. V. Chitosan microparticles for sustaining the topical delivery of minoxidil sulphate. **Journal of Microencapsulation**, v. 28, n. 7, p. 650–658, 2011.

GOMES, M. J.; MARTINS, S.; FERREIRA, D.; SEGUNDO, M. A.; REIS, S. Lipid nanoparticles for topical and transdermal application for alopecia treatment: development, physicochemical characterization, and in vitro release and penetration studies. **International Journal of Nanomedicine**, v. 9, p. 1231–1242, 2014.

GOU, M.; WU, L.; YIN, Q.; GUO, Q.; GUO, G.; LIU, J.; ZHAO, X.; WEI, Y.; QIAN, Z. Transdermal Anaesthesia with Lidocaine Nano-Formulation Pretreated with Low-Frequency Ultrasound in Rats Model. **Journal of Nanoscience and Nanotechnology**, v. 9, n. 11, p. 6360–6365, 2009.

GRAFU, I. A.; BADEA, G.; BALACI, T. Synteshis of anticancer vegetable-based lipid nanocarriers. **UPB Scientific Bulletin, Series B: Chemistry and Materials Science**, v. 77, n. 4, p. 247–254, 2015.

GRATIERI, T.; SCHAEFER, U. F.; JING, L.; GAO, M.; KOSTKA, K.-H.; LOPEZ, R. F. V.; SCHNEIDER, M. Penetration of Quantum Dot Particles Through Human Skin. **Journal of Biomedical Nanotechnology**, v. 6, n. 5, p. 586–595, 2010.

HABIF, T. P.; CHAPMAN, M. S.; DINULOS, J. G. H.; ZUG, K. A. **Skin Disease: Diagnosis and Treatment**. 4. ed. [s.l.] Elsevier Health Sciences, 2017.

HAFTEK, M.; TEILLON, M. H.; SCHMITT, D. Stratum corneum, corneodesmosomes and ex vivo percutaneous penetration. **Microscopy Research and Technique**, v. 43, n. 3, p. 242–249, 1998.

HASHIZUME, H.; TOKURA, Y.; TAKIGAWA, M.; PAUS, R. Hair cycle-dependent expression of heat shock proteins in hair follicle epithelium. **International journal of dermatology**, v. 36, p. 587–592, 1997.

HEJRI, A.; KHOSRAVI, A.; GHARANJIG, K.; HEJAZI, M. Optimisation of the formulation of  $\beta$ -carotene loaded nanostructured lipid carriers prepared by solvent diffusion method. **Food Chemistry**, v. 141, n. 1, p. 117–123, 2013.

HENGGE, U. R.; RUZICKA, T.; SCHWARTZ, R. A.; CORK, M. J. Adverse effects of topical glucocorticosteroids. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 54, n. 1, p. 1–18, 2006.

HIGGINS, C. A.; CHRISTIANO, A. M. Regenerative medicine and hair loss: how hair

follicle culture has advanced our understanding of treatment options for androgenetic alopecia. **Regenerative Medicine**, v. 9, n. 1, p. 101–111, 2014.

HSIEH, S. H.; BROCK, M. Lipid components of bile increase the protective effect of conjugated bile salts against antifungal drugs. **Fungal Biology**, v. 121, n. 11, p. 929–938, 2017.

HSU, S.-H.; AL-SUWAYEH, S.; HUNG, C.-F.; TSAI, C.-Y.; FANG, J.-Y. Mechanistic Studies of the Skin Delivery of Lipid Colloid Systems with Different Oil/Fatty Ester Ratios for Both Lipophilic and Hydrophilic Drugs. **Current Nanoscience**, v. 7, n. 2, p. 200–209, 2011.

HU, F. Q.; YUAN, H.; ZHANG, H. H.; FANG, M. Preparation of solid lipid nanoparticles with clobetasol propionate by a novel solvent diffusion method in aqueous system and physicochemical characterization. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 239, n. 1–2, p. 121–128, 2002.

IANNUCCELLI, V.; COPPI, G.; ROMAGNOLI, M.; SERGI, S.; LEO, E. In vivo detection of lipid-based nano- and microparticles in the outermost human stratum corneum by EDX analysis. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 447, n. 1–2, p. 204–212, 2013.

ICH. **Harmonised Tripartite Guideline – Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology - Q2 (R1)**, Genebra, Suíça, 2005. .

JAIN, R.; DE-EKNAMKUL, W. Potential targets in the discovery of new hair growth promoters for androgenic alopecia. **Expert Opinion on Therapeutic Targets**, v. 18, n. 7, p. 787–806, 2014.

JALES, R. D.; NAST, A.; SACONATO, H.; ATALLAH, Á. N.; HIRATA, S. H. Topical treatments for scalp psoriasis. In: JALES, R. D. (Ed.). **Cochrane Database of Systematic Reviews**. Chichester, UK: John Wiley & Sons, Ltd, 2012. p. 1–256.

JOHN, H.; LAUDAHN, G. Clinical Experiences with the topical application of DMSO in orthopedic diseases: evaluation of 4180 cases. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 141, n. 1 Biological Ac, p. 506–516, 1967.

JÖNSSON, E. H.; BENDAS, J.; WEIDNER, K.; WESSBERG, J.; OLAUSSON, H.; WASLING, H. B.; CROY, I. The relation between human hair follicle density and touch perception. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 1–10, 2017.

JUNG, K. E.; GYE, J. W.; PARK, M. K.; PARK, B. C. Comparison of the topical FK506 and clobetasol propionate as first-line therapy in the treatment of early alopecia areata. **International Journal of Dermatology**, v. 56, n. 12, p. 1487–1488, 2017.

KANDASAMY, G.; SUDAME, A.; BHATI, P.; CHAKRABARTY, A.; MAITY, D. Systematic investigations on heating effects of carboxyl-amine functionalized superparamagnetic iron oxide nanoparticles (SPIONs) based ferrofluids for in vitro cancer hyperthermia therapy. **Journal of Molecular Liquids**, v. 256, p. 224–237, 2018.

KANDEKAR, S. G.; DEL RÍO-SANCHO, S.; LAPTEVA, M.; KALIA, Y. N. Selective delivery of adapalene to the human hair follicle under finite dose conditions using polymeric micelle nanocarriers. **Nanoscale**, v. 10, n. 3, p. 1099–1110, 2018.

KANG, H.; ALZOLIBANI, A. A.; OTBERG, N.; SHAPIRO, J. Lichen planopilaris. **Dermatologic Therapy**, v. 21, p. 249–256, 2008.

KANG, T.; LI, F.; BAIK, S.; SHAO, W.; LING, D.; HYEON, T. Surface design of magnetic nanoparticles for stimuli-responsive cancer imaging and therapy. **Biomaterials**, v. 136, p. 98–

114, 2017.

KAZAKEVICH, Y. V. HPLC Theory. In: AHUJA, S.; RASMUSSEN, H. (Ed.). **Separation Science and Technology**. [s.l.] Academic Press, 2007. 8p. 13–44.

KESHRI, G. K.; GUPTA, A.; YADAV, A.; SHARMA, S. K.; SINGH, S. B. Photobiomodulation with pulsed and continuous wave near-infrared laser (810 nm, Al-Ga-As) augments dermal wound healing in immunosuppressed rats. **PLoS ONE**, v. 11, n. 11, p. 1–21, 2016.

KIM, B. Y. S.; RUTKA, J. T.; CHAN, W. C. W. Nanomedicine. **The New England Journal of Medicine**, v. 363, p. 2434–2443, 2010.

KIM, C. S.; DUNCAN, B.; CRERAN, B.; ROTELLO, V. M. Triggered Nanoparticles as Therapeutics. **Nano Today**, v. 8, n. 4, p. 439–447, 2013.

KNORR, F.; LADEMANN, J.; PATZELT, A.; STERRY, W.; BLUME-PEYTAVI, U.; VOGT, A. Follicular transport route - research progress and future perspectives. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 71, n. 2, p. 173–180, 2009.

KOEKE, P. U.; PARIZOTTO, N. A.; CARRINHO, P. M.; SALATE, A. C. B. Comparative study of the efficacy of the topical application of hydrocortisone, therapeutic ultrasound and phonophoresis on the tissue repair process in rat tendons. **Ultrasound in Medicine & Biology**, v. 31, n. 3, p. 345–350, 2005.

KRAGBALLE, K.; MENTER, A.; LEBWOHL, M.; TEBBEY, P. W.; VAN DE KERKHOF, P. C. M. Long-term management of scalp psoriasis: perspectives from the International Psoriasis Council. **The Journal of Dermatological Treatment**, v. 24, n. 3, p. 188–192, 2013.

LABOUTA, H. I.; SCHNEIDER, M. Interaction of inorganic nanoparticles with the skin barrier: Current status and critical review. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine**, v. 9, n. 1, p. 39–54, 2013.

LACARRUBBA, F.; NARDONE, B.; MUSUMECI, M. L.; MICALI, G. Ultrasound evaluation of clobetasol propionate 0.05% foam application in psoriatic and healthy skin: a pilot study. **Dermatologic Therapy**, v. 22, p. S19–S21, 2009.

LADEMANN, J.; KNORR, F.; RICHTER, H.; JUNG, S.; MEINKE, M. C.; RÜHL, E.; ALEXIEV, U.; CALDERON, M.; PATZELT, A. Hair follicles as a target structure for nanoparticles. **Journal of Innovative Optical Health Sciences**, v. 08, n. 04, p. 1530004.1-8, 2015.

LADEMANN, J.; PATZELT, A.; RICHTER, H.; ANTONIOU, C.; STERRY, W.; KNORR, F. Determination of the cuticula thickness of human and porcine hairs and their potential influence on the penetration of nanoparticles into the hair follicles. **Journal of Biomedical Optics**, v. 14, n. 2, p. 021014.1-021014.4, 2009.

LADEMANN, J.; RICHTER, H.; KNORR, F.; PATZELT, A.; DARVIN, M. E.; RÜHL, E.; CHEUNG, K. Y.; LAI, K. K.; RENNEBERG, R.; MAK, W. C. Triggered release of model drug from AuNP-doped BSA nanocarriers in hair follicles using IRA radiation. **Acta Biomaterialia**, v. 30, p. 388–396, 2016.

LADEMANN, J.; RICHTER, H.; TEICHMANN, A.; OTBERG, N.; BLUME-PEYTAVI, U.; LUENGO, J.; WEISS, B.; SCHAEFER, U. F.; LEHR, C.-M.; WEPF, R.; STERRY, W. Nanoparticles - an efficient carrier for drug delivery into the hair follicles. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 66, n. 2, p. 159–164, 2007.

LAJEVARDI, V.; GHODSI, S. Z.; GOODARZI, A.; HEJAZI, P.; AZIZPOUR, A.; BEYGI, S.

- Comparison of systemic mycophenolate mofetil with topical clobetasol in lichen planopilaris: a parallel-group, assessor- and analyst-blinded, randomized controlled trial. **American Journal of Clinical Dermatology**, v. 16, n. 4, p. 303–311, 2015.
- LANGAN, E. a.; PHILPOTT, M. P.; KLOEPPER, J. E.; PAUS, R. Human hair follicle organ culture: Theory, application and perspectives. **Experimental Dermatology**, v. 24, n. 12, p. 903–911, 2015.
- LANGASCO, R.; TANRIVERDI, S. T.; ÖZER, Ö.; ROLDO, M.; COSSU, M.; RASSU, G.; GIUNCHEDI, P.; GAVINI, E. Prolonged skin retention of clobetasol propionate by bio-based microemulsions: a potential tool for scalp psoriasis treatment. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, v. 44, n. 3, p. 398–406, 2018.
- LASHMAR, U. T.; HADGRAFT, J.; THOMAS, N. Topical Application of Penetration Enhancers to the Skin of Nude Mice: a Histopathological Study. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 41, n. 2, p. 118–121, 1989.
- LAURENT, S.; FORGE, D.; PORT, M.; ROCH, A.; ROBIC, C.; VANDER ELST, L.; MULLER, R. N. Magnetic iron oxide nanoparticles: Synthesis, stabilization, vectorization, physicochemical characterizations and biological applications. **Chemical Reviews**, v. 108, n. 6, p. 2064–2110, 2008.
- LAUTERBACH, A.; MÜLLER-GOYMANN, C. C. Applications and limitations of lipid nanoparticles in dermal and transdermal drug delivery via the follicular route. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 97, p. 152–163, 2015.
- LAWSON, E. E.; ANIGBOGU, A. N. C.; WILLIAMS, A. C.; BARRY, B. W.; EDWARDS, H. G. M. Thermally induced molecular disorder in human stratum corneum lipids compared with a model phospholipid system; FT-Raman spectroscopy. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 54, n. 3, p. 543–558, 1998.
- LEE, H. S.; LEE, D. H.; CHO, S.; CHUNG, J. H. Minimal heating dose: A novel biological unit to measure infrared irradiation. **Photodermatology Photoimmunology and Photomedicine**, v. 22, n. 3, p. 148–152, 2006.
- LEE, S. G.; JEONG, J. H.; LEE, K. M.; JEONG, K. H.; YANG, H.; KIM, M.; JUNG, H.; LEE, S. G.; CHOI, Y. W.; LEE, S. G.; CHOI, Y. W. Nanostructured lipid carrier-loaded hyaluronic acid microneedles for controlled dermal delivery of a lipophilic molecule. **International Journal of Nanomedicine**, v. 9, p. 289–299, 2014.
- LEITE-SILVA, V. R.; LIU, D. C.; SANCHEZ, W. Y.; STUDIER, H.; MOHAMMED, Y. H.; HOLMES, A.; BECKER, W.; GRICE, J. E.; BENSON, H. A.; ROBERTS, M. S. Effect of flexing and massage on in vivo human skin penetration and toxicity of zinc oxide nanoparticles. **Nanomedicine**, v. 11, n. 10, p. 1193–1205, 2016.
- LENANE, P.; MACARTHUR, C.; PARKIN, P. C.; KRAFCHIK, B.; DEGROOT, J.; KHAMBALIA, A.; POPE, E. Clobetasol propionate, 0.05%, vs hydrocortisone, 1%, for alopecia areata in children: a randomized clinical trial. **JAMA Dermatology**, v. 150, n. 1, p. 47–50, 2014.
- LEW, B.-L.; SHIN, M.-K.; SIM, W.-Y. Acute diffuse and total alopecia: A new subtype of alopecia areata with a favorable prognosis. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 60, n. 1, p. 85–93, 2009.
- LINGAN, M. A.; SATHALI, A. A. asan; KUMAR, M. R. V.; GOKILA, A. Formulation and evaluation of topical drug delivery system containing clobetasol propionate niosomes. **Scientific Reviews & Chemical Communications**, v. 1, n. 1, p. 7–12, 2011.

- LOHAN, S. B.; ICKEN, N.; TEUTLOFF, C.; SAEIDPOUR, S.; BITTL, R.; LADEMANN, J.; FLEIGE, E.; HAAG, R.; HAAG, S. F.; MEINKE, M. C. Investigation of cutaneous penetration properties of stearic acid loaded to dendritic core-multi-shell (CMS) nanocarriers. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 501, n. 1–2, p. 271–277, 2016.
- LOPEZ, R. F. V.; SETO, J. E.; BLANKSCHTEIN, D.; LANGER, R. Enhancing the transdermal delivery of rigid nanoparticles using the simultaneous application of ultrasound and sodium lauryl sulfate. **Biomaterials**, v. 32, n. 3, p. 933–941, 2011.
- MANOSROI, A.; THATHANG, K.; WERNER, R. G.; SCHUBERT, R.; MANOSROI, J. Stability of luciferase plasmid entrapped in cationic bilayer vesicles. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 356, n. 1–2, p. 291–299, 2008a.
- MANOSROI, A.; THATHANG, K.; WERNER, R. G.; SCHUBERT, R.; PESCHKA-SÜSS, R.; MANOSROI, J. Development of highly stable and low toxic cationic liposomes for gene therapy. **Arzneimittel-Forschung - Drug Research**, v. 58, n. 10, p. 485–492, 2008b.
- MARUANI, A.; BOUCAUD, A.; PERRODEAU, E.; GENDRE, D.; GIRAUDEAU, B.; MACHET, L. Low-frequency ultrasound sonophoresis to increase the efficiency of topical steroids: A pilot randomized study of humans. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 395, n. 1–2, p. 84–90, 2010.
- MATHES, C.; MELERO, A.; CONRAD, P.; VOGT, T.; RIGO, L.; SELZER, D.; PRADO, W. A.; DE ROSSI, C.; GARRIGUES, T. M.; HANSEN, S.; GUTERRES, S. S.; POHLMANN, A. R.; BECK, R. C. R.; LEHR, C. M.; SCHAEFER, U. F. Nanocarriers for optimizing the balance between interfollicular permeation and follicular uptake of topically applied clobetasol to minimize adverse effects. **Journal of Controlled Release**, v. 223, p. 207–214, 2016.
- MATOS, B. N.; REIS, T. A.; GRATIERI, T.; GELFUSO, G. M. Chitosan nanoparticles for targeting and sustaining minoxidil sulphate delivery to hair follicles. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 75, p. 225–229, 2015.
- MAZZOTTA, A.; ESPOSITO, M.; CARBONI, I.; SCHIPANI, C.; CHIMENTI, S. Clobetasol propionate foam 0.05% as a novel topical formulation for plaque-type and scalp psoriasis. **Journal of Dermatological Treatment**, v. 18, n. 2, p. 84–87, 2007.
- MCNAIR, H.; POLITE, L. N. Troubleshooting in High Performance Liquid Chromatography. In: AHUJA, S.; RASMUSSEN, H. (Ed.). **Separation Science and Technology**. [s.l.] Academic Press, 2007. 8p. 459–477.
- MEIDAN, V. M. Methods for quantifying intrafollicular drug delivery: a critical appraisal. **Expert Opinion on Drug Delivery**, v. 7, n. 9, p. 1095–1108, 2010.
- MEIDAN, V. M.; BONNER, M. C.; MICHNIAK, B. B. Transfollicular drug delivery – is it a reality? **International Journal of Pharmaceutics**, v. 306, n. 1–2, p. 1–14, 2005.
- MERINO, G.; KALIA, Y. N.; GUY, R. H. Ultrasound-enhanced transdermal transport. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 92, n. 6, p. 1125–1137, 2003.
- MITRAGOTRI, S.; BLANKSCHTEIN, D.; LANGER, R. Transdermal drug delivery using low-frequency sonophoresis. **Pharmaceutical research**, v. 13, n. 3, p. 411–20, 1996.
- MOGENSEN, M.; BOJESSEN, S.; ISRAELSEN, N. M.; MARIA, M.; JENSEN, M.; PODOLEANU, A.; BANG, O.; HAEDERSDAL, M. Two optical coherence tomography systems detect topical gold nanoshells in hair follicles, sweat ducts and measure epidermis. **Journal of Biophotonics**, v. 11, n. 9, p. e201700348, 2018.

- MONTENEGRO, L.; LAI, F.; OFFERTA, A.; SARPIETRO, M. G.; MICICCHÈ, L.; MACCIONI, A. M.; VALENTI, D.; FADDA, A. M. From nanoemulsions to nanostructured lipid carriers: A relevant development in dermal delivery of drugs and cosmetics. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**, v. 32, p. 100–112, 2016.
- MORENO-RAMÍREZ, D.; MARTÍNEZ, F. C. Frontal fibrosing alopecia: A survey in 16 patients. **Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology**, v. 19, n. 6, p. 700–705, 2005.
- MÜLLER, R. H.; MÄDER, K.; GOHLA, S.; KARSTEN, M.; SVEN, G. Solid lipid nanoparticles (SLN) for controlled drug delivery - a review of the state of the art. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 50, n. 1, p. 161–177, 2000.
- NAAHIDI, S.; JAFARI, M.; EDALAT, F.; RAYMOND, K.; KHADEMHOSEINI, A.; CHEN, P. Biocompatibility of engineered nanoparticles for drug delivery. **Journal of Controlled Release**, v. 166, n. 2, p. 182–194, 2013.
- NAFISI, S.; MAIBACH, H. I. Skin penetration of nanoparticles. In: SHEGOKAR, R.; SOUTO, E. B. (Ed.). **Emerging Nanotechnologies in Immunology**. [s.l.] Elsevier Inc., 2018. p. 47–88.
- NAGAICH, U.; GULATI, N. Nanostructured lipid carriers (NLC) based controlled release topical gel of clobetasol propionate: design and in vivo characterization. **Drug Delivery and Translational Research**, v. 6, n. 3, p. 289–298, 2016.
- 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. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 170, n. 1, p. 33–40, 1998.
- NETZLAFF, F.; KOSTKA, K. H.; LEHR, C. M.; SCHAEFER, U. F. TEWL measurements as a routine method for evaluating the integrity of epidermis sheets in static Franz type diffusion cells in vitro. Limitations shown by transport data testing. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 63, n. 1, p. 44–50, 2006.
- OGISO, T.; HIROTA, T.; IWAKI, M.; HINO, T.; TANINO, T. Effect of temperature on percutaneous absorption of terodiline, and relationship between penetration and fluidity of the stratum corneum lipids. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 176, n. 1, p. 63–72, 1998.
- OLSEN, E. A.; CORNELL, R. C. Topical clobetasol-17-propionate: review of its clinical efficacy and safety. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 15, p. 246–255, 1986.
- OSSADNIK, M.; RICHTER, H.; TEICHMANN, A.; KOCH, S.; SCHÄFER, U.; WEPF, R.; STERRY, W.; LADEMANN, J. Investigation of differences in follicular penetration of particle- and nonparticle-containing emulsions by laser scanning microscopy. **Laser Physics**, v. 16, n. 5, p. 747–750, 2006.
- OTBERG, N.; RICHTER, H.; SCHAEFER, H.; BLUME-PEYTAVI, U.; STERRY, W.; LADEMANN, J. Variations of hair follicle size and distribution in different body sites. **The Journal of Investigative Dermatology**, v. 122, n. 1, p. 14–19, 2004.
- PANONNUMMAL, R.; JAYAKUMAR, R.; SABITHA, M. Comparative anti-psoriatic efficacy studies of clobetasol loaded chitin nanogel and marketed cream. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 96, p. 193–206, 2017.
- PARDEIKE, J.; HOMMOSS, A.; MÜLLER, R. H. Lipid nanoparticles (SLN, NLC) in cosmetic and pharmaceutical dermal products. **International Journal of Pharmaceutics**, v.

366, n. 1–2, p. 170–184, 2009.

PARK, D.; PARK, H.; SEO, J.; LEE, S. Sonophoresis in transdermal drug delivery. **Ultrasonics**, v. 54, n. 1, p. 56–65, 2014.

PASPARAKIS, M.; HAASE, I.; NESTLE, F. O. Mechanisms regulating skin immunity and inflammation. **Nature Reviews Immunology**, v. 14, n. 5, p. 289–301, 2014.

PATEL, H. K.; BAROT, B. S.; PAREJIYA, P. B.; SHELAT, P. K.; SHUKLA, A. Topical delivery of clobetasol propionate loaded microemulsion based gel for effective treatment of vitiligo: ex vivo permeation and skin irritation studies. **Colloids and surfaces. B, Biointerfaces**, v. 102, p. 86–94, 2013.

PATZELT, A.; LADEMANN, J. Drug delivery to hair follicles. **Expert Opinion on Drug Delivery**, v. 10, n. 6, p. 787–797, 2013.

PATZELT, A.; RICHTER, H.; KNORR, F.; SCHÄFER, U.; LEHR, C.-M.; DÄHNE, L.; STERRY, W.; LADEMANN, J. Selective follicular targeting by modification of the particle sizes. **Journal of Controlled Release**, v. 150, n. 1, p. 45–48, 2011.

PEREIRA, M. N.; USHIROBIRA, C. Y.; CUNHA-FILHO, M. S.; GELFUSO, G. M.; GRATIERI, T. Nanotechnology advances for hair loss. **Therapeutic Delivery**, v. 9, n. 8, p. 593–603, 2018.

PHILPOTT, M. P.; GREEN, M. R.; KEALEY, T. Human hair growth in vitro. **Journal of Cell Science**, v. 97, p. 463–471, 1990.

PIAZENA, H.; KELLEHER, D. K. Effects of infrared-A irradiation on skin: Discrepancies in published data highlight the need for an exact consideration of physical and photobiological laws and appropriate experimental settings. **Photochemistry and Photobiology**, v. 86, n. 3, p. 687–705, 2010.

POLAT, B. E.; HART, D.; LANGER, R.; BLANKSCHTEIN, D. Ultrasound-mediated transdermal drug delivery: Mechanisms, scope, and emerging trends. **Journal of Controlled Release**, v. 152, n. 3, p. 330–348, 2011.

PORTANTIOLO LETTNIN, A.; TEIXEIRA SANTOS FIGUEIREDO SALGADO, M.; GONSALEZ CRUZ, C.; MANOEL RODRIGUES DA SILVA-JÚNIOR, F.; CUNHA GONZALEZ, V.; DE SOUZA VOTTO, A. P.; SANTOS TRINDADE, G.; DE MORAES VAZ BATISTA FILGUEIRA, D. Protective effect of infrared-A radiation against damage induced by UVB radiation in the melan-a cell line. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 163, p. 125–132, 2016.

PROW, T. W.; GRICE, J. E.; LIN, L. L.; FAYE, R.; BUTLER, M.; BECKER, W.; WURM, E. M. T.; YOONG, C.; ROBERTSON, T. a; SOYER, H. P.; ROBERTS, M. S. Nanoparticles and microparticles for skin drug delivery. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 63, n. 6, p. 470–491, 2011.

PUGLIA, C.; LAURO, M. R.; OFFERTA, A.; CRASCÌ, L.; MICICCHÈ, L.; PANICO, A. M.; BONINA, F.; PUGLISI, G. Nanostructured Lipid Carriers (NLC) as Vehicles for Topical Administration of Sesamol: In Vitro Percutaneous Absorption Study and Evaluation of Antioxidant Activity. **Planta Medica**, v. 83, n. 5, p. 398–404, 2017.

RABER, A. S. S.; MITTAL, A.; SCHÄFER, J.; BAKOWSKY, U.; REICHRATH, J.; VOGT, T.; SCHAEFER, U. F. F.; HANSEN, S.; LEHR, C.-M. C.-M. Quantification of nanoparticle uptake into hair follicles in pig ear and human forearm. **Journal of Controlled Release**, v. 179, p. 25–32, 2014.



- RÁCZ, E.; GHO, C.; MOORMAN, P. W.; NOORDHOEK HEGT, V.; NEUMANN, H. A. M. Treatment of frontal fibrosing alopecia and lichen planopilaris: A systematic review. **Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology**, v. 27, n. 12, p. 1461–1470, 2013.
- RADTKE, M.; PATZELT, A.; KNORR, F.; LADEMANN, J.; NETZ, R. R. Ratchet effect for nanoparticle transport in hair follicles. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 116, p. 125–130, 2017.
- RAJABI-ESTARABADI, A.; HASANZADEH, H.; TAHERI, A.; FELDMAN, S. R.; FIROOZ, A. The efficacy of short-term clobetasol lotion in the treatment of scalp psoriasis. **Journal of Dermatological Treatment**, v. 29, n. 2, p. 111–115, 2018.
- RAMBLA-ALEGRE, M.; ESTEVE-ROMERO, J.; CARDA-BROCH, S. Is it really necessary to validate an analytical method or not? That is the question. **Journal of Chromatography A**, v. 1232, p. 101–109, 2012.
- RODRÍGUEZ-GRANADOS, M. T.; CARRASCOSA, J. M.; GÁRATE, T.; GÓMEZ-DÍEZ, S.; GUIMARAENS-JUANTORENA, D. Consensus Document on Therapy With Bath Psoralen-UV-A. **Actas Dermo-Sifiliográficas (English Edition)**, v. 98, n. 3, p. 164–170, 2007.
- ROGERS, N. E.; AVRAM, M. R. Medical treatments for male and female pattern hair loss. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 59, n. 4, p. 547–566, 2008.
- ROLLAND, A.; WAGNER, N.; CHATELUS, A.; SHROOT, B.; SCHAEFER, H. Site-specific drug delivery to pilosebaceous structures using polymeric microspheres. **Pharmaceutical research**, v. 10, n. 12, p. 1738–44, 1993.
- ROOK, A. Endocrine Influences on Hair Growth. **British Medical Journal**, v. 1, n. 5435, p. 609–614, 1965.
- ROTHER, M. Clobetasol solution, clobetasol in transfersome (IDEA-068) and the drug-free vehicle (TDT 068) all showed significant treatment effects in a randomised psoriasis plaque study. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 133, p. S163, 2013.
- RYMAN-RASMUSSEN, J. P.; RIVIERE, J. E.; MONTEIRO-RIVIERE, N. A. Penetration of intact skin by quantum dots with diverse physicochemical properties. **Toxicological Sciences**, v. 91, n. 1, p. 159–65, 2006.
- SANTOIANNI, P.; NINO, M.; CALABRO, G. Intradermal drug delivery by low-frequency sonophoresis (25 kHz). **Dermatology Online Journal**, v. 10, n. 2, p. 24, 2004.
- SANTOS, G. A.; ANGELO, T.; ANDRADE, L. M.; SILVA, S. M. M.; MAGALHÃES, P. O.; CUNHA-FILHO, M. The role of formulation and follicular pathway in voriconazole cutaneous delivery from liposomes and nanostructured lipid carriers. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 170, p. 341–346, 2018.
- SCHÄCKE, H.; DÖCKE, W.-D.; ASADULLAH, K. Mechanisms involved in the side effects of glucocorticoids. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 96, p. 23–43, 2002.
- SCHÄFER-KORTING, M.; MEHNERT, W.; KORTING, H.-C. Lipid nanoparticles for improved topical application of drugs for skin diseases. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 59, n. 6, p. 427–443, 2007.
- SCHNEIDER, M.; STRACKE, F.; HANSEN, S.; SCHAEFER, U. F. Nanoparticles and their interactions with the dermal barrier. **Dermato-Endocrinology**, v. 1, n. 4, p. 197–206, 2009.
- SCYPINSKI, S.; ROBERTS, D.; OATES, M.; ETSE, J. Pharmaceutical Research and

- Manufacturers Association Acceptable Analytical Practice for Analytical Method Transfer. **Pharmaceutical Technology**, v. 26, n. 3, p. 84–88, 2002.
- SEKAR, Cs.; SRINIVAS, C.; SORNAKUMAR, L. Turban PUVASOL: An effective treatment in alopecia totalis. **International Journal of Trichology**, v. 2, n. 2, p. 106, 2010.
- SENYIGIT, T.; OZER, O. Corticosteroids for Skin Delivery: Challenges and New Formulation Opportunities. In: QIAN, X. (Ed.). **Glucocorticoids - New Recognition of Our Familiar Friend**. [s.l.] InTech, 2012.
- SENYIĞIT, T.; SONVICO, F.; BARBIERI, S.; OZER, O.; SANTI, P.; COLOMBO, P. Lecithin/chitosan nanoparticles of clobetasol-17-propionate capable of accumulation in pig skin. **Journal of Controlled Release**, v. 142, n. 3, p. 368–373, 2010.
- SEVERINO, P.; PINHO, S. C.; SOUTO, E. B.; SANTANA, M. H. A. Polymorphism, crystallinity and hydrophilic-lipophilic balance of stearic acid and stearic acid-capric/caprylic triglyceride matrices for production of stable nanoparticles. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 86, n. 1, p. 125–130, 2011.
- SHABIR, B. Y. G. Step-by-step analytical methods validation and protocol in the quality system compliance industry. **Journal of Validation Technology**, v. 10, p. 210–218, 2004.
- SHABIR, G. A. Validation of high-performance liquid chromatography methods for pharmaceutical analysis. Understanding the differences and similarities between validation requirements of the US Food and Drug Administration, the US Pharmacopeia and the International Conf. **Journal of Chromatography A**, v. 987, n. 1–2, p. 57–66, 2003.
- SHAH, V. P.; MIDHA, K. K.; FINDLAY, J. W. A.; HILL, H. M.; HULSE, J. D.; MCGILVERAY, I. J.; MCKAY, G.; MILLER, K. J.; PATNAIK, R. N.; POWELL, M. L.; TONELLI, A.; VISWANATHAN, C. T.; YACOBI, A. Bioanalytical method validation - a revisit with a decade of progress. **Pharmaceutical Research**, v. 17, n. 12, p. 1551–1557, 2000.
- SHAHIDI, F.; ZHONG, Y. Lipid oxidation and improving the oxidative stability. **Chemical Society reviews**, v. 39, n. 11, p. 4067–79, 2010.
- SHAHZAD, Y.; LOUW, R.; GERBER, M.; DU PLESSIS, J. Breaching the skin barrier through temperature modulations. **Journal of Controlled Release**, v. 202, p. 1–13, 2015.
- SHAMSHINA, J. L.; ROGERS, R. D. Delivery and targeting of nanoparticles into hair follicles. **Therapeutic Delivery**, v. 5, n. 9, p. 991–1006, 2014.
- SHEN, S.; WANG, S.; ZHENG, R.; ZHU, X.; JIANG, X.; FU, D.; YANG, W. Magnetic nanoparticle clusters for photothermal therapy with near-infrared irradiation. **Biomaterials**, v. 39, p. 67–74, jan. 2015.
- SILVA, L. A. D.; TAVEIRA, S. F.; LIMA, E. M.; MARRETO, R. N. In vitro skin penetration of clobetasol from lipid nanoparticles: drug extraction and quantitation in different skin layers. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 48, n. 4, p. 811–817, 2012.
- SINGH, M. N.; HEMANT, K. S. Y.; RAM, M.; SHIVAKUMAR, H. G. Microencapsulation: A promising technique for controlled drug delivery. **Research in Pharmaceutical Sciences**, v. 5, n. 2, p. 65, 2010.
- SINHA, V. R.; PAL KAUR, M. Permeation enhancers for transdermal drug delivery. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, v. 26, n. 11, p. 1131–1140, 2000.
- SKAUEN, D. M.; ZENTNER, G. M. Phonophoresis. **International Journal of**

**Pharmaceutics**, v. 20, n. 3, p. 235–245, 1984.

SOLEIMANIAN, Y.; GOLI, S. A. H.; VARSHOSAZ, J.; MAESTRELLI, F. Propolis wax nanostructured lipid carrier for delivery of  $\beta$  sitosterol: Effect of formulation variables on physicochemical properties. **Food Chemistry**, v. 260, p. 97–105, 2018a.

SOLEIMANIAN, Y.; GOLI, S. A. H.; VARSHOSAZ, J.; SAHAFI, S. M. Formulation and characterization of novel nanostructured lipid carriers made from beeswax, propolis wax and pomegranate seed oil. **Food Chemistry**, v. 244, p. 83–92, 2018b.

SONAVANE, G.; TOMODA, K.; SANO, A.; OHSHIMA, H.; TERADA, H.; MAKINO, K. In vitro permeation of gold nanoparticles through rat skin and rat intestine: Effect of particle size. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 65, n. 1, p. 1–10, 2008.

SOUZA, L. G.; SILVA, E. J.; MARTINS, A. L. L.; MOTA, M. F.; BRAGA, R. C.; LIMA, E. M.; VALADARES, M. C.; TAVEIRA, S. F.; MARRETO, R. N. Development of topotecan loaded lipid nanoparticles for chemical stabilization and prolonged release. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 79, n. 1, p. 189–196, 2011.

STOTTS, J.; ELY, W. J. Induction of human skin sensitization to ethanol. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 69, n. 2, p. 219–222, ago. 1977.

STRAZZULLA, L. C.; WANG, E. H. C.; AVILA, L.; LO SICCO, K.; BRINSTER, N.; CHRISTIANO, A. M.; SHAPIRO, J. Alopecia areata: An appraisal of new treatment approaches and overview of current therapies. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 78, n. 1, p. 15–24, 2018.

SUN, S.; ZENG, H.; ROBINSON, D. B.; RAOUX, S.; RICE, P. M.; WANG, S. X.; LI, G. Monodisperse  $MFe_2O_4$  ( $M = Fe, Co, Mn$ ) Nanoparticles. **Journal of the American Chemical Society**, v. 126, n. 1, p. 273–279, 2004.

TOLL, R.; JACOBI, U.; RICHTER, H.; LADEMANN, J.; SCHAEFER, H.; BLUME-PEYTAVI, U. Penetration profile of microspheres in follicular targeting of terminal hair follicles. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 123, n. 1, p. 168–176, 2004.

TOSTI, A.; PIRACCINI, B. M.; PAZZAGLIA, M.; VINCENZI, C. Clobetasol propionate 0.05% under occlusion in the treatment of alopecia totalis/universalis. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 49, n. 1, p. 96–98, 2003.

TRAUER, S.; RICHTER, H.; KUNTSCHKE, J.; BÜTTEMEYER, R.; LIEBSCH, M.; LINSCHIED, M.; FAHR, A.; SCHÄFER-KORTING, M.; LADEMANN, J.; PATZELT, A. Influence of massage and occlusion on the ex vivo skin penetration of rigid liposomes and invasomes. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 86, n. 2, p. 301–306, 2014.

TRÜEB, R. M.; DIAS, M. F. R. G. Alopecia Areata: a Comprehensive Review of Pathogenesis and Management. **Clinical Reviews in Allergy and Immunology**, v. 54, n. 1, p. 68–87, 2018.

TSAI, S.-R.; HAMBLIN, M. R. Biological effects and medical applications of infrared radiation. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 170, n. April, p. 197–207, 2017.

TZUNG, T.-Y.; CHEN, C.-Y.; TZUNG, T.-Y.; KAO, F.-J.; CHEN, W.-C. Letter: Infrared Irradiation as an Adjuvant Therapy in Recalcitrant Alopecia Areata. **Dermatologic Surgery**, v. 35, n. 4, p. 721–723, 2009.

UCAK, H.; KANDI, B.; CICEK, D.; HALISDEMIR, N.; DERTLIOĞLU, S. B. The

comparison of treatment with clobetasol propionate 0.05% and topical pimecrolimus 1% treatment in the treatment of alopecia areata. **The Journal of Dermatological Treatment**, v. 23, n. 6, p. 410–420, 2012.

USP. **The United States Pharmacopeia. Clobetasol - Official Monographs USP 37 - NF 32**, 2014. .

VÁVROVÁ, K.; LORENCOVÁ, K.; KLIMENTOVÁ, J.; NOVOTNÝ, J.; HRABÁLEK, A. HPLC method for determination of in vitro delivery through and into porcine skin of adefovir (PMEA). **Journal of Chromatography B**, v. 853, n. 1–2, p. 198–203, 2007.

VENDRAMINI, D. L.; SILVEIRA, B. R. L.; DUQUE-ESTRADA, B.; BOFF, A. L.; SODRÉ, C. T.; PIRMEZ, R. Isolated Body Hair Loss: An Unusual Presentation of Lichen Planopilaris. **Skin Appendage Disorders**, v. 2, n. 3–4, p. 97–99, 2016.

VITORINO, C.; ALMEIDA, A.; SOUSA, J.; LAMARCHE, I.; GOBIN, P.; MARCHAND, S.; COUET, W.; OLIVIER, J.-C.; PAIS, A. Passive and active strategies for transdermal delivery using co-encapsulating nanostructured lipid carriers: in vitro vs. in vivo studies. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 86, n. 2, p. 133–144, 2014.

VOGT, A.; BLUME-PEYTAVI, U. Selective hair therapy: bringing science to the fiction. **Experimental Dermatology**, v. 23, n. 2, p. 83–96, 2014.

WAIZ, M.; SALEH, A. Z.; HAYANI, R.; JUBORY, S. O. Use of the pulsed infrared diode laser (904 nm) in the treatment of alopecia areata. **Journal of Cosmetic and Laser Therapy**, v. 8, n. 1, p. 27–30, 2006.

WHO. **Environmental Health Criteria 235: Dermal Absorption. World Health Organization**. [s.l: s.n.].

WIKRAMANAYAKE, T. C.; ALVAREZ-CONNELLY, E.; SIMON, J.; MAURO, L. M.; GUZMAN, J.; ELGART, G.; SCHACHNER, L. A.; CHEN, J.; PLANO, L. R.; JIMENEZ, J. J. Heat treatment increases the incidence of alopecia areata in the C3H/HeJ mouse model. **Cell Stress and Chaperones**, v. 15, n. 6, p. 985–991, 2010.

WIKRAMANAYAKE, T. C.; RODRIGUEZ, R.; CHOUDHARY, S.; MAURO, L. M.; NOURI, K.; SCHACHNER, L. A.; JIMENEZ, J. J. Effects of the Lexington LaserComb on hair regrowth in the C3H/HeJ mouse model of alopecia areata. **Lasers in Medical Science**, v. 27, n. 2, p. 431–436, 2012.

WILLIAMSON, D.; GONZALEZ, M.; FINLAY, A. The effect of hair loss on quality of life. **Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology**, v. 15, n. 2, p. 137–139, 2001.

XIA, L.; LI, R.; WANG, Y.; LIN, Z.; ZHENG, J.; LI, X.; LU, Q.; ZHANG, J.; JIN, H.; FU, L.; ZHANG, X.; LIU, Y.; YANG, S.; XIAO, F.; GAO, X.-H. Efficacy, safety, and cost-effectiveness of all-trans retinoic acid/Clobetasol Propionate Compound Ointment in the treatment of mild to moderate psoriasis vulgaris: A randomized, single-blind, multicenter clinical trial. **Dermatologic Therapy**, v. 31, n. 5, p. e12632, 2018.

YAMAZAKI, M.; MIURA, Y.; TSUBOI, R.; OGAWA, H. Linear polarized infrared irradiation using Super Lizer<sup>TM</sup> is an effective treatment for multiple-type alopecia areata. **International Journal of Dermatology**, v. 42, n. 9, p. 738–740, 2003.

ZANDI, S.; LUI, H. Long-Term Removal of Unwanted Hair Using Light. **Dermatologic Clinics**, v. 31, n. 1, p. 179–191, 2013.

ZHOU, Z.; SUN, Y.; SHEN, J.; WEI, J.; YU, C.; KONG, B.; LIU, W.; YANG, H.; YANG,

S.; WANG, W. Iron/iron oxide core/shell nanoparticles for magnetic targeting MRI and near-infrared photothermal therapy. **Biomaterials**, v. 35, n. 26, p. 7470–7478, ago. 2014.