

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

Maíra Nunes Pereira

**DESENVOLVIMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE CARREADORES LIPÍDICOS
NANOESTRUTURADOS PARA O TRATAMENTO TÓPICO DA HIDRADENITE
SUPURATIVA**

Brasília
2020

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE

MAÍRA NUNES PEREIRA

**DESENVOLVIMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE CARREADORES LIPÍDICOS
NANOESTRUTURADOS PARA O TRATAMENTO TÓPICO DA HIDRADENITE
SUPURATIVA**

Tese apresentada como requisito parcial para a obtenção do Título de Doutor em Ciências da Saúde pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade de Brasília.

Orientador: Prof. Dr. Guilherme M. Gelfuso

Co-orientador: Prof. Dr. Marcílio Cunha-Filho

Brasília
2020

Maíra Nunes Pereira

DESENVOLVIMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE CARREADORES LIPÍDICOS
NANOESTRUTURADOS PARA O TRATAMENTO TÓPICO DA HIDRADENITE
SUPURATIVA

Tese apresentada como requisito parcial para a obtenção do Título de Doutor em Ciências da Saúde pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade de Brasília.

Aprovada em: 14/08/2020

Banca examinadora

Prof. Dr. Guilherme Martins Gelfuso (Presidente)
Universidade de Brasília

Prof^a. Dr^a. Sandra Elisa Haas
Universidade Federal do Pampa

Prof^a. Dr^a. Pérola de Oliveira Magalhães
Universidade de Brasília

Prof. Dr. Sacha Braun Chaves
Universidade de Brasília

Prof^a. Dr^a. Taís Gratieri (Suplente)
Universidade de Brasília

Dedico esta tese aos meus queridos pais Francisco de Assis Pereira e Maria Goretti Nunes Pereira, e ao meu doce namorado Gustavo Nunes. Vocês são a definição de amor para mim!

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a **Deus**, por todas as oportunidades e bençãos que foram proporcionadas em meu caminho. Obrigada pelo amor infinito e sua grande misericórdia.

A toda minha família, por todo o carinho e incentivo a mim dados para continuar a seguir a minha formação. Em especial aos meus pais, **Francisco de Assis e Maria Goretti Pereira**, e minha irmã, **Marianna Pereira**, pelo amor, incentivo, apoio e por todos os ensinamentos para enfrentar os desafios da vida. Agradeço por serem exemplos em minha vida e por estarem ao meu lado em todas as adversidades.

À minha querida vizinha, **Marisa Landim**, por todo amor e carinho.

Ao meu doce amorzinho, **Gustavo Nunes**, por ser sinal de Deus na minha vidinha. Obrigada por fazer parte dessa minha história como o melhor parceiro, amigo, companheiro e namorado. Eu agradeço por cada detalhe de amor, por acreditar no meu potencial intelectual e profissional e me incentivar para que eu nunca desista.

Aos meus sogrinhos, **Divino de Moraes e Hosana Nunes**, por todo o carinho, conselhos e incentivos. Agradeço também pelos lanchinhos e cafezinhos após longos e exaustivos experimentos.

Ao meu orientador, **Profº. Drº. Guilherme Gelfuso**, por ter confiado na minha capacidade de realização desse trabalho, por sempre ser atencioso e prestativo. Obrigada por me proporcionar desafios que contribuíram de forma positiva para meu crescimento e desenvolvimento acadêmico. Obrigada pela confiança e pelo apoio. Você é um exemplo na minha vida!

Ao **Profº. Drº. Marcílio Cunha-Filho**, meu coorientador, e **Profª. Drª. Taís Gratieri**, agradeço pelos ensinamentos e colaboração científica. Obrigada por confiar na minha capacidade de realizar novos projetos desafiadores, pelas discussões enriquecedoras, oportunidade de escrita de artigos científicos e por toda a generosidade nesse tempo.

Às minhas amigas científicas, **Geisa Barbalho e Seila Tolentino**, agradeço por todo o companheirismo durante o doutorado. Obrigada por toda ajuda, pelas conversas e discussões na pesquisa, pela parceria nos projetos, pelos conselhos e por tornarem essa jornada mais leve. Eu sou imensamente agradecida.

À minha filha de iniciação científica, **Mikaella Costa**, que esteve comigo em vários experimentos me ajudando e acompanhando, agradeço por todo o apoio e por tornar os momentos de confinamento no laboratório mais divertidos e tranquilos.

À minha querida amiga, **Natane Duarte**, por me acompanhar nas mais divertidas viagens para os congressos, pelas conversas científicas e por toda amizade nesse tempo.

Aos colegas e amigos do Laboratório de Tecnologia de Medicamentos, Alimentos e Cosméticos (LTMAC), da Universidade de Brasília, em especial: **Ana Clara**

Brathwaite, Ana Christina Oliveira, Breno Noronha, Camila Oliveira, Felipe Pires, Fernando de Sá, Ludmila Alvin, Luma de Lira, Maíra Texeira, Paula Martins, Ricardo Nunes, Stephania Graziani, Tamara Ângelo, Wanessa Quintão, agradeço pela companhia na realização dos experimentos, nas resenhas científicas e obrigada pelo carinho e suporte nessa minha jornada no laboratório.

Aos meus amigos do curso de farmácia, **Giselly Almeida, Kenzo Watanabe, Larissa Melo, Louise Garcia, Rayane Lacourt**, que estiveram comigo durante toda minha jornada acadêmica. Muito obrigada por cada palavra, pelos incentivos, momentos de descontração e por sempre me ajudarem. Vocês foram uma parte muito importante de tudo isso.

Aos meus amigos, **Daiane dos santos, Diego Elias, Guilherme Nunes, Juliana Ferreira, Luma Filiú, Mariana Souza, Nana Marina, Natália Faria, Pâmela Kikuchi, Rachel Bedatt, Rebeca Aires e Vitória Oliveira** por sempre me incentivarem e tornarem essa jornada mais divertida.

Ao **Laboratório de Microscopia do Instituto de Biologia da Universidade de Brasília** pelo auxílio na obtenção das fotomicrografias eletrônicas.

À **Prof^a. Dr^a. Livia Barreto** pelo suporte na obtenção dos ovos de galinha no estudo de irritação dos nanocarreadores lipídicos.

Ao **Prof^o. Dr^o. Antônio Alonso e Prof^o. Dr^o. Jorge L. V. Anjos** pelos experimentos realizados no Instituto de Física da Universidade Federal do Goiás. Obrigada por todas a generosidade nesse estudo.

À **Universidade de Brasília (UnB)** por me proporcionar apoio para realização deste trabalho.

À **Coordenação de Apoio a Pessoal de Nível Superior (CAPES)** e ao **Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq)** pelas concessões de apoio financeiro ao projeto e bolsa de Doutorado no país.

Ao **Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde (PPGCS)** por todo o suporte nessa jornada, em especial aos membros da coordenação e secretárias.

A **todos** aqueles que eu não mencionei aqui, mas que contribuíram de alguma forma para que este trabalho fosse realizado.

“Não tenham dúvida, a hora chega quando Deus quer. Ajam que Deus agirá!”

Santa Joana d'Arc

RESUMO

A hidradenite supurativa é uma condição inflamatória crônica e debilitante relacionada à obstrução permanente das unidades pilosebáceas da pele, que apresenta poucas opções terapêuticas. O fosfato de clindamicina e a rifampicina são os principais fármacos atualmente utilizados no tratamento dessa doença e são usados em associação devido aos seus mecanismos complementares de ação. No entanto, o uso oral desses antibióticos está associado a efeitos adversos graves. O presente estudo propõe de maneira inédita o uso tópico dessa associação de fármacos encapsulada em carreadores lipídicos nanoestruturados (CLN) e avalia a eficácia do sistema em termos de direcionamento da penetração cutânea desses fármacos para os folículos pilosos, levando-se em consideração a condição sebácea em que a pele afetada pela hidradenite supurativa se encontra. Primeiramente, desenvolveu-se um método analítico por cromatografia líquida de alta eficiência para determinação simultânea dos fármacos na presença dos contaminantes da pele. O método desenvolvido apresentou elevada capacidade de recuperação (> 85%) do fosfato de clindamicina e rifampicina das camadas cutâneas e provou ser adequado considerando todos os parâmetros de validação avaliados. A compatibilidade química entre os fármacos foi demonstrada usando análise térmica combinada com ensaios de infravermelho e raio-X. Por conseguinte, os resultados indicaram compatibilidade entre os fármacos, sugerindo que essas substâncias podem ser usadas em conjunto em uma mesma formulação. Os CLN contendo fosfato de clindamicina e rifampicina foram obtidos e caracterizados quanto ao seu diâmetro hidrodinâmico, índice de polidispersividade, potencial zeta, eficiência de encapsulação, carga dos fármacos, morfologia e pH. Os CLN desenvolvidos apresentaram diâmetro de, aproximadamente, 400 nm e índice de polidispersividade de 0,2 com potencial zeta negativo (- 45 mV). A formulação demonstrou estabilidade relativa por 60 dias sob refrigeração. Não ocorreram alterações morfológicas entre os CLN contendo ou não os fármacos. A eficiência de encapsulação do fosfato de clindamicina foi em torno de 80% e da rifampicina foi de 95%, e o pH da dispersão dos CLN foi 6,5. A liberação dos fármacos foi determinada *in vitro* durante um período de 12 h, utilizando uma membrana de acetato de celulose acoplada a uma célula de difusão do tipo *Franz* modificada. Os CLN reduziram significativamente ($p \leq 0,001$), a taxa de liberação dos fármacos em comparação ao controle com os fármacos livres. A adição de fármacos no CLN não alterou a fluidez dos nanotransportadores e os dados de espectroscopia de ressonância paramagnética eletrônica com marcador de *spin* também mostraram que os CLN interagem com os domínios lipídicos do estrato córneo, sugerindo-se que os fármacos causam instabilidade nos CLN ou aumentam suas afinidades pelos lipídios do estrato córneo. Os ensaios de permeação e penetração foram realizados *in vitro* em pele de orelha de suínos. Em geral, os nanocarreadores lipídicos parecem se acumular nas aberturas dos folículos pilosos, aumentando significativamente em 12 vezes a captação de rifampicina nessas estruturas e criando um depósito de fosfato de clindamicina ainda maior nos folículos pilosos ($38,1 \pm 8,5 \mu\text{g}/\text{cm}^2$), mesmo quando a pele está em uma condição sebácea que mimetiza o que ocorre durante a fisiopatologia da doença. Por fim, os testes de irritação HET-CAM e em epiderme humana reconstruída provaram que a nanoformulação é segura para aplicação tópica. Assim, os CLN que incorporam os antibióticos fosfato de clindamicina e rifampicina parecem ser uma estratégia viável para o tratamento tópico de hidradenite supurativa.

Palavras-chave: Hidradenite supurativa, fosfato de clindamicina, rifampicina, carreadores lipídicos nanoestruturados, pele sebácea.

ABSTRACT

Hidradenitis suppurativa is a chronic and debilitating inflammatory condition related to permanent obstruction of the skin's pilosebaceous units, against which has still available few therapeutic options. Clindamycin phosphate and rifampicin are the main drugs currently used in the treatment of this disease and are used in combination due to their complementary mechanisms of action. However, the oral use of these antibiotics is associated with serious adverse effects. This study proposes in an unprecedented way the topical use of this association of drugs encapsulated in nanostructured lipid carriers (NLC) and evaluates the effectiveness of the system in terms of directing the cutaneous penetration of these drugs to the hair follicles, taking into account the hypersebaceous condition in which the skin affected by hidradenitis suppurativa is found. First, an analytical method by high-performance liquid chromatography was developed for the simultaneous determination of drugs in the presence of skin contaminants. The developed method showed a high recovery capacity (> 85%) of clindamycin phosphate and rifampicin from the skin layers and proved to be adequate considering all validation parameters evaluated. Chemical compatibility between drugs was demonstrated using thermal analysis combined with infrared and X-ray assays. The results indicated compatibility between the drugs, suggesting that these substances can be used together in the same formulation. The NLC containing clindamycin phosphate and rifampicin were obtained and characterized in terms of their hydrodynamic diameter, polydispersity index, zeta potential, entrapped efficiency, drug loading, morphology, and pH. The developed CLN had a diameter of approximately 400 nm and a polydispersity index of 0.2 with negative zeta potential (– 45 mV). The formulation demonstrated relative stability for 60 days under refrigeration. There were no morphological changes between the NLC containing or not the drugs. The entrapped efficiency of clindamycin phosphate was around 80% and of rifampicin was 95%, and the pH of the formulation containing the NLC was 6.5. The release of drugs was determined in vitro for 12 h, using a cellulose acetate membrane coupled to a modified Franz-type diffusion cell. The NLC significantly reduced ($p \leq 0.001$) the rate of drug release compared to the control with free drugs. The addition of drugs in the NLC did not alter the fluidity of the nanocarriers and the spin-labeled electronic paramagnetic resonance spectroscopy data showed that the NLC interact with the lipid domains of the stratum corneum, suggesting that the drugs either cause instability in the NLC or increase their affinity by the stratum corneum lipids. Permeation and penetration tests were performed in vitro on porcine ear skin. In general, lipid nanocarriers appear to accumulate in the openings of hair follicles, significantly increasing the uptake of rifampicin in these structures by 12 times and creating an even greater clindamycin phosphate deposit in hair follicles ($38.1 \pm 8.5 \mu\text{g}/\text{cm}^2$), even when the skin is in a sebaceous condition to mimic what occurs during the pathophysiology of the disease. Finally, HET-CAM irritation tests and reconstructed human epidermis proved that nanoformulation is safe for topical application. Thus, NLC that incorporate the antibiotics clindamycin phosphate and rifampicin appear to be a viable strategy for topical treatment of hidradenitis suppurativa.

Keywords: *Hidradenitis suppurativa, clindamycin phosphate, rifampicin, nanostructured lipid carriers, sebaceous skin.*

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Representação das camadas da pele: epiderme, derme e hipoderme. Fonte: Autoria própria.....	5
Figura 2. Estruturas e camadas da epiderme: camada córnea, camada granulosa, camada espinhosa e camada basal. Fonte: Autoria própria.	6
Figura 3. Esquema representativo das vias de permeação do fármaco por via intercelular (1), via transcelular (2) e por rotas alternativas (3). Fonte: Autoria própria.....	8
Figura 4. Estrutura dos folículos pilosos. Fonte: Adaptado de Pereira et al (2018) (60).....	10
Figura 5. Os diferentes estágios de <i>Hurley</i> . Estágio de <i>Hurley</i> I - lesão inflamada sem cicatrização (a); Estágio de <i>Hurley</i> II - cicatrizes e nódulos inflamados separados por pele clinicamente não afetada (b) e Estágio de <i>Hurley</i> III - lesões coalescentes (nódulos). Fonte: Adaptado de Saunte e Jemec (2017) (81).....	12
Figura 6. Representação do processo patológico da hidradenite supurativa. Desde a ocorrência de inflamação perifolicular seguida da hiperqueratinização, oclusão/dilatação do folículo e ruptura folicular com aumento da inflamação. Fonte: Autoria própria.....	13
Figura 7. Representação do processo inflamatório e crescimento bacteriano na hidradenite supurativa. Fonte: Autoria própria.	14
Figura 8. Fórmula estrutural do fosfato de clindamicina (Massa molecular: 504,96 g/mol).	18
Figura 9. Fórmula estrutural da rifampicina (Massa molecular: 822,97 g/mol).....	19
Figura 10. Estrutura básica dos CLN formados por uma mistura de lipídios líquidos e sólidos. Fonte: Autoria própria.	26
Figura 11. Representação do processo de remoção da pele da orelha de suínos: a orelha fixada em placa de isopor recoberta com papel alumínio (a); a pele da parte superior da orelha de suínos é removida com auxílio de bisturi (b) e (c); pele retirada da orelha de suínos (d) e retirada da camada adiposa, muscular e vasos sanguíneos com auxílio de uma tesoura (e).	30
Figura 12. Representação da técnica de <i>tape-stripping</i> diferencial e os métodos de extração testados para a recuperação de fosfato de clindamicina e rifampicina das camadas da pele: estrato córneo (EC), folículos pilosos (FP) e pele remanescente (PR). Fonte: Autoria própria.....	32
Figura 13. Esquema representativo do preparo dos CLN contendo fosfato de clindamicina (CDM) e rifampicina (RIF). Fonte: Autoria própria.	40
Figura 14. Representação do protocolo de eficiência de encapsulação em duas etapas. Etapa 1 - determinação do fármaco total dos nanocarreadores lipídicos e etapa 2 - determinação do fármaco livre com dispositivo com tamanho de poro definido. Fonte: Autoria própria.	44
Figura 15. Estrutura química do marcador de <i>spin</i> 5-DSA.	45
Figura 16. Representação esquemática do processo de avaliação da influência do fosfato de clindamicina e rifampicina na dinâmica dos lipídios dos CLN na superfície da matriz marcada com <i>spin</i> 5-DSA por meio da técnica de espectroscopia de RPE. Fonte: Autoria própria.	46
Figura 17. Representação esquemática da localização do marcador de <i>spin</i> 5-DSA nos nanocarreadores lipídicos. Fonte: Autoria própria.....	46
Figura 18. Representação ilustrativa das células de difusão do tipo <i>Franz</i> modificadas. Fonte: Autoria própria.	48

Figura 19. Representação esquemática da medição das interações entre o CLN e o estrato córneo por espectroscopia de RPE. Fonte: Autoria própria.	51
Figura 20. Representação esquemática do processamento da pele de suínos: pele convencional (a), folículos obstruídos (b), pele sebácea (c) e folículos obstruídos na pele sebácea (d). Fonte: Autoria própria.	52
Figura 21. Célula de difusão do tipo <i>Franz</i> modificada montada com pele de suínos entre o compartimento doador e receptor (a) e em sistema de banho termostatizado a 32 °C (b).	53
Figura 22. Representação do desenvolvimento da pele sebácea seguindo os passos: 1. Preparação da solução sebácea mimética; 2. Preparação da pele da orelha de suíno e 3. Experimento de teste de desenvolvimento da pele sebácea. Fonte: Autoria própria.	55
Figura 23. Representação da exposição da membrana cório-alantoide por meio da remoção de uma pequena porção da membrana da casca do ovo.	56
Figura 24. Representação esquemática da avaliação <i>in vitro</i> do potencial irritativo dos nanocarreadores lipídicos (HET-CAM). Fonte: Adaptado de Wilson et al. (2015) (189).	57
Figura 25. Representação esquemática da conversão do brometo de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difenil-2H-tetrazólio (MTT) para sal de formazan. Fonte: Autoria própria.	59
Figura 26. Cromatogramas representativos de CLAE do fosfato de clindamicina (CDM), rifampicina (RIF) a 100 µg/mL, estrato córneo (EC), folículos pilosos (FP) e pele remanescente (PR) obtidos seguindo o método estabelecido com detecção UV dos fármacos em diferentes comprimentos de onda (200 nm e 238 nm para CDM e RIF, respectivamente).	63
Figura 27. Superfícies de resposta da extração de fosfato de clindamicina (CDM) em porcentagem obtida de acordo com o tempo de extração e a composição do solvente de extração para as camadas da pele: Estrato córneo (a), folículos pilosos (b) e pele remanescente (c). As áreas escuras mostram as regiões com maior recuperação. <i>Adj r², adjusted r²; Pred r², predicted r² e Adeq prec, Adequate precision.</i>	65
Figura 28. Superfícies de resposta da extração da rifampicina (RIF) em porcentagem obtida de acordo com o tempo de extração e a composição do solvente de extração para as camadas da pele: Estrato córneo (a), folículos pilosos (b) e pele remanescente (c). Superfície de resposta da extração da RIF da pele remanescente em porcentagem obtida de acordo com o tempo magnético de agitação e a composição do solvente (d). As áreas escuras mostram as regiões com maior recuperação. <i>Adj r², adjusted r²; Pred r², predicted r² e Adeq prec, Adequate precision.</i>	67
Figura 29. Seletividade do método para quantificação de fosfato de clindamicina (CDM) e rifampicina (RIF). Quantificação dos fármacos (7,5 µg/mL) isolados e adicionados aos extratos de pele. Análises em termos de áreas dos picos de CDM (a) e RIF (b), além do tempo de retenção de CDM (c) e RIF (d). EC = estrato córneo, FP = folículo piloso e PR = pele remanescente. Análise estatística por ANOVA.	71
Figura 30. Análises de DSC de fosfato de clindamicina (CDM), rifampicina (RIF) e mistura física antes e após o processamento farmacêutico (A1 a A6). Taxa de aquecimento de 5 °C/min de 25 a 300 °C sob atmosfera controlada de nitrogênio com vazão de 50 mL/min.	75

Figura 31. Análises de ciclos de DSC do fosfato de clindamicina (CDM) (a), rifampicina (RIF) (b) e mistura física dos fármacos (c) antes do processamento farmacêutico (A1, A2 e A3). Taxa de aquecimento de 5 °C/min de 25 a 195 °C para CDM e mistura física (A1 e A3) e 25 a 210 °C para RIF (A2) seguida de resfriamento a -40 °C e aquecimento a 300 °C, sob atmosfera controlada de nitrogênio com vazão de 50 mL/min.	76
Figura 32. Primeira derivada de análises termogravimétricas (DrTGA) de fosfato de clindamicina (CDM), rifampicina (RIF) e mistura física antes e após o processamento farmacêutico (A1 a A6) juntamente com a porcentagem de perda de massa em cada pico. Taxa de aquecimento de 10 °C/min de 25 a 400 °C sob atmosfera controlada de nitrogênio com vazão de 50 mL/min.	77
Figura 33. Análise fotovisual obtida por DSC e relacionada a TGA do fosfato de clindamicina (CDM), rifampicina (RIF) e mistura física CDM:RIF (1:1, m/m) (A1, A2 e A3).	79
Figura 34. Espectros FTIR de fosfato de clindamicina (CDM) (a), rifampicina (RIF) (b) e da mistura física (c) antes e após processamento farmacêutico. Uma estrutura química de cada fonte é mostrada e seus respectivos grupos são acordados com cores ou numerados de acordo com a estrutura.	81
Figura 35. Difratogramas XRPD do fosfato de clindamicina (CDM), rifampicina (RIF) e mistura física (antes e após processamento farmacêutico). Velocidade de varredura de 2°/min com incremento de 0,02°/min. Os padrões de difração em ângulos entre 5 e 60° ($\theta - 2\theta$).	84
Figura 36. Imagens capturadas dos CLN desenvolvidos. Na figura, CLN sem os fármacos (a) e CLN com os fármacos (b).	85
Figura 37. Fotomicrografias obtidas por microscopia eletrônica de transmissão dos CLN sem os fármacos, fosfato de clindamicina (CDM) e rifampicina (RIF) (a) e CLN contendo os dois fármacos (CLN CDM-RIF) (b).	89
Figura 38. Espectros de RPE a 298 K com marcador de <i>spin</i> 5-DSA estruturado em CLN sem os fármacos e CLN contendo fosfato de clindamicina e rifampicina (CLN CDM-RIF). Para todos os espectros, a faixa total de varredura do campo magnético foi de 100 G. Os valores médios do parâmetro de divisão hiperfina externa da espectroscopia de RPE ($2A_{//}$) medidos diretamente no espectro de RPE (separação entre linhas tracejadas, em unidades de campo magnético) são indicados, $n = 3$	92
Figura 39. Perfis de liberação de fosfato de clindamicina (CDM) (a) e rifampicina (RIF) (b) a partir dos CLN (CLN CDM-RIF) em comparação ao controle contendo a mesma concentração dos fármacos (solução CDM-RIF), pH 6.5 ($n = 5$). Análise estatística por Teste t <i>Student</i> para amostras independentes.	94
Figura 40. Espectros de RPE a 298 K do marcador de <i>spin</i> 5-DSA incorporado no estrato córneo (EC) tratado com fosfato de clindamicina (CDM), EC tratado com rifampicina (RIF) e EC tratado com CLN sem os fármacos (EC-CLN) (a) e valores médios de $2A_{//}$ das amostras com marcador de <i>spin</i> 5-DSA para todos os sistemas avaliados: CLN sem os fármacos, CLN contendo os dois fármacos (CLN CDM-RIF), EC-CLN e EC tratado com CLN com os fármacos (EC-CLN CDM-RIF), para comparação, o valor de $2A_{//}$ para o EC é indicado por linha tracejada (b). Os valores médios do parâmetro de divisão hiperfina externa do RPE ($2A_{//}$) medidos diretamente no espectro de RPE (separação entre linhas tracejadas, em unidades de campo magnético) são indicados, $n = 3$	97
Figura 41. Fotografia obtida pelo estereomicroscópio após processo de preparo da pele sebácea.	100

- Figura 42. Quantidade de fosfato de clindamicina (CDM) recuperada das camadas da pele ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$) após 24 h de tratamento com os nanocarreadores lipídicos em comparação ao controle contendo os dois fármacos (solução CDM-RIF) seguindo os protocolos de permeação: pele convencional, folículos obstruídos, pele sebácea e folículos obstruídos na pele sebácea. Estrato córneo (a, d), folículo piloso (b, e) e pele remanescente (c, f). Os dados representam médias de 4 determinações \pm desvio-padrão. 101
- Figura 43. Quantidade de rifampicina (RIF) recuperada das camadas da pele ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$) após 24 h de tratamento com os nanocarreadores lipídicos em comparação ao controle contendo os dois fármacos (solução CDM-RIF) seguindo os protocolos de permeação: pele convencional, folículos obstruídos, pele sebácea e folículos obstruídos na pele sebácea. Estrato córneo (a, d), folículo piloso (b, e) e pele remanescente (c, f). Os dados representam médias de 4 determinações \pm desvio-padrão. Análise estatística por Teste t *Student* para amostras independentes (*) $p \leq 0,05$; (**) $p \leq 0,01$; (***) $p \leq 0,001$ e (****) $p \leq 0,0001$ 103
- Figura 44. Representação ilustrativa do tratamento tópico com os nanocarreadores lipídicos contendo fosfato de clindamicina e rifampicina na hidradenite supurativa..... 106
- Figura 45. Sequência ilustrativa das imagens do ensaio de HET-CAM demonstrando o efeito do controle positivo (NaOH 1 mol/L), controle negativo (NaCl 0,9%), solução contendo fosfato de clindamicina (CDM) e rifampicina (RIF) e CLN contendo os dois fármacos (CLN CDM-RIF) na membrana cório-alantoide após 30 s, 2 min e 5 min. 108
- Figura 46. Viabilidade celular em porcentagem (%) a partir de testes de potencial irritativo em epiderme humana reconstruída (Episkin™) após tratamento com solução salina 0,9% (controle negativo), dodecil sulfato de sódio 5% (controle positivo) e CLN contendo fosfato de clindamicina e rifampicina (CLN CDM-RIF). Os dados representam médias de 3 determinações \pm desvio-padrão. 111

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Principais estudos relacionados a terapia de associação da clindamicina e rifampicina.....	22
Tabela 2. Desenho fatorial para avaliação do método de extração do fosfato de clindamicina e rifampicina das camadas da pele (estrato córneo, folículos pilosos e pele remanescente).	33
Tabela 3. Desenho fatorial para obtenção do método de extração da rifampicina da pele remanescente.....	34
Tabela 4. Resumo das composições das amostras contendo ou não os fármacos e procedimento farmacêutico, fosfato de clindamicina (CDM) e rifampicina (RIF).	37
Tabela 5. Quantidade de fosfato de clindamicina (CDM) e rifampicina (RIF) adicionado durante processo de produção dos CLN (CLN CDM-RIF).....	41
Tabela 6. Modelos matemáticos aplicados ao estudo cinético de liberação.	49
Tabela 7. Classificação final dos nanocarreadores lipídicos considerando a pontuação acumulada quanto ao grau de irritabilidade no ensaio de HET-CAM.	58
Tabela 8. Condições cromatográficas utilizadas no desenvolvimento do método CLAE-UV para quantificação simultânea de fosfato de clindamicina (CDM) e rifampicina (RIF).....	61
Tabela 9. Resultados obtidos para recuperação do fosfato de clindamicina (CDM) e rifampicina (RIF) nas camadas da pele: Estrato córneo (EC), folículos pilosos (FP) e pele remanescente (PR).	64
Tabela 10. Resultados obtidos para recuperação da rifampicina (RIF) da pele remanescente (PR).	69
Tabela 11. Resultados dos testes de precisão para determinação de fosfato de clindamicina (CDM) e rifampicina (RIF). CV = coeficiente de variação (%).	73
Tabela 12. Resultados da exatidão para determinação de fosfato de clindamicina (CDM) e rifampicina (RIF) das camadas da pele. CT, concentração teórica; CM, concentração mensurada e CV, coeficiente de variação.	73
Tabela 13. Fotomicrografias e coeficientes de correlação do FTIR do fosfato de clindamicina (CDM), rifampicina (RIF) e mistura física antes e após tratamento farmacêutico. MEV: Microscopia eletrônica de varredura.	82
Tabela 14. Dados da caracterização dos CLN. Para cada CLN: diâmetro hidrodinâmico; índice de polidispersividade (Pdl); potencial zeta; eficiência de encapsulação; carga dos fármacos e pH. O CLN CDM-RIF 1 corresponde a 4 mg de cada fármaco; CLN CDM-RIF 2, 6 mg de cada fármaco e CLN CDM-RIF 3, 8 mg de cada fármaco - fosfato de clindamicina (CDM) e rifampicina (RIF) (n = 3).....	86
Tabela 15. Diâmetro hidrodinâmico (nm), índice de polidispersividade, potencial zeta (mV), eficiência de encapsulação (%). pH e imagens dos CLN contendo fosfato de clindamicina (CDM) e rifampicina (RIF) (CLN CDM-RIF) armazenados a 5 ± 3 °C nos dias 0, 7, 15, 30 e 60.	90
Tabela 16. Valores de r ² encontrados nos diferentes modelos de cinética de liberação para os nanocarreadores lipídicos. CDM = fosfato de clindamicina e RIF = rifampicina.	95
Tabela 17. Valores do fator de direcionamento folicular para o fosfato de clindamicina (CDM) e rifampicina (RIF) da solução contendo CDM e RIF	

(Solução CDM-RIF) e nanocarreadores lipídicos contendo os dois fármacos (CLN CDM-RIF) nos modelos de pele convencional e pele sebácea.	105
Tabela 18. Classificação da irritabilidade das formulações testadas, de acordo com a escala acumulativa. CDM = fosfato de clindamicina, RIF = rifampicina e CLN = carreadores lipídicos nanoestruturados.	109

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

ANOVA	Análise de variância
ATR-FTIR	Espectroscopia de infravermelho com transformada de <i>Fourier</i> usando reflectância total atenuada
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência
CLN	Carreadores lipídicos nanoestruturados
DrTG	Primeira derivada da termogravimetria
DSC	Calorimetria de varredura diferencial
HET-CAM	<i>Hens Egg Test-Chorion Allantoic Membrane</i>
ICH	<i>International Conference on Harmonization</i>
IL	Interleucina
LD	Limite de detecção
LQ	Limite de quantificação
RPE	Espectroscopia de ressonância paramagnética eletrônica
TGA	Termogravimetria
TNF	Fator de necrose tumoral
UV	Ultravioleta
XRPD	Difração de Raio X do Pó

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
2. OBJETIVOS	3
2.1 Objetivo geral	3
2.2 Objetivos específicos	3
3. REVISÃO DA LITERATURA	5
3.1 Anatofisiologia da pele	5
3.1.1 <i>Rotas de permeação de fármacos através da pele</i>	7
3.2 Folículos Pilosos e doenças associadas	9
3.3 Hidradenite supurativa	11
3.3.1 <i>Microbiologia na hidradenite supurativa</i>	14
3.3.2 <i>Tratamento da hidradenite supurativa</i>	16
3.3.2.1 <i>Antibioticoterapia</i>	17
3.3.2.1.1 <i>Clindamicina</i>	17
3.3.2.1.2 <i>Rifampicina</i>	19
3.3.2.1.3 <i>Associação de clindamicina e rifampicina</i>	20
3.4 Nanotecnologia	24
3.4.1 <i>Nanossistemas lipídicos</i>	25
4. MATERIAL E MÉTODOS	29
4.1 Material	29
4.1.1 <i>Obtenção da pele de suínos</i>	29
4.2 Preparação da solução estoque	30
4.3 Padronização e validação do método analítico por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)	30
4.3.1 <i>Condições cromatográficas</i>	31
4.3.2 <i>Otimização da extração dos fármacos das camadas da pele de suínos</i>	31
4.3.3 <i>Validação do método</i>	34
4.3.3.1 <i>Seletividade</i>	34
4.3.3.2 <i>Linearidade</i>	35
4.3.3.3 <i>LD e LQ</i>	35
4.3.3.4 <i>Precisão</i>	36
4.3.3.5 <i>Exatidão</i>	36
4.4 Estudos de compatibilidade entre fosfato de clindamicina e rifampicina	37
4.4.1 <i>Preparo das amostras</i>	37
4.4.2 <i>Análise térmica</i>	38

4.4.2.1 Calorimetria de varredura diferencial (DSC).....	38
4.4.2.2 Análise termogravimétrica (TGA)	38
4.4.3 Espectroscopia no Infravermelho com Transformada de Fourier e Refletância Total Atenuada (ATR-FTIR)	38
4.4.4 Difração de raios X do pó.....	39
4.4.5 Análises morfológicas.....	39
4.5 Preparação de uma solução de fosfato de clindamicina e rifampicina	39
4.6 Desenvolvimento e caracterização dos CLN contendo fosfato de clindamicina e rifampicina	40
4.6.1 Obtenção das formulações.....	40
4.6.2 Caracterização dos nanocarreadores lipídicos.....	41
4.6.2.1 Diâmetro hidrodinâmico e índice de polidispersividade.....	41
4.6.2.2 Potencial zeta.....	41
4.6.2.3 pH.....	42
4.6.2.4 Morfologia.....	42
4.6.2.5 Processo de recuperação dos fármacos	42
4.6.2.6 Eficiência de encapsulação	43
4.6.2.7 Carga dos fármacos	44
4.7 Determinação da influência do fosfato de clindamicina e rifampicina na dinâmica dos lipídios do CLN	45
4.8 Estudos de estabilidade	47
4.9 Estudos <i>in vitro</i> de liberação de fosfato de clindamicina e rifampicina a partir dos nanocarreadores lipídicos	47
4.10 Ensaio <i>in vitro</i> de penetração cutânea	50
4.10.1 Determinação das interações entre CLN e o estrato córneo.....	50
4.10.2 Avaliação do perfil de permeação e penetração cutânea.....	51
4.10.2.1 Experimentos em pele convencional.....	51
4.10.2.2 Experimentos em pele sebácea	53
4.11 Avaliação <i>in vitro</i> do potencial irritativo dos nanocarreadores lipídicos	55
4.11.1 Ensaio <i>in vitro</i> em membrana cório-alantoide de ovos de galinha embrionados (HET-CAM).....	56
4.11.2 Ensaio <i>in vitro</i> de irritação em epiderme humana reconstruída.....	58
4.12 Análise estatística	59
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	60
5.1 Estabelecimento das condições cromatográficas.....	60
5.2 Desenvolvimento do processo de extração dos fármacos retidos nas camadas da pele	63

5.3 Validação do método analítico	70
5.4 Estudos de compatibilidade entre fosfato de clindamicina e rifampicina	74
5.5 Obtenção e caracterização dos nanocarreadores lipídicos	85
5.6 Análise morfológica	88
5.7 Estudo de estabilidade dos nanocarreadores lipídicos	89
5.8 Dinâmica molecular dos nanocarreadores lipídicos	91
5.9 Ensaios <i>in vitro</i> de liberação de fosfato de clindamicina e rifampicina a partir dos nanocarreadores lipídicos	93
5.10 Estudos <i>in vitro</i> de permeação e penetração cutânea	96
5.10.1 Interações dos CLN com o estrato córneo	96
5.10.2 Ensaios <i>in vitro</i> de penetração cutânea em diferentes modelos de pele.....	99
5.11 Ensaios <i>in vitro</i> do potencial irritativo dos nanocarreadores lipídicos.....	107
5.11.1 HET-CAM.....	107
5.11.2 Protocolo de irritação em epiderme humana reconstruída	110
6. CONCLUSÕES.....	112
7. REFERÊNCIAS.....	114

1. INTRODUÇÃO

A hidradenite supurativa, também conhecida como acne inversa ou doença de *Verneuil* é uma condição inflamatória cutânea de caráter crônico, recorrente e debilitante, que possui sua patogênese relacionada à obstrução permanente das unidades pilosebáceas (1). O evento histopatológico primário surge com uma hiperqueratose folicular com obstrução e dilatação dos folículos pilosos ou das aberturas das próprias glândulas sebáceas por secreções excessiva de sebo (2,3).

O sebo é um produto da glândula sebácea que consiste em uma mistura de lipídios composta principalmente de triglicerídeos, ésteres de cera, esqualeno, ácidos graxos livres e de menores quantidades de colesterol, ésteres de colesterol e diglicerídeos. Em condição homeostática, o sebo reveste a superfície do pelo e da pele após uma secreção holócrina no infundíbulo do folículo piloso, beneficiando a lubrificação do fio e contribuindo para a formação da barreira cutânea. A hidradenite supurativa resulta de uma disfunção patológica nesse equilíbrio da produção de sebo, que leva a uma proliferação excessiva de micro-organismos, desencadeando respostas inflamatórias (4–6).

Em 2019, foi aprovado pelo Ministério da Saúde um protocolo clínico e diretrizes terapêuticas para o tratamento da hidradenite supurativa (7). O uso contínuo ou pelo menos de ciclos intermitentes de terapia medicamentosa oral são práticas comuns para lidar com manifestações recorrentes da doença. Em geral, os antibióticos são utilizados para tratar e prevenir a infecção secundária e a inflamação associada às lesões existentes, com destaque para a clindamicina e a rifampicina, que têm ação bactericida eficaz quando administradas em associação por via oral. Além disso, alguns estudos sugerem que os fármacos desempenham um papel imunomodulador, especialmente das células T, que auxilia na melhora da condição inflamatória associada à doença (8–11).

As terapias duradouras com antibióticos de uso sistêmico, no entanto, podem resultar no abandono do tratamento pelos pacientes levando a um potencial risco do desenvolvimento de resistência bacteriana. Ainda, o uso oral de antibióticos traz uma série de efeitos adversos. A clindamicina tem sido associada em particular a erupções cutâneas, dor abdominal, esofagite e principalmente efeitos gastrointestinais (12). Já a rifampicina promove muitas interações medicamentosas por ser um indutor da enzima citocromo P450, o que acarreta em diminuição drástica

dos níveis sanguíneos de outros medicamentos, que os pacientes com hidradenite supurativa possivelmente utilizam por causa das comorbidades associadas (9,13). A excisão cirúrgica não pode ser considerada uma alternativa para a doença, pois pode gerar um resultado esteticamente inaceitável e não impede sobremaneira a reincidência da doença (10,14–16).

O tratamento tópico para a hidradenite supurativa, que poderia eliminar ou pelo menos reduzir os efeitos adversos da antibioticoterapia oral, ainda não foi explorado. Embora já existam cremes tópicos contendo clindamicina para o tratamento da acne no mercado, há uma dificuldade farmacotécnica em incluir a rifampicina em uma mesma formulação tópica que garanta a biodisponibilidade dermatológica das duas substâncias, já que possuem polaridades opostas [solubilidade aquosa da rifampicina = 1,4 g/L (17), solubilidade aquosa da clindamicina = 3,1 g/L (18)]. Ademais, não há estudos na literatura que comprovem a compatibilidade química entre essas duas moléculas quando associadas. Por fim, as altas taxas de produção de sebo pelo curso da hidradenite supurativa devem afetar a biodisponibilidade tópica das substâncias por representar uma barreira adicional à penetração cutânea dos fármacos.

Os sistemas de liberação de fármacos contendo nanopartículas para aplicação tópica, neste caso, podem ser especialmente interessantes devido não só à possibilidade de incorporação dos dois fármacos em uma mesma formulação e melhor estabilização deles (19), como também por potencialmente provoverem o acúmulo dos fármacos nanoestruturados nos folículos pilosos, tais como observados anteriormente pelo desenvolvimento de carreadores lipídicos nanoestruturados (CLN) contendo óleos essenciais, clobetasol e voriconazol (20–23).

Pensando no alto conteúdo sebáceo da pele afetada pela doença, este trabalho propôs o desenvolvimento de CLN co-encapsulando clindamicina e rifampicina, já que os componentes desse tipo de nanoestrutura devem ter afinidade pelo conteúdo sebáceo da pele, favorecendo sua deposição nas estruturas foliculares afetadas e garantindo que concentrações efetivas dos fármacos atinjam o local.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

O objetivo deste trabalho foi desenvolver e caracterizar os carreadores lipídicos nanoestruturados (CLN) contendo uma combinação de fosfato de clindamicina e rifampicina e avaliar o acúmulo dos fármacos nos folículos pilosos em uma condição de excesso de conteúdo sebáceo, visando a uma abordagem mais eficiente e segura para o tratamento tópico da hidradenite supurativa.

2.2 Objetivos específicos

- Desenvolver e validar um método analítico sensível e capaz de quantificar seletivamente o fosfato de clindamicina e a rifampicina extraídos das camadas da pele após experimentos de permeação e penetração cutânea;
- Analisar a compatibilidade química entre fosfato de clindamicina e rifampicina;
- Desenvolver nanocarreadores lipídicos contendo fosfato de clindamicina e rifampicina, com características adequadas de tamanho e superfície para deposição nos folículos pilosos;
- Caracterizar os nanocarreadores lipídicos seguindo parâmetros de diâmetro hidrodinâmico, dispersão de tamanho, potencial zeta, pH, morfologia, eficiência de encapsulação e carga dos fármacos;
- Avaliar de maneira preliminar a estabilidade físico-química dos nanocarreadores lipídicos contendo os fármacos;
- Analisar a influência do fosfato de clindamicina e rifampicina na dinâmica dos lipídios que compõem os CLN;
- Determinar *in vitro* o perfil de liberação do fosfato de clindamicina e rifampicina a partir dos nanocarreadores lipídicos;
- Determinar *in vitro* as interações entre os nanocarreadores lipídicos e os componentes do estrato córneo;
- Avaliar *in vitro* a permeação e penetração cutânea do fosfato de clindamicina e rifampicina a partir dos nanocarreadores lipídicos;

- Elucidar a importância de cada via de penetração para os fármacos e verificar o direcionamento folicular da liberação dos fármacos em pele convencional e pele sebácea, e:
- Estudar *in vitro* o potencial irritativo dos CLN por meio de teste de HET-CAM e em epiderme humana reconstruída.

3. REVISÃO DA LITERATURA

3.1 Pele

A pele é um órgão complexo que funciona como uma barreira mecânica para proteger o corpo contra a ação deletéria de diversos agentes externos, como a incidência de radiação solar, infecção por patógenos e absorção de substâncias tóxicas, e também desempenha papel na termorregulação corporal, no metabolismo e na regulação do equilíbrio de fluidos (24,25). Além de garantir esse papel de proteção e manutenção da homeostase, uma pele saudável é socialmente importante para contribuir para a atração física entre indivíduos (26,27).

A pele é o maior órgão do corpo humano (em adultos, área total entre 18.000 cm² e 25.000 cm²), sendo formada fundamentalmente por três camadas: epiderme, derme e hipoderme (Figura 1), compostas por diferentes tipos celulares e estruturas (28).

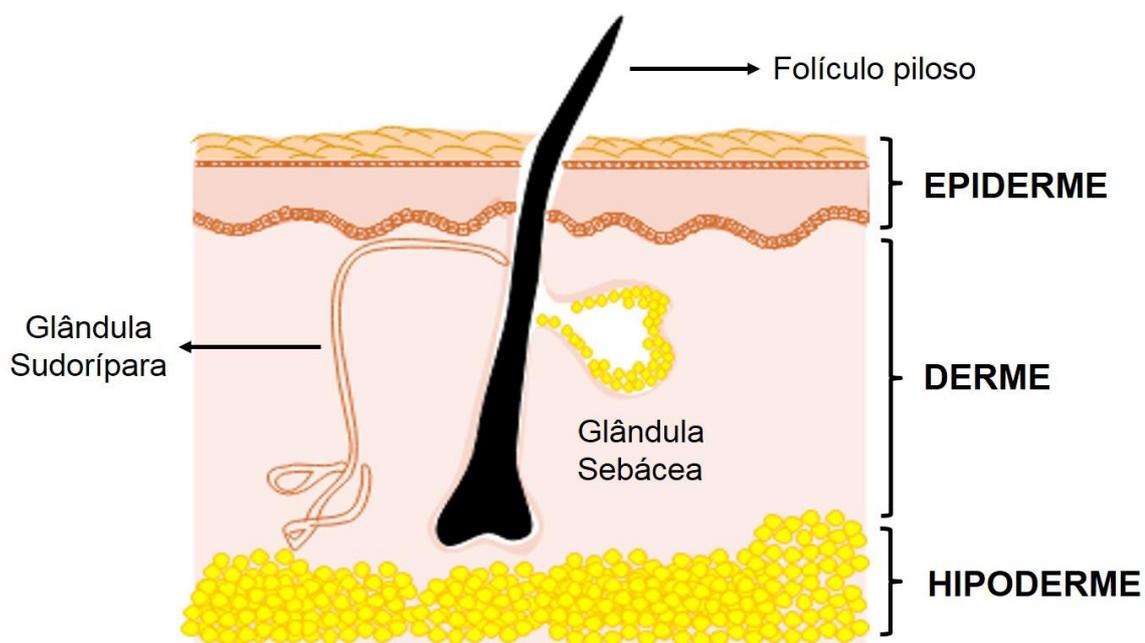


Figura 1. Representação das camadas da pele: epiderme, derme e hipoderme. Fonte: Autoria própria.

A epiderme é a primeira e mais externa camada da pele e é caracterizada por sua função de barreira e proteção. É uma camada avascular nutrida pela difusão dos nutrientes oriundos da derme por capilaridade, formada por células estratificadas e

dividida nas seguintes camadas: córnea, granulosa, espinhosa, basal ou germinativa (Figura 2) (29,30).

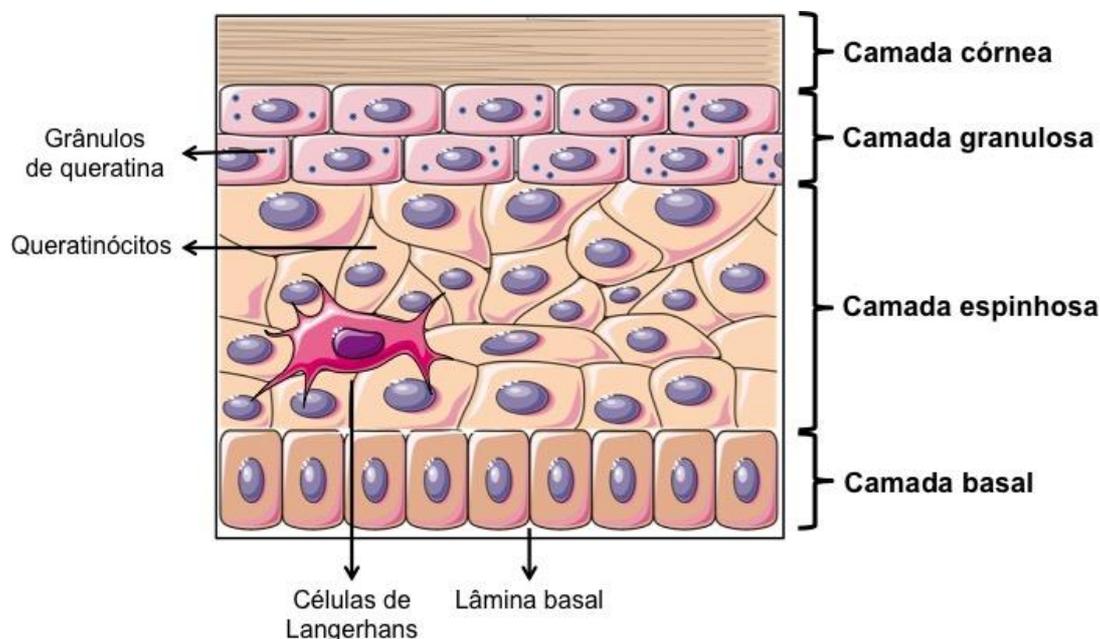


Figura 2. Estruturas e camadas da epiderme: camada córnea, camada granulosa, camada espinhosa e camada basal. Fonte: Autoria própria.

As funções defensivas residem principalmente na camada superior da epiderme, o estrato córneo (31) constituído por células anucleadas queratinizadas, os corneócitos, dispersas em uma matriz rica em lipídios. O estrato córneo, possui somente de 10 μm a 15 μm de espessura, e possui função de constituir a primeira barreira à absorção percutânea de substâncias e contra a perda de água pelo organismo. Nessa camada, as células apresentam grande quantidade de queratina e passam continuamente por processo de descamação. Para transpor o estrato córneo, as substâncias devem apresentar alta lipossolubilidade ou possuir mecanismos capazes de afetar a sua estrutura celular (32).

A camada granulosa geralmente tem de 1 a 4 células de espessura e é composta por uma rica presença de grânulos de queratina em suas células (33,34). A camada granulosa é sucedida pela camada espinhosa. As ligações desmossômicas entre as células aparecem como pequenos espinhos, o que da origem ao nome dessa camada. Ainda, encontram-se nessa camada os grânulos de melanina e as células de *Langerhans*, importantes fagócitos que auxiliam na ativação da resposta imunológica da pele (35).

As células da camada basal ou germinativa são responsáveis pela renovação contínua da epiderme. Porém, apenas 15% dessas células estão constantemente envolvidas nesse processo, pois as células remanescentes estão em estado de repouso ou quiescente. Em processos patológicos na pele, essas células aumentam a proliferação e reconstituição do tecido (36).

A segunda camada da pele é a derme que tem entre 0,5 e 5 mm de espessura e contempla componentes celulares como: linfócitos, fibroblastos, mastócitos, plasmócitos e células dendríticas dérmicas, além de denso colágeno e fibras elásticas produzidas por fibroblastos cutâneos. As características e a distribuição desses fibroblastos garantem a textura e elasticidade da pele (37,38). Esta camada conta ainda com canais linfáticos, vasos sanguíneos e nervos sensoriais. Ainda, possui anexos epidérmicos, que são estruturas introduzidas na derme por meio de invaginações da epiderme (39).

As glândulas sebáceas secretam um lipídio nos folículos pilosos chamado sebo, que protege a pele da dessecação. As glândulas sudoríparas écrinas e apócrinas residem na derme profunda e tecido subcutâneo enquanto seus ductos atravessam a epiderme. As glândulas écrinas produzem suor, essencial para a regulação da temperatura, secretando-o diretamente na superfície da pele, e as glândulas apócrinas secretam o suor na haste do pelo (40).

A terceira e mais interna camada da pele é a hipoderme, sendo composta por lipócitos. A estrutura dessa camada possui a organização em lóbulos de gordura, separados uns dos outros por septos fibrosos. Os feixes de fibras que se originam da derme e se estendem para a hipoderme fortalecem a conexão entre esses dois compartimentos (41).

3.1.1 Rotas de permeação de fármacos através da pele

O estrato córneo é a principal barreira para a entrada de substâncias na pele. Os fármacos podem atravessar a barreira do estrato córneo seguindo a via transepidérmica (difusão através das camadas da pele) ou ainda por rotas alternativas, sendo absorvidos pelas estruturas capilares, glândulas sebáceas e/ou sudoríparas (Figura 3) (30,42,43).

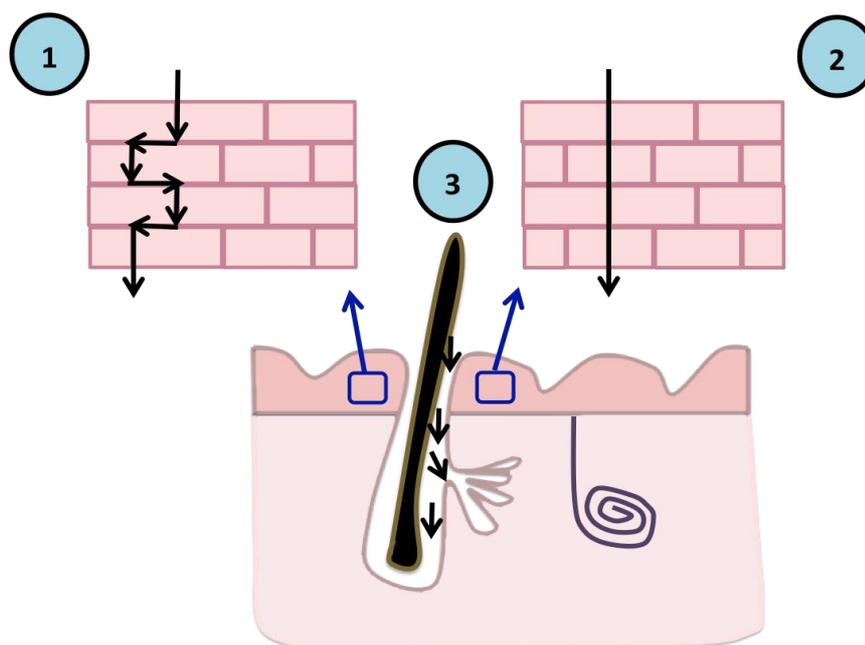


Figura 3. Esquema representativo das vias de permeação do fármaco por via intercelular (1), via transcelular (2) e por rotas alternativas (3). Fonte: Autoria própria.

A via transepidérmica (Figura 3) envolve a passagem das moléculas através das células do estrato córneo (via transcelular) ou através da matriz lipoproteica existente entre essas células (via intercelular) (44).

A maioria das substâncias utiliza preferencialmente a via intercelular para transpor o estrato córneo, em que o permeante navega pelo caminho tortuoso dentro da matriz extracelular, sem atravessar as células (44,45). A via transcelular requer que o permeante atravesse alternativamente as camadas de células e matriz extracelular. Isso envolve uma sequência de particionamento e difusão alternada nos domínios hidrofílicos e lipofílicos. Em geral, a via transcelular favorece a penetração de compostos polares, como a água. Ao contrário, os compostos apolares que possuem afinidade lipídica, difundem-se lentamente ao longo dos espaços intercelulares (46).

A via por rotas alternativas permite a permeação de fármacos através das glândulas sudoríparas, folículos pilosos e glândulas sebáceas. Nesses locais, a superfície da epiderme é permeável, e assim, ocorre uma penetração rápida das substâncias. Para essa via existe grande importância na penetração para os folículos pilosos (21,47). A depender das características do fármaco e da formulação, o transporte pode ser realizado pelo folículo piloso ou para o folículo piloso. Dessa forma, os folículos podem atuar como um reservatório do fármaco, o

qual é liberado gradativamente do seu interior (48). Diante disso, a literatura descreve, por exemplo, o desenvolvimento de diferentes nanopartículas que devido ao seu tamanho diminuto proporcionam o direcionamento e armazenamento das moléculas nos folículos pilosos viabilizando a aplicação tópica (23,49–52).

A via de permeação através do estrato córneo ou apêndices cutâneos está associada às propriedades físicas e químicas do fármaco. Assim, algumas características dos fármacos que podem favorecer esse processo são: possuir alta lipofílicidade mas também uma certa hidrofílicidade para não ter completa afinidade pelo estrato córneo, possuir baixa massa molecular, adequada concentração do fármaco na formulação, além das condições da pele na qual os fármacos serão aplicados (29).

3.2 Folículos Pilosos e doenças associadas

A unidade estrutural de um folículo piloso (unidade pilossebácea) consiste do próprio folículo piloso associado a um ou mais pelos, uma glândula sebácea ligada a ele e o músculo eretor do pelo. O folículo piloso começa na superfície da epiderme e pode se estender até a derme para produção dos pelos terminais (53). O pelo tem papel importante em situações como na termorregulação, na sensibilidade aos estímulos nocivos e na proteção aos agentes externos. No embrião em desenvolvimento, a morfogênese do folículo piloso é regulada por interações epiteliais e mesenquimais que ocorrem em quase todos os órgãos (54). A estrutura geral dos folículos pilosos consiste: no infundíbulo, no istmo e no segmento inferior, incluindo o bulbo (Figura 4) (53,55).

O infundíbulo é a porção mais alta do folículo piloso que se estende desde a abertura da glândula sebácea até a superfície da pele. É uma estrutura em forma de funil cheia de sebo, produto das glândulas sebáceas (56). Logo depois, o folículo piloso é constituído pelo istmo, entre a abertura da glândula sebácea e a inserção do músculo eretor do pelo, local de maior queratinização. Nessa região a invaginação da epiderme é considerada altamente permeável para compostos aplicados topicamente. O terceiro segmento é o bulbo, responsável pela síntese biológica das células ciliadas. Esta parte contém células da matriz proliferativa bastante indiferenciadas, melanócitos e células da bainha radicular externa (Figura 4) (57–59).

O segmento inferior sofre ciclos de involução e regeneração ao longo da vida, enquanto as porções infundibular e o istmo ficam permanentes (39).

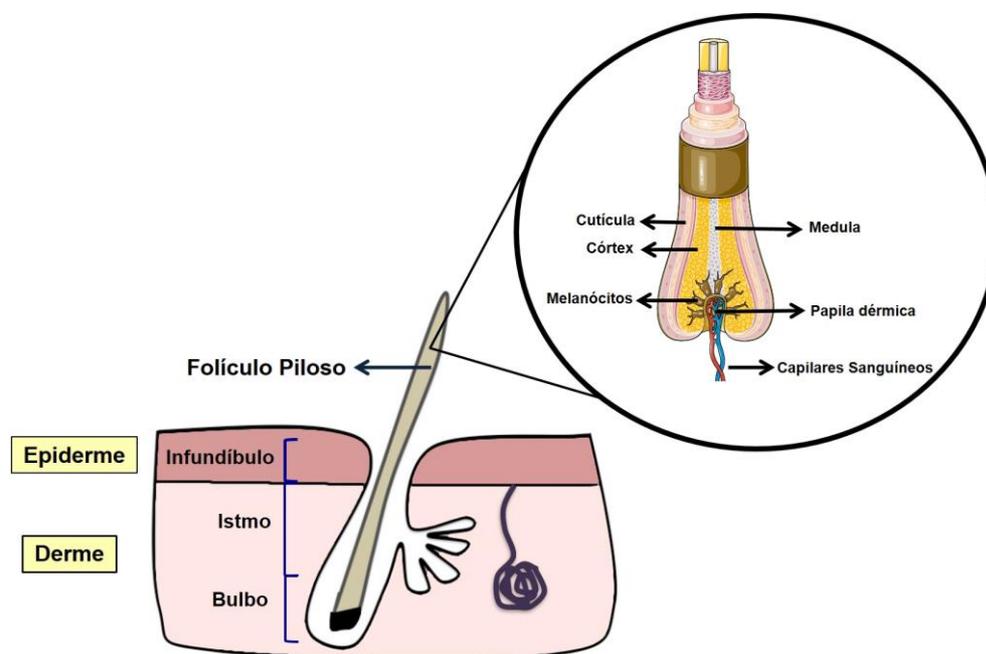


Figura 4. Estrutura dos folículos pilosos. Fonte: Adaptado de Pereira et al (2018) (60).

Transversalmente, observa-se que a haste do pelo é composta pela cutícula, córtex e medula. A medula está localizada no centro da haste do folículo piloso e contém proteínas estruturais que são marcadamente diferentes de outras queratinas capilares (Figura 4) (61).

Existem diversos tipos de doenças da pele que podem gerar vergonha e mal-estar psicológico podendo evoluir para outras condições graves que afetam a saúde física e mental. Muitas dessas doenças ainda possuem tratamento inadequado (62,63), com destaque para aquelas que emergem das unidades pilossebáceas da pele, tais como ceratose capilar, foliculite decalvante, acne, furúnculo e a hidradenite supurativa.

A ceratose capilar é caracterizada pelo acúmulo de queratina nos folículos pilosos e por múltiplas pápulas foliculares puntiformes e pequenas, principalmente localizadas nas pernas, braços, bochechas e nádegas (64). A foliculite decalvante apresenta características semelhantes à ceratose, porém, promove uma inflamação na parte inferior dos folículos pilosos com presença de pus e conseqüente formação de áreas com cicatrizes. A acne é descrita como uma lesão originada pelo aumento da produção de sebo vindo das glândulas sebáceas. Esse excesso

de oleosidade provoca a obstrução dos poros e aumenta a proliferação bacteriana (65). Os furúnculos ocorrem com a formação de um nódulo avermelhado e endurecido, chamado de abscesso, com uma área amarelada na parte central indicativa da presença de pus (66). Já a hidradenite supurativa está relacionada à hiperqueratose e oclusão folicular, seguida de dilatação pilossebácea, ruptura e extrusão do conteúdo folicular, o que desencadeia reação inflamatória (67).

3.3 Hidradenite supurativa

A hidradenite supurativa, também conhecida como acne inversa ou doença de *Verneuil* é uma condição inflamatória crônica envolvendo, principalmente, a pele intertriginosa das áreas axilar, inguinal, inframamária e genital do corpo (68).

Estima-se que a prevalência da hidradenite supurativa seja de 1% a 2% na população geral. A hidradenite supurativa ocorre tipicamente após a puberdade, na segunda ou terceira décadas da vida, e tem predominância feminina (67). Essa doença afeta seriamente a qualidade de vida dos pacientes gerando sofrimento físico, psicológico, financeiro, social e emocional, o que coloca esta doença entre as condições mais angustiantes observadas na dermatologia (69–71), sendo muito preocupante para a saúde pública. Além disso, a hidradenite supurativa está associada a outras comorbidades, como doença cardiovascular, doença inflamatória intestinal e distúrbios inflamatórios nas articulações (72,73).

A hidradenite supurativa, muitas vezes, é confundida com diversas outras doenças (abscessos, furunculose, glândula de *Bartholin* infectada, cistos epidérmicos infectados ou inflamados, fístulas, acne nodular e manifestação cutânea da doença de *Crohn*) e, portanto, seu diagnóstico deve ser criteriosamente avaliado, bem como as suas comorbidades (74–76). Para o diagnóstico da hidradenite supurativa é necessário o cumprimento de pelo menos três critérios: aparecimento de lesões típicas (como nódulos doloridos), predileção anatômica típica e cronicidade com recorrência das lesões. A avaliação clínica requer exame completo do paciente para determinar o estágio em que a doença se encontra (77).

A avaliação clínica da gravidade da doença pode ser obtida usando os protocolos de *Hurley staging*, *Sartorius scoring*, *The Physician Global Assessment* ou *hidradenitis suppurativa severity index*. Esses protocolos possuem pontuações

que variam em sua utilidade na prática clínica cotidiana e as ferramentas de avaliação disponíveis muitas vezes carecem das medidas de responsividade válida dos impactos da doença na qualidade de vida (78).

O sistema de classificação dos estágios de *Hurley* é útil para a definição da doença em leve, moderada e grave, que são (Figura 5): estágio I - formação de abscesso solitário ou múltiplo, sem *sinus* ou cicatriz; estágio II – presença de um ou mais abscessos recorrentes com formação de *sinus* e cicatriz e estágio III – ocorrem múltiplos *sinus* interconectados, além de, abscessos em toda a área, cicatrização e inflamação (79,80).

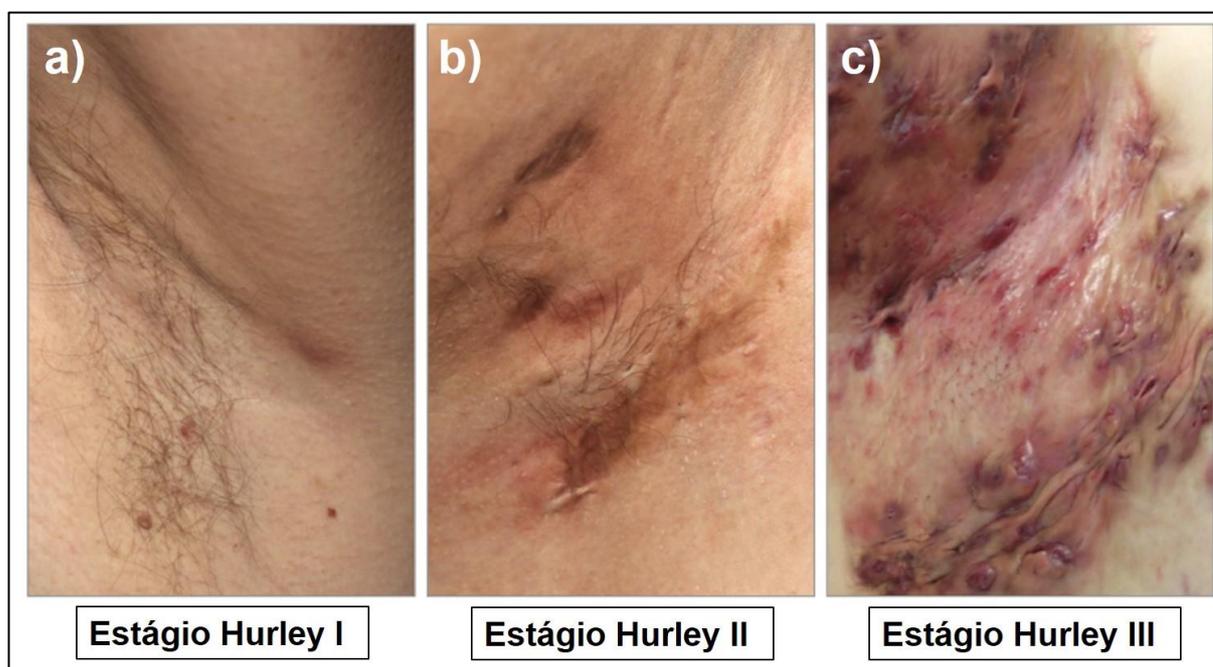


Figura 5. Os diferentes estágios de *Hurley*. Estágio de *Hurley* I - lesão inflamada sem cicatrização (a); Estágio de *Hurley* II - cicatrizes e nódulos inflamados separados por pele clinicamente não afetada (b) e Estágio de *Hurley* III - lesões coalescentes (nódulos). Fonte: Adaptado de Saunte e Jemec (2017) (81).

O sistema de *Sartorius scoring* é altamente detalhado, baseado principalmente no número e no tipo de lesões, na região anatômica e na presença de pele saudável. Porém, ainda apresenta limitação técnica na mensuração da melhora clínica da doença (82). O *Physician Global Assessment* é uma ferramenta de avaliação clínica de pacientes com hidradenite supurativa composto por seis etapas, que definem com precisão a gravidade da doença e podem ser úteis na

avaliação da resposta ao tratamento (83). *Severity index* é a análise de parâmetros subjetivos e objetivos para avaliar a eficácia da terapia com agentes biológicos em pacientes com hidradenite supurativa (84).

A causa exata da patogênese da hidradenite supurativa é desconhecida. Acredita-se que a primeira alteração patogênica é caracterizada pela obstrução permanente das unidades pilossebáceas da pele (Figura 6). Essa condição, juntamente com a desregulação imune inata e adaptativa são consideradas o início para o desenvolvimento da hidradenite supurativa clínica (85,86). À medida que a hidradenite supurativa progride, níveis aumentados de interleucina (IL)-1, fator de necrose tumoral (TNF), IL-17, caspase-1 e IL-10 aparecem no tecido lesionado acompanhado de um influxo de neutrófilos, monócitos e mastócitos (81).



- 1. Inflamação perifolicular**
- 2. Hiperqueratinização, oclusão e dilatação do folículo**
- 3. Ruptura folicular com aumento da inflamação**

Figura 6. Representação do processo patológico da hidradenite supurativa. Desde a ocorrência de inflamação perifolicular seguida da hiperqueratinização, oclusão/dilatação do folículo e ruptura folicular com aumento da inflamação. Fonte: Autoria própria.

Além disso, há evidências de que, pelo menos em alguns casos, fatores genéticos hereditários desempenhem um papel no desencadeamento da doença. A hidradenite supurativa familiar em um padrão autossômico dominante tem sido descrita e, recentemente, múltiplas mutações em proteínas do complexo gama-secretase foram identificadas (87,88).

A infecção e colonização bacteriana são consideradas um fator patogênico secundário que pode piorar a hidradenite supurativa (2). O evento histopatológico inicia por uma hiperqueratose folicular com obstrução e dilatação dos folículos pilosos, resultando em sua ruptura com subsequente inflamação, formação de abscessos e de tratos sinusais (Figura 6) (3).

3.3.1 Microbiologia na hidradenite supurativa

A pele representa um mecanismo de defesa do organismo essencial contra os patógenos. Para que os micro-organismos se tornem patogênicos, eles devem possuir propriedades específicas, como a capacidade de aderir, crescer e invadir o hospedeiro (89).

Uma característica importante da pele consiste em sua diversidade de colonização dos micro-organismos (bactérias, fungos e artrópodes), os quais dependem de fatores para seu desenvolvimento tais como: temperatura local, idade, produção de sebo e suor, estado hormonal e a umidade local (90,91).

Os locais afetados na hidradenite supurativa (áreas intertriginosas) oferecem condições preferenciais para o crescimento bacteriano, devido aos altos níveis de umidade local, suor e secreção sebácea (Figura 7) (11).

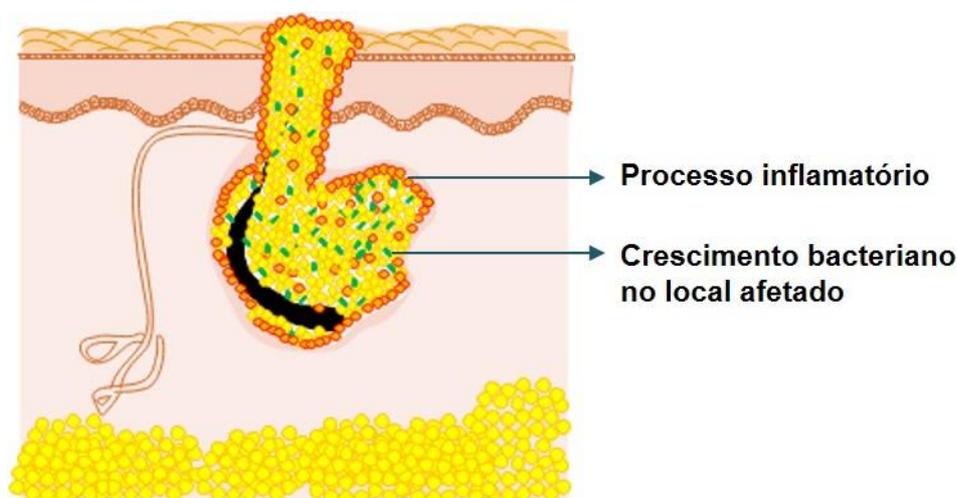


Figura 7. Representação do processo inflamatório e crescimento bacteriano na hidradenite supurativa. Fonte: Autoria própria.

As respostas imunológicas inadequadas parecem ter um papel chave na hidradenite supurativa, que envolvem os sistemas imunológicos inato e adaptativo.

Entretanto, o envolvimento microbiológico vem gerando grande destaque e especulações, podendo ser um evento primário ou secundário na evolução das lesões. Para isso, a cultura bacteriana tem sido tradicionalmente usada como uma ferramenta de pesquisa primária para ligar ou descartar o envolvimento bacteriano na patogênese da hidradenite supurativa (92).

Jahns *et al.* (2013) (92) investigaram a localização e presença de colonização bacteriana em 27 pacientes que apresentavam hidradenite supurativa. Entre esses, 63% dos pacientes foram positivos para colonização bacteriana. Destes, 7% apresentaram colonização no estrato córneo, 30% nos folículos pilosos e 26% nos tratos sinusais.

Em geral, a apresentação clínica da hidradenite supurativa pela obstrução progressiva dos folículos pilosos favorece o aparecimento de infecções cutâneas nessa região (93). Estudos anteriores encontraram uma vasta gama de bactérias associadas com as lesões existentes, tais como: *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae*, *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus coagulase-negativa*, *Streptococcus milleri*, *Corynebacterium*, *Propionibacterium acnes*, *Escherichia coli*, *Proteus mirabilis* e *Klebsiella spp* (94–96).

O crescimento polimicrobiano foi encontrado em 51 amostras provenientes de porções profundas das lesões de pacientes com hidradenite supurativa submetidos à cirurgia. As bactérias mais comumente isoladas foram *Estafilococos coagulase-negativa* e *S. aureus*, além de serem encontradas outras espécies de bactérias como *P. mirabilis* e *E. coli* (97). Um outro estudo prospectivo das lesões dos pacientes com hidradenite supurativa encontrou também *S. aureus* associados às lesões da hidradenite supurativa. Além disso, outras espécies de patógenos bacterianos associados às lesões da hidradenite supurativa foram identificadas: *Staphylococcus lugdunensis*, *Staphylococcus pyogenes* e *actinomicetos anaeróbios* (98).

Uma complicação característica no desenvolvimento microbiológico é a formação de biofilmes bacterianos nas lesões da hidradenite supurativa, que estão associados a achados clássicos de inflamações crônicas, não cicatrizantes, com crises agudas e crônicas (99). O desenvolvimento dos biofilmes também resulta em uma barreira física, contribuindo ainda mais para a diminuição da eficácia antibiótica. As três bactérias mais comumente implicadas em distúrbios de biofilme são: *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterococcus faecalis* e *S. aureus* (78).

No início do tratamento com antibióticos, os pacientes são responsivos, depois resistentes e, dessa forma, as lesões associadas ao biofilme causam uma grande dificuldade no manejo clínico (100). Além disso, as adaptações metabólicas bacterianas geralmente diminuem a eficácia de agentes antimicrobianos, tornando as lesões mais difíceis de serem tratadas.

3.3.2 Tratamento da hidradenite supurativa

Na literatura, foram descritas mais de 40 intervenções para o tratamento da hidradenite supurativa (101). Em muitos casos, as evidências são limitadas a relatos de casos únicos ou pequenas séries de casos. O tratamento da hidradenite supurativa é caracterizado como um desafio e embora existam diretrizes, a literatura permanece com investigação baseada na compreensão evolutiva da patogênese da doença (102).

Atualmente, a hidradenite supurativa não tem cura e a terapêutica visa atingir um melhor e maior controle da doença e sua sintomatologia associada (103). As linhas de tratamento objetivam principalmente prevenir novas lesões, proporcionar tratamento precoce e efetivo para lesões recém-formadas e remover os nódulos e tratos sinusais existentes. A prática padrão é oferecer procedimentos não farmacológicos, tratamentos tópicos e sistêmicos, mas muitas vezes culminando em procedimentos cirúrgicos.

As terapias não farmacológicas incluem a melhoria na qualidade de vida evitando roupas apertadas, cessação do tabagismo, manejo da depressão e ansiedade, perda de peso e encaminhamento para grupos de apoio (104). Os tratamentos farmacológicos são amplamente utilizados, como uso de: antibióticos (associação de clindamicina e rifampicina), corticosteroides, imunossupressores, tratamento hormonal, retinóides e agentes biológicos, como anticorpos monoclonais (adalimumab e infliximab) (105). Uma alternativa para as falhas terapêuticas é a excisão cirúrgica; porém, esse procedimento pode gerar um resultado esteticamente inaceitável, além de não impedir a reincidência da doença (14,106). Até o momento, existem poucos estudos que focam o tratamento local e ideal para feridas em pacientes com hidradenite supurativa (107).

Em geral, o tratamento é direcionado conforme a gravidade da doença, sendo que nas fases iniciais (*Hurley* 1 e 2) o tratamento de primeira linha é baseado na

antibioticoterapia, tópica ou sistêmica. A hidradenite supurativa é uma doença envolvendo numerosas bactérias e na qual vários esquemas antibióticos definitivamente melhoraram a condição em pacientes com grave envolvimento inflamatório (75). Portanto, os tratamentos farmacológicos tópicos e sistêmicos podem promover melhora significativa, mas taxas de resposta completas são relativamente baixas e recidivas são comuns (108).

3.3.2.1 Antibioticoterapia

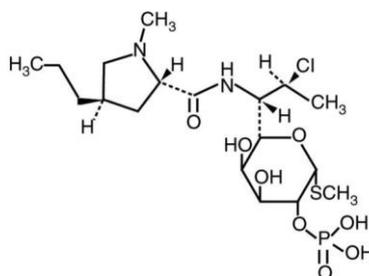
3.3.2.1.1 Clindamicina

A clindamicina (7(S)-cloro-7-desoxilincomicina) é um antibiótico da classe da lincomicina, sendo a sua primeira produção em 1966 (109). A clindamicina evita a formação de ligações peptídicas, inibindo assim a síntese de proteínas, ligando-se reversivelmente à subunidade ribossômica 50S. Essa inibição altera a superfície bacteriana de forma a facilitar a fagocitose e a morte intracelular (109). Além disso, a clindamicina pode potencializar a opsonização e a fagocitose mesmo em concentrações sub-inibitórias. A clindamicina atua predominantemente em bactérias aeróbias gram-positivas e anaeróbios e não tem ação contra aeróbios gram-negativos. Geralmente considerada bacteriostática, podendo, porém, ser bactericida quando usada em concentrações elevadas ou diante de micro-organismos altamente sensíveis (110).

De maneira geral, uma aplicação tópica permite a administração da clindamicina diretamente em seu local de ação, minimizando a absorção sistêmica e diminuindo os efeitos colaterais. Dessa forma, o fármaco encontra disponível em três formas: cloridrato, palmitato e fosfato. No entanto, o sal cloridrato e a composição do veículo podem afetar a extensão dessa absorção sistêmica e, por esse motivo, o éster fosfato (Figura 8) é o mais indicado por resultar em menor absorção transdérmica do fármaco e dessa forma diminuir a ocorrência de efeitos colaterais indesejados (111).

O fosfato de clindamicina é descrito como um pó branco e praticamente inodoro. Apresenta peso molecular de 504,96 g/mol e fórmula molecular $C_{18}H_{34}ClN_2O_8PS$. Quanto a solubilidade, o fosfato de clindamicina é considerado praticamente insolúvel em clorofórmio, praticamente insolúvel em benzeno,

praticamente insolúvel em éter, ligeiramente solúvel em acetona, ligeiramente solúvel em álcool desidratado e livremente solúvel em água (18). Verifica-se, que o éster fosfato não possui atividade antibacteriana *in vitro*, porém é hidrolisado na forma ativa *in vivo* pela ação das fosfatases presentes na pele (112,113).



Fosfato de clindamicina

Log P: 0,50

Solubilidade em água: 0,46 mg/mL

Figura 8. Fórmula estrutural do fosfato de clindamicina (Massa molecular: 504,96 g/mol).

Em relação ao espectro de ação, o fosfato de clindamicina é ativo contra *S. aureus*, *S. pneumonia*, *S. epidermidis*, *S. pyogenes* e *Streptococcus viridans*. Geralmente esse fármaco é ativo contra cocos gram-positivos anaeróbicos. As espécies *Propionibacterium*, *Bifidobacterium* e *Lactobacillus*, que raramente causam infecções sistêmicas, também são suscetíveis, além das cepas de *Plasmodium falcifum* e *Toxoplasma gondii* (109,114).

Os efeitos adversos da clindamicina variam de acordo com o modo de administração. Na via de administração sistêmica, os principais efeitos adversos estão relacionados às disfunções gastrointestinais (náusea, vômito e diarreia) e crescimento de *Clostridium difficile* responsável por doenças gastrointestinais, que variam desde uma diarreia até uma colite pseudomembranosa. Os efeitos colaterais mais comuns experimentados com o uso tópico incluem o eritema, o prurido, a queimação e a esfoliação. Além disso outros efeitos adversos são relatados como a hepatotoxicidade, reações de hipersensibilidade, flebite (ocasionalmente neutropenia e trombocitopenia) e prolongamento do bloqueio neuromuscular (109).

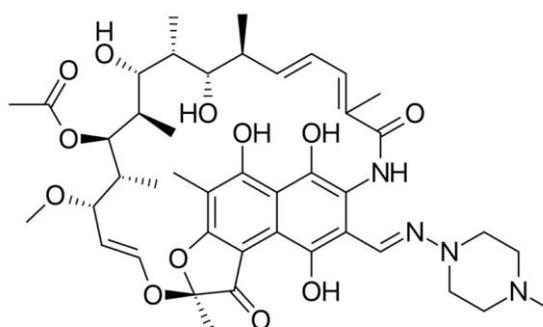
Além disso, tem sido relatado que o fosfato de clindamicina possui também atividade anti-inflamatória, independente da atividade antibacteriana (115) e tem propriedades marcantes de realce imunológico, por aumentar a

quimiotaxia/fagocitose (41, 42), o que o torna promissor para o quadro de hidradenite supurativa em que há reações inflamatórias significativas.

3.3.2.1.2 Rifampicina

A rifampicina, isolada pela primeira vez em 1957, é um antibiótico semissintético obtido a partir da fermentação de *Streptomyces mediterranei*. Esse antibiótico mostrou ser ativo contra a maioria das bactérias gram-positivas, certas bactérias gram-negativas além de micobactérias. Por esse motivo, despertou inicialmente considerável interesse para o tratamento da tuberculose (116).

A atividade antimicrobiana da rifampicina é atribuída a sua ligação com a RNA polimerase dependente de DNA por meio da formação de um complexo estável com a enzima, suprimindo a iniciação da síntese do RNA bacteriano (117–119). Trata-se de um pó cristalino vermelho-alaranjado, inodoro, estável à temperatura ambiente, solúvel em metanol, clorofórmio e outros solventes orgânicos, e ligeiramente solúvel em água (119). A fórmula estrutural do fármaco está representada na Figura 9. A rifampicina apresenta peso molecular de 822,97 g/mol e fórmula molecular $C_{43}H_{58}N_4O_{12}$. A sua máxima estabilidade é verificada em soluções em pHs próximos da neutralidade (120,121).



Rifampicina

Log P: 3,17

Solubilidade em água: 0,0413 mg/mL

Figura 9. Fórmula estrutural da rifampicina (Massa molecular: 822,97 g/mol).

A rifampicina é bem absorvida no trato gastrointestinal, sendo 60% a 90% ligada à proteína, e penetra bem os tecidos, incluindo o sistema nervoso central, fígado, ossos, pulmões, além de atingir saliva e lágrimas. Após absorção, a

rifampicina é eliminada na bile, onde sofre circulação entero-hepática e o fármaco é desacetilado em um metabólito, desacetilrifampicina, com atividades antibacterianas semelhantes às do composto original. No entanto, a desacetilação diminui a reabsorção intestinal e promove a excreção do fármaco. Além disso, a rifampicina interage com várias enzimas envolvidas no metabolismo de fármacos, promovendo oxidação (CYP2B6, CYP2C19 e CYP3A4), glucuronidação (UGT1A1) e conjugação de glutathione (GSTA1). Assim, é necessária cautela com o uso concomitante de fármacos que são metabolizadas por essas enzimas, uma vez que a rifampicina pode reduzir os seus efeitos (122,123).

A rifampicina inibe e elimina uma ampla variedade de micro-organismos, sendo bastante ativa contra *Staphylococcus* (tanto coagulase positiva quanto coagulase negativa). Entre as bactérias gram-negativas, *Neisseria meningitidis*, *Neisseria gonorrhoeae* e *Hemophilus influenzae* são as espécies mais sensíveis.

Os principais efeitos adversos da rifampicina administrada sistemicamente são náuseas, anorexia, diarreia, coloração alaranjada do suor, saliva, urina, fezes e lágrimas, rubor ou erupção cutânea, insuficiência adrenal, hepatotoxicidade, trombocitopenia, trombose, fibrose pulmonar e hipersensibilidade (118,122).

A rifampicina também tem propriedades imunossupressoras, suprimindo a função das células T e, *in vitro*, demonstrou reduzir a transformação dos linfócitos, reduzir a secreção de IL-1 β e TNF, enquanto a secreção de IL-6 e IL-10 foi significativamente aumentada em células mononucleares tratadas com rifampicina (124).

3.3.2.1.3 Associação de clindamicina e rifampicina

A literatura descreve a eficácia da terapia com antibióticos usando a combinação de clindamicina e rifampicina na hidradenite supurativa (300 mg de clindamicina por via oral duas vezes ao dia e 300 mg de rifampicina via oral duas vezes ao dia por 10 semanas) (Tabela 1). Além disso, essa associação parece ser eficaz para outros distúrbios de oclusão folicular, como foliculite decalvante (65,125,126).

A hidradenite supurativa pode ser considerada uma doença inflamatória complicada por infecções bacterianas, o que explicaria a eficácia da associação de clindamicina e rifampicina por meio dos seus efeitos antibacterianos e anti-

inflamatórios. O mecanismo exato dessa associação, no entanto, não é bem conhecido (127).

Esse esquema foi inicialmente descrito em 2006 por um pequeno estudo retrospectivo realizado por Mendonça e Griffiths (14), que mostraram que o tratamento combinado com clindamicina e rifampicina (300 mg de cada fármaco por 10 semanas) foi eficaz em 10 dos 14 (71,4%) pacientes tratados. Um desfecho parecido foi observado em um outro estudo com 116 pacientes utilizando uma dosagem maior da rifampicina (600 mg uma vez ao dia) e a mesma dosagem de clindamicina. Nesse caso, 8 dos 70 pacientes que foram analisados apresentaram remissão completa, 60 pacientes uma melhora considerável e 2 pacientes relataram uma piora na doença após as 10 semanas de tratamento (10).

Tabela 1. Principais estudos relacionados a terapia de associação da clindamicina e rifampicina.

Estudo	Tipo de estudo	Participantes	Regime terapêutico	Resultado	Referência
Mendonça, C.O.; Griffiths, C.E.M., 2006	Estudo retrospectivo	14	Clindamicina (300 mg duas vezes ao dia) e rifampicina (300 mg duas vezes ao dia) por 10 semanas	Oito pacientes obtiveram remissão completa da doença, dois pacientes obtiveram remissão após a substituição de clindamicina por minociclina (100 mg ao dia) por causa da diarreia transitória e quatro pacientes não puderam completar o curso do tratamento por causa da diarreia	(14)
Gener, G. et al., 2009	Estudo retrospectivo	116	Clindamicina (300 mg duas vezes ao dia) e rifampicina (600 mg ao dia) por 10 semanas	Os relatórios mostraram melhores desempenhos de qualidade de vida. Oito pacientes (6,9%) interromperam o tratamento devido aos efeitos colaterais	(10)
Van Der Zee, H.H. et al., 2009	Estudo retrospectivo	34	Clindamicina (600 mg ao dia) e rifampicina (600 mg ao dia) por 10 semanas	Vinte e oito pacientes (82%) tiveram pelo menos melhora parcial e 16 (47%) apresentaram remissão total. Após a remissão total, 8 dos 13 (61,5%) pacientes tratados tiveram uma recaída após um período médio de 5 meses	(8)
Ochi, H. et al., 2018	Estudo retrospectivo	11	Clindamicina (300 mg duas vezes ao dia) e rifampicina (300 mg duas vezes ao dia) por 10 semanas	Sete pacientes (63,6%) relataram melhora clínica. Três pacientes obtiveram pontuação clara, mínima ou leve no escore Avaliação Global do Médico após o término da terapia	(12)
Bettoli et al., 2014	Estudo prospectivo	23	Clindamicina (600 mg ao dia) e rifampicina (600 mg ao dia) por 10 semanas	Os 20 pacientes que completaram a terapia mostraram melhores desempenhos dos relatórios de qualidade de vida. Três dos 23 pacientes (13%) queixaram de efeitos colaterais, principalmente náuseas e vômitos	(128)
Dessinioti, C. et al., 2016	Estudo prospectivo	26	Clindamicina (600 mg ao dia) e rifampicina (600 mg ao dia) por 12 semanas	A resposta clínica foi observada em 19 pacientes (73%). Oito pacientes (31%) apresentaram eventos adversos. No seguimento de 1 ano, houve eficácia sustentada em 7 pacientes (41%), enquanto 10 (59%) apresentaram recidiva da doença após um tempo médio de 4,2 meses	(129)

Ainda, outro estudo clínico mostrou que 28 de 34 pacientes (82%) obtiveram pelo menos uma melhora parcial com um regime terapêutico de 600 mg de clindamicina e 600 mg de rifampicina por via oral uma vez ao dia. O efeito máximo do tratamento apareceu dentro de 10 semanas (8). Uma porcentagem similar foi observada em um estudo retrospectivo conduzido com 23 pacientes dos quais 20 pacientes (87%) que completaram a terapia mostraram melhores desempenhos dos relatórios de qualidade de vida (128). Mais recentemente, uma resposta clínica positiva foi observada em 19 pacientes (73%) dos 26 tratados com a associação de clindamicina e rifampicina (129).

Em geral, a rifampicina é altamente importante pois pode esterilizar os abscessos estafilocócicos e assim desempenha um papel central no tratamento da doença. No entanto, existe o surgimento de resistência quando a rifampicina é usada em monoterapia (14). Nesse contexto, a clindamicina é associada à rifampicina para prevenir o surgimento de resistência bacteriana contra a rifampicina. Além disso, a clindamicina também é importante devido à sua atividade contra os micro-organismos anaeróbicos que, embora presentes na minoria das vezes, parecem desempenhar um papel importante no curso da doença (94). Além desses efeitos, os antibióticos possuem capacidade de destruir os biofilmes mencionados anteriormente (130).

A literatura ainda reporta uma interação farmacocinética significativa entre clindamicina e rifampicina (131,132). A rifampicina é reportada como um importante indutor do citocromo P450 3A4, e nesse sentido interfere na principal via metabólica da clindamicina, causando uma diminuição na sua concentração plasmática. Além disso, quando ambos são administrados por via oral, a rifampicina interfere no efeito hepático de primeira passagem da clindamicina, reduzindo ainda mais a biodisponibilidade desse fármaco.

Os efeitos colaterais mais comuns da clindamicina e da rifampicina são as queixas gastrointestinais, como náuseas, vômitos e diarreia. Além disso, a rifampicina pode causar uma coloração alaranjada na urina, no escarro e nas lágrimas (123,130). A clindamicina está associada também ao aparecimento de colite por *C. difficile*, entretanto a rifampicina é um bom antibiótico para o tratamento de *C. difficile* (12,14).

Nas terapias convencionais sistêmicas são requeridas altas doses do fármaco, para que atinja o alvo específico em concentrações terapêuticas. Dessa

forma, quantidades significativas do fármaco podem acumular em tecidos não alvos, levando a ocorrer diversos efeitos adversos e tóxicos (133,134).

Diante disso, a terapia tópica evita a ocorrência desses efeitos adversos sistêmicos uma vez que limita à área afetada do organismo onde o medicamento é aplicado e permite que se administrem menores doses do fármaco, resultando em menor exposição do paciente as doses tóxicas da substância (135).

Especialmente, a via de administração tópica apresenta mais vantagens que a via de administração oral para o tratamento de doenças que afetam a pele, principalmente, no que diz respeito a maior adesão do paciente ao tratamento, evitando o metabolismo pelo fígado e prevenindo efeitos colaterais sistêmicos (136). Uma desvantagem dessa via, no entanto, é representada pelo grau de absorção dos fármacos na pele, que tende a ser limitado ou incompleto. Além disso, os tratamentos tópicos podem ocasionar irritações e reações alérgicas e conseqüentemente menor residência dos medicamentos no local de aplicação/ação (137).

Diante disso, os sistemas nanoparticulados para liberação de fármacos na via tópica possuem grande importância, pois permitem utilizar doses menores do fármaco, e têm se mostrado capazes de promover o direcionamento exclusivo ao local de ação pretendido, reduzindo acúmulo em tecidos adjacentes e prevenindo absorção sistêmica significativa (138), o que reduz ou até mesmo elimina efeitos adversos. Além disso, esses sistemas podem promover uma liberação progressiva do fármaco durante períodos prolongados, de forma que reduza a necessidade de aplicação do fármaco repetidas vezes ao longo do dia, mantendo níveis eficazes e seguros do fármaco no local de ação pretendido por todo o período do tratamento (139,140).

3.4 Nanotecnologia

A nanotecnologia é uma área interdisciplinar e bastante ampla, que inclui diversos conhecimentos baseados em matemática, biologia, física, química, engenharia e outros ramos dentro da ciência. Essa área se dedica ao desenvolvimento de sistemas nanoestruturados produzidos a partir de diversos tipos de materiais, como: polímeros, metais, semicondutores e biomateriais (141).

Recentemente, descobriu-se na nanotecnologia a possibilidade de

desenvolver medicamentos potencialmente alvo-específicos com características mais eficazes e seguras por meio da nanoestruturação de fármacos e biofármacos. Sendo assim, diversos produtos nanotecnológicos estão sendo desenvolvidos para contornar os inconvenientes ocasionados por medicamentos tradicionais (142,143).

Esses sistemas farmacêuticos em escala nanométrica visam: uma liberação direcionada dos fármacos; maior estabilidade e proteção do ativo; melhor absorção dos fármacos, além de, poder promover um co-fornecimento de dois ou mais fármacos por uma terapia combinada (144).

Como mencionado anteriormente, os nanossistemas podem ser produzidos por diferentes materiais: lipídios, metais e polímeros naturais ou sintéticos. Os nanossistemas farmacêuticos podem ser classificados, dependendo da composição, como: nanopartículas magnéticas, nanopartículas poliméricas, nanopartículas metálicas, nanotubos, dendrímeros, micro e nanoemulsões, lipossomas ou nanossistemas lipídicos (145).

3.4.1 Nanossistemas lipídicos

Os nanossistemas obtidos a partir de matrizes lipídicas têm mostrado alta biocompatibilidade e capacidade de penetrar através de várias barreiras anatômicas, proporcionando a liberação alvo-específica de seus conteúdos e possibilitando uma administração mais controlada dos fármacos (146).

Para administração tópica, uma das estratégias que têm provado ter grandes resultados no controle ou no aumento da penetração de ativos em camadas da pele são os nanossistemas lipídicos, principalmente, lipossomas, nanoemulsões, nanopartículas lipídicas sólidas e os CLN (147).

Os lipossomas, constituídos principalmente de fosfolipídios, são estruturas vesiculares esféricas compreendendo uma membrana de duas camadas com um compartimento hidrofóbico entre as camadas e um núcleo interno aquoso (148). As nanoemulsões, são formulações líquidas compostas por óleo, água, e dois ou mais tensoativos, podendo ser uma dispersão de nanogotículas de óleo em água ou de água em óleo (149).

As nanopartículas lipídicas sólidas são compostas apenas de lipídios sólidos em temperatura ambiente e altamente puros que se cristalizam de forma perfeita. Este, no entanto, é o principal fator para gerar as desvantagens desse nanossistema

lipídico, como a instabilidade da encapsulação/expulsão dos fármacos durante a estocagem, a tendência de gelificação imprevisível e a limitação na incorporação de fármacos hidrofílicos. Os CLN (Figura 10) são uma segunda geração de nanopartículas lipídicas sólidas, constituídos por uma mistura de lipídios sólidos e líquidos, os quais são acomodados formando, normalmente, uma estrutura cristalina imperfeita. Essa conformação permite que os fármacos sejam incorporados de forma mais eficiente que nas nanopartículas lipídicas sólidas e evitam sua expulsão precoce do compartimento interno dos nanossistemas (150).

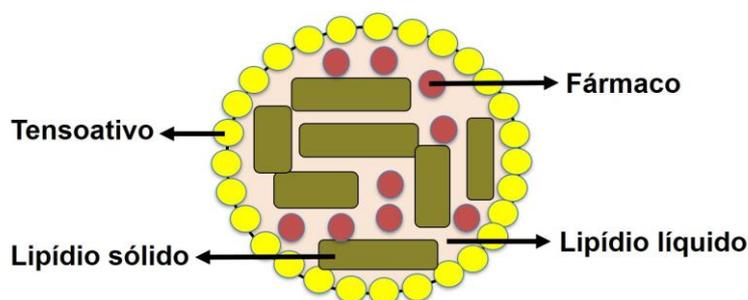


Figura 10. Estrutura básica dos CLN formados por uma mistura de lipídios líquidos e sólidos. Fonte: Autoria própria.

Além das vantagens relacionadas à estrutura cristalina imperfeita dos CLN, esse nanossistema lipídico pode ser produzido por diferentes métodos, normalmente na ausência de solvente orgânico, e o processo também é facilmente adaptado para produção em larga escala, por meio, por exemplo, da homogeneização de alta pressão (151,152).

Em relação aos benefícios da aplicação tópica dos CLN, esses são compostos de lipídios não-irritantes e não-tóxicos que também apresentam um efeito oclusivo, responsável por evitar a perda de água da pele (153,154). O efeito oclusivo sobre o estrato córneo ocorre por meio do desenvolvimento de um filme lipídico pela deposição de nanossistemas aplicados na pele. Essa adesão acontece por meio das interações hidrofóbicas entre os lipídios presentes na composição da formulação com os lipídios presentes na estrutura da pele, promovendo aumento tanto no grau de hidratação, quanto na penetração dos fármacos (155).

Em geral, a capacidade oclusiva de um carreador lipídico está diretamente relacionada ao tamanho da partícula (156). Estudos revelaram que partículas

inferiores a 400 nm apresentam melhor propriedade de adesão quando comparadas as partículas maiores. Sendo assim, o tamanho das partículas obtido, mostra-se promissor para formulações com alto fator de oclusão (157,158).

Consequentemente, o efeito oclusivo permite um aumento da hidratação e elasticidade cutânea, possibilitando uma diminuição do acondicionamento e um aumento no tamanho do poro dos corneócitos. Todos esses fatores são facilitadores da penetração do fármaco nas estruturas cutâneas (159). Além disso, os CLN têm a capacidade de controlar a liberação do fármaco, possibilitando a exposição deste na pele por um período prolongado e reduzindo a possibilidade de absorção sistêmica (160). Por esta razão, os CLN têm sido amplamente investigados para preparações tópicas e dermatológicas como, por exemplo, para a administração de clotrimazol (161), celecoxib (162), minoxidil (51) e finasterida (163).

A literatura reporta que os CLN possuem uma preferência por uma trajetória de permeação não clássica, ou seja, através do folículo piloso (164). O transporte por via transfolicular tem grande potencial para o tratamento tópico, pois proporciona uma penetração e absorção mais profunda dos compostos que a via transepidérmica (intercelular e transcelular), podendo também atingir as glândulas sudoríparas (165,166).

O acúmulo dos fármacos nas unidades foliculares é particularmente importante para o tratamento de doenças localizadas no folículo piloso, como a hidradenite supurativa. O tratamento direcionado potencializa a biodisponibilidade do medicamento, levando ao efeito desejado com pequenas concentrações do fármaco (167). No entanto, os ductos foliculares são reabastecidos por um número de substâncias, em particular o sebo, que pode ocasionar a expulsão do fármaco (168).

Além dos nanossistemas lipídicos, nanopartículas poliméricas têm sido propostas como sistemas carreadores de fármacos para o tratamento de doenças que afetam os folículos pilosos, como acne vulgaris e alopecia areata e androgenética (49,52,169,170). Entretanto, um transporte mais direcionado para os folículos pilosos depende da interação entre o fármaco e o sebo (164). Desta forma, nanocarreadores lipídicos, tais como os CLN, apresentam um caráter lipofílico o que potencialmente torna estes sistemas mais propensos a penetrarem os folículos pilosos por possuírem uma melhor interação dos lipídios da composição e o sebo.

A penetração dérmica de 17α -Estradiol incorporado nos CLN, investigada em células de difusão de *Franz* e microscopia confocal usando CLN marcados com

rodamina, mostrou um acúmulo dos nanocarreadores lipídicos nas porções externas da epiderme, precisamente no folículo piloso (171). A microscopia confocal também confirmou o potencial de fornecimento de espironolactona em CLN marcados com flúor nos folículos pilosos. Nesse estudo, a intensidade da marcação na região folicular foi relativamente mais alta do que na região não folicular, indicando que a via folicular foi a principal via de penetração dos CLN propostos ($p < 0,05$) (172). Da mesma forma, Desai e colaboradores (2014) (167) investigaram a absorção percutânea de ibuprofeno a partir de CLN para verificar se as vias foliculares ou não foliculares predominavam na distribuição de sistemas nanoparticulados. A microscopia confocal mostrou uma fluorescência significativamente maior na pele para as nanopartículas lipídicas em comparação com a solução controle. Uma avaliação demonstrou que os CLN contendo difenilciclopropenona aumentou a captação folicular numa proporção duas vezes maior em comparação com a formulação controle. Ainda, a imagem confocal comprovou a localização dos CLN nos folículos pilosos e lipídios intercelulares do estrato córneo (23).

Nesse sentido, os nanossistemas lipídicos possuem eficácia tópica por direcionarem a liberação dos fármacos para os folículos pilosos quando aplicados topicamente sobre a pele, favorecendo o tratamento da hidradenite supurativa por aumentar a segurança e comodidade para o paciente. Sendo assim, este trabalho propôs a co-encapsulação de fosfato de clindamicina e rifampicina e avaliação do perfil de penetração cutânea dos fármacos nas camadas da pele, em condições normais e com alto conteúdo sebáceo.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Material

O fosfato de clindamicina ($\geq 99,0\%$), rifampicina ($\geq 99,0\%$), ácido fosfórico, marcador de *spin* derivado do ácido esteárico 5-doxil (5-DSA), solução de acetato de uranila a 3% (p/v), ácido esteárico e ácido oleico foram obtidos da Sigma-Aldrich (Steinheim, Alemanha). O metanol utilizado nas análises cromatográficas foi obtido de *J. T. Baker* (Phillipsburg, EUA). A lecitina de soja e o polissorbato 80 foram adquiridos da Lipoid (Ludwigshafen, Alemanha) e Merck (Darmstadt, Alemanha), respectivamente. Para preparação do tampão fosfato foram utilizados fosfato de sódio nas formas monobásica e dibásica (Vetec, Rio de Janeiro, Brasil) e cloreto de sódio (Serva, Rio de Janeiro, Brasil) e as correções de pH foram realizadas com hidróxido de sódio (Dinâmica Química Contemporânea Ltda. São Paulo, Brasil). Para a verificação da eficiência de encapsulação foi utilizado o dispositivo concentrado de amostra (vivaspin[®]2, Sartorius) adquiridos da Analítica (São Paulo, Brasil). A membrana hidrofílica de acetato de celulose (Dialysis Tubing MWCO 12000-14000, Fisherbrand) utilizada nos experimentos de liberação foi obtida da Fisher Cientific (Reino Unido). O esmalte *KIKO-608* (Paris, França) foi utilizado nos experimentos de penetração cutânea que requereram bloqueio das unidades pilossebáceas. Na simulação da pele sebácea foi utilizado o sebo de carneiro *in natura* e o óleo vegetal obtidos no mercado local (Brasília, Brasil). A técnica de *tape-stripping* diferencial aplicada nos estudos de permeação foi realizada usando a fita Scotch n^o. 845 Book Tape (3M, St. Paul, MN, USA) e cola de cianoacrilato (Henkel Loctite, Dublin, Irlanda). Filtros pré-limpos, de diâmetro de 25 mm e poro 0,45 μm , hidrofóbicos e hidrofílicos, foram obtidos da Analítica (São Paulo, Brasil). Todas as análises foram realizadas utilizando água ultrapurificada (Millipore, Illkirch-Graffenstaden, França).

4.1.1 Obtenção da pele de suínos

As orelhas dos suínos utilizadas nos estudos de permeação e penetração cutânea foram gentilmente cedidas pelo frigorífico Nippobras (Formosa, Goiás, Brasil). As orelhas foram obtidas imediatamente após o abate do animal sem que ele tenha passado pelo processo de escalda (Figura 11a). A pele inteira foi removida da

região externa da orelha com auxílio de um bisturi (Figuras 11b e 11c), separada de sua camada adiposa, muscular e vasos sanguíneos com o auxílio de uma tesoura (Figuras 11d e 11e).

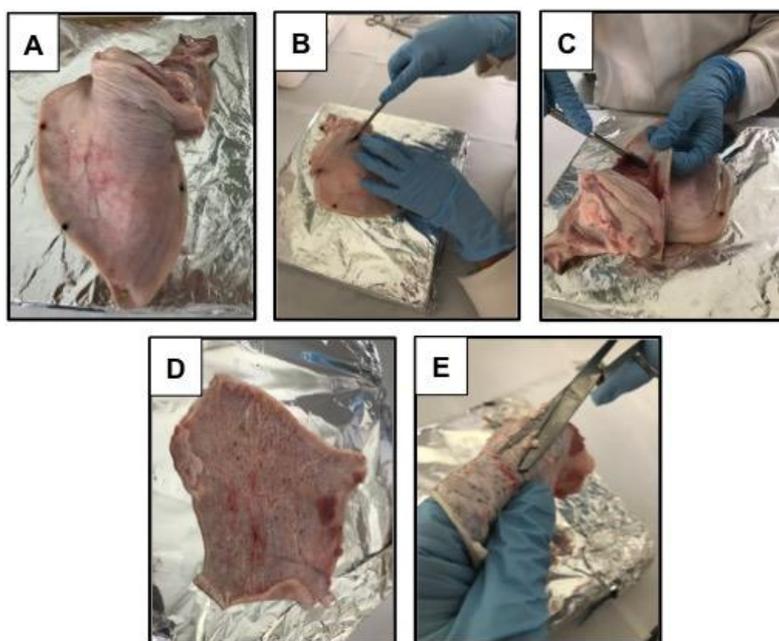


Figura 11. Representação do processo de remoção da pele da orelha de suínos: a orelha fixada em placa de isopor recoberta com papel alumínio (a); a pele da parte superior da orelha de suínos é removida com auxílio de bisturi (b) e (c); pele retirada da orelha de suínos (d) e retirada da camada adiposa, muscular e vasos sanguíneos com auxílio de uma tesoura (e).

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

4.2 Preparação da solução estoque

As soluções estoques de fosfato de clindamicina e rifampicina foram preparadas na concentração de 100 µg/mL em metanol:água (50:50, v/v).

4.3 Padronização e validação do método analítico por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)

O espectro de varredura de comprimento de onda para cada fármaco foi obtido individualmente a partir de suas soluções estoque utilizando um espectrofotômetro (Shimadzu UV Spectrophotometer UV-1800). O escaneamento foi realizado com uma cubeta de quartzo de 10 mm de comprimento óptico. A seleção dos comprimentos de onda foi baseada na absorção máxima no ultravioleta (UV) para cada fármaco e levando também em consideração aquele em que houvesse menor interferência dos contaminantes da pele.

O método analítico foi desenvolvido com o objetivo de obter a melhor resolução dos picos cromatográficos de fosfato de clindamicina e rifampicina com desempenho analítico aceitável. Desta forma, foram testadas duas colunas: (i) Fase reversa-C₈ de 100 mm x 4,6 mm, 5 µm e (ii) Fase reversa-C₁₈ de 150 mm x 4,6 mm, 5 µm, bem como diferentes fases móveis.

4.3.1 Condições cromatográficas

As análises cromatográficas foram realizadas em um sistema CLAE (modelo LC-20AD, Shimadzu, Kyoto, Japão) composto por duas bombas (modelo LC 20-AT), um forno (modelo CTO-20AS), um detector DAD espectrofotométrico (modelo SPD-M20A) e um injetor automático de amostras (modelo 9SIL-20AD). A obtenção dos dados, análises e relatórios foram realizados usando o *software Shimadzu LC*. Como fase estacionária, utilizou-se uma coluna de fase reversa C₁₈ (150 mm x 4,6 mm Shim pack, Shimadzu). A fase móvel consistiu em (A) metanol e (B) ácido fosfórico (0,01 mol/L), em modo gradiente, tempo (min)/A (%)/B (%) como segue: 0,01/45/55, 6/45/55, 6,30/75/25, 9/75/25, 9,30/45/55 e 16/45/55, com vazão de eluição de 1,0 mL/min. O forno foi mantido a 40 °C durante todas as análises, e o fosfato de clindamicina e a rifampicina foram detectados por absorbância a 200 nm e 238 nm, respectivamente. O volume de injeção de cada amostra foi de 10 µL.

4.3.2 Otimização da extração dos fármacos das camadas da pele de suínos

As diferentes condições de extração simultânea de fosfato de clindamicina e rifampicina das três frações da pele (ou seja, estrato córneo, folículos pilosos e pele remanescente) foram testadas. Para isso, utilizou-se a técnica de *tape-stripping* diferencial, como descrito anteriormente na literatura (173,174), para separar as

frações da pele. Em resumo, fragmentos de 2 cm² de pele foram removidos das orelhas de suínos e fixados em um suporte com o estrato córneo voltado para cima. O estrato córneo foi removido utilizando 15 pedaços de fitas adesivas. Em seguida, os folículos pilosos foram removidos aplicando uma gota de cola de cianoacrilato na superfície da pele, seguida pela oclusão com um pedaço de fita adesiva. Após 1 min, a fita foi removida com um único movimento e este procedimento foi repetido mais uma vez para cada fragmento de pele. Finalmente, a pele remanescente foi cortada em pequenos fragmentos com o auxílio da tesoura. Logo em seguida, as diferentes camadas da pele foram colocadas em frascos de vidro protegidos da luz e contaminados com 375 µL da solução estoque (equivalente a 37,5 µg de cada fármaco). Em seguida, o solvente foi evaporado e diferentes protocolos de extração foram aplicados, conforme ilustrado na Figura 12. Em seguida, as amostras foram filtradas em membranas de 0,45 µm e levadas para análise seguindo o método por CLAE.

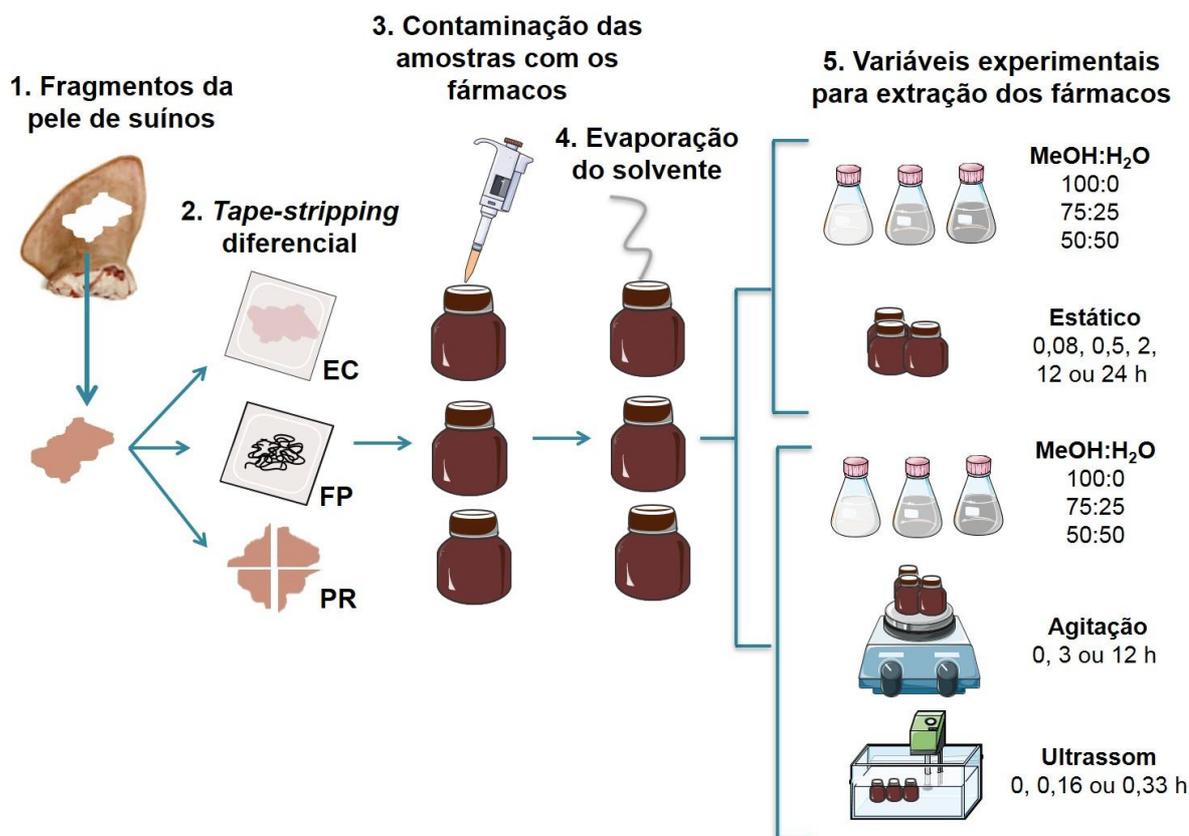


Figura 12. Representação da técnica de *tape-stripping* diferencial e os métodos de extração testados para a recuperação de fosfato de clindamicina e rifampicina das camadas da pele: estrato córneo (EC), folículos pilosos (FP) e pele remanescente (PR). Fonte: Autoria própria.

Após alguns testes iniciais com variáveis de extração, um primeiro planejamento fatorial para a extração dos fármacos das três camadas da pele foi realizado, variando a composição do solvente de extração em três níveis e o tempo de extração em cinco níveis, conforme descrito na Tabela 2.

Tabela 2. Desenho fatorial para avaliação do método de extração do fosfato de clindamicina e rifampicina das camadas da pele (estrato córneo, folículos pilosos e pele remanescente).

Análise	Concentração de metanol (%)	Tempo de repouso (horas)
1	0,50	0,08
2	0,75	0,08
3	1,00	0,08
4	0,50	0,50
5	0,75	0,50
6	1,00	0,50
7	0,50	2,00
8	0,75	2,00
9	1,00	2,00
10	0,50	12,00
11	0,75	12,00
12	1,00	12,00
13	0,50	24,00
14	0,75	24,00
15	1,00	24,00

Posteriormente, foi realizado um segundo planejamento fatorial, especificamente para a extração da rifampicina da pele remanescente, adicionando os fatores de agitação magnética e o uso de banho de ultrassom (Tabela 3). Todos os ensaios foram realizados em duplicata em ordem aleatória. Os possíveis modelos matemáticos foram examinados usando análise de variância *one-way* (ANOVA *one-way*) com um nível de significância fixado em 0,05 para determinação da melhor condição de análise. O modelo de melhor adaptação foi selecionado para cada resposta com base nos valores F e p, e as equações preditivas contendo apenas termos significativos foram construídas a partir da análise de regressão múltipla usando o *software Design-Expert versão 8* (Stat-Ease, Minneapolis, MN, EUA).

Tabela 3. Desenho fatorial para obtenção do método de extração da rifampicina da pele remanescente.

Análise	Concentração de metanol (%)	Tempo de agitação magnética (horas)	Tempo de ultrassom (horas)
1	0,50	0	0
1	0,50	3,00	0
3	0,50	12,00	0
4	0,50	0	0,16
5	0,50	3,00	0,16
6	0,50	12,00	0,16
7	0,50	0	0,33
8	0,50	3,00	0,33
9	0,50	12,00	0,33
10	0,75	0	0
11	0,75	3,00	0
12	0,75	12,00	0
13	0,75	0	0,16
14	0,75	3,00	0,16
15	0,75	12,00	0,16
16	0,75	0	0,33
17	0,75	3,00	0,33
18	0,75	12,00	0,33
19	1,00	0	0
20	1,00	3,00	0
21	1,00	12,00	0
22	1,00	0	0,16
23	1,00	3,00	0,16
24	1,00	12,00	0,16
25	1,00	0	0,33
26	1,00	3,00	0,33
27	1,00	12,00	0,33

4.3.3 Validação do método

A confiabilidade e o desempenho analítico do método por CLAE foram validados avaliando os parâmetros de seletividade, linearidade, limite de detecção (LD), limite de quantificação (LQ), precisão e exatidão de acordo com as diretrizes da *International Conference on Harmonization (ICH)* (175).

4.3.3.1 Seletividade

A técnica de *tape-stripping* diferencial (já descrita na seção 4.3.2) foi utilizada para separar os fragmentos da pele em três camadas (estrato córneo, folículos pilosos e pele remanescente). Uma solução de fosfato de clindamicina e rifampicina (na concentração de 7,5 µg/mL para cada fármaco) em metanol:água (50:50, v/v) contendo ou não cada um dos contaminantes da pele foi preparada para avaliar a capacidade do método de quantificar e distinguir os fármacos dos interferentes da pele. Os experimentos foram realizados em seis repetições para cada amostra. Os resultados foram analisados usando ANOVA comparando as áreas do pico e os tempos de retenção.

4.3.3.2 Linearidade

As soluções de fosfato de clindamicina e rifampicina foram preparadas em triplicata a partir de três soluções estoque distintas. Alíquotas dessas soluções foram diluídas em metanol:água (50:50, v/v) para obter uma curva de calibração com as concentrações de 0,5; 2,0; 5,0; 7,5; 10,0; 15,0 e 20 µg/mL. As curvas de calibração para a concentração *versus* a área do pico foram plotadas para fosfato de clindamicina e rifampicina, separadamente, e ajustadas usando a regressão linear de mínimos quadrados. Os testes de significância e proporcionalidade dos coeficientes angulares foram avaliados com base na variância residual, utilizando o teste *t Student* ($p = 0,05$). Os fatores de resposta foram calculados considerando a razão entre a área do pico e a concentração dos analitos. Os resíduos foram calculados com base na diferença entre valores teóricos e experimentais (176). Os resultados dos valores dos pratos teóricos foram obtidos diretamente no *software* do equipamento.

4.3.3.3 LD e LQ

A concentração mínima de fosfato de clindamicina e rifampicina a ser detectada e também quantificada com precisão e exatidão (LD e LQ, respectivamente) foi calculada com base no desvio padrão (DP) e na inclinação da curva de calibração (IC), preparada conforme descrito na seção 4.3.3.2, de acordo com as equações (1) e (2) (175,177):

$$LD = \frac{3,3 \times DP}{IC} \quad (\text{Equação 1})$$

$$LQ = \frac{10 \times DP}{IC} \quad (\text{Equação 2})$$

4.3.3.4 Precisão

A precisão do método foi determinada pela repetibilidade instrumental, repetibilidade do método (precisão intra-dia) e precisão intermediária (precisão inter-dia) para cada fármaco. A repetibilidade instrumental foi determinada utilizando a mesma amostra na concentração de 7,5 µg/mL, para os dois fármacos, em seis análises (178). A repetibilidade do método foi avaliada a partir de amostras autênticas usando seis repetições na mesma concentração dos fármacos. A precisão inter-dia foi avaliada usando amostras autênticas (7,5 µg/mL) em seis repetições, cada uma analisada por diferentes analistas em dois dias diferentes. As concentrações de fosfato de clindamicina e rifampicina foram então determinadas e os coeficientes de variação entre os grupos foram calculados (175).

4.3.3.5 Exatidão

A exatidão do método foi avaliada com base na porcentagem de fosfato de clindamicina e rifampicina recuperadas do estrato córneo, folículos pilosos e pele remanescente utilizando o método otimizado de extração. Todos os ensaios foram realizados com seis repetições das amostras de fosfato de clindamicina e rifampicina (7,5 µg/mL).

Primeiramente, os fragmentos das camadas da pele foram separados seguindo a técnica de *tape-stripping* diferencial descrita anteriormente (seção 4.3.2). As amostras de uma solução de fosfato de clindamicina e rifampicina em metanol:água (50:50, v/v) foram aplicadas nas superfícies das diferentes camadas de pele (volume equivalente a 37,5 µg de cada fármaco). O solvente foi completamente evaporado e 5 mL de metanol foram adicionados a cada fragmento da pele, que foram deixados em repouso durante 24 h. Após este período, as

amostras contendo estrato córneo e folículos pilosos foram filtradas através de uma membrana de 0,45 μm . As amostras contendo fragmento da pele remanescente foram mantidas sob agitação magnética por mais 9 h e então filtradas através de uma membrana de 0,45 μm .

Finalmente, todas as amostras foram analisadas por CLAE-UV, seguindo a metodologia descrita acima. A exatidão foi calculada como a porcentagem de fosfato de clindamicina e rifampicina recuperada das camadas da pele (179).

4.4 Estudos de compatibilidade entre fosfato de clindamicina e rifampicina

4.4.1 Preparo das amostras

Os estudos de compatibilidade foram realizados por meio da análise das características térmicas dos fármacos de forma individual e em mistura física na proporção 1:1 (m/m). Além disso, os compostos separados e misturados foram submetidos ao processo de umectação seguido de aquecimento das amostras até 80 °C, para simular o processamento térmico no desenvolvimento farmacotécnico dos nanocarreadores lipídicos (Tabela 4). As amostras foram submetidas aos estudos de compatibilidade que seguem.

Tabela 4. Resumo das composições das amostras contendo ou não os fármacos e procedimento farmacêutico, fosfato de clindamicina (CDM) e rifampicina (RIF).

Amostra	Composição (% p/p)		Processamento farmacêutico	Representação
	CDM	RIF		
A1	100	0	Não	
A2	0	100	Não	
A3	50	50	Não	
A4	100	0	Sim	
A5	0	100	Sim	
A6	50	50	Sim	

4.4.2 Análise térmica

4.4.2.1 Calorimetria de varredura diferencial (DSC)

As análises de DSC foram realizadas em um DSC-60 (Shimadzu®, Tokyo, Japan), sob atmosfera controlada de nitrogênio com vazão de 50 mL/min. As amostras de aproximadamente 3 mg foram analisadas sob uma taxa de aquecimento de 5 °C/min de 25 a 300 °C.

As fotomicrografias das amostras sem prévio tratamento térmico (amostras A1, A2 e A3) foram obtidas a partir de DSC-fotovisual utilizando o mesmo protocolo citado acima.

Adicionalmente, foram realizados ciclos de aquecimento-resfriamento-aquecimento nas amostras A1, A2 e A3 empregando o seguinte protocolo: aquecimento de 25 a 195 °C (5 °C/min) para as amostras A1 e A3 e aquecimento de 25 a 210 °C (5 °C/min) para a amostra A2, resfriamento até -40 °C (-5 °C/min) e novo aquecimento até 300 °C (5 °C/min) para as amostras A1, A2 e A3.

Todas as medições térmicas foram realizadas usando o *software* TA-60 Shimadzu®.

4.4.2.2 Análise termogravimétrica (TGA)

As avaliações TGA foram realizadas usando um DTG-60H (Shimadzu, Japão). As amostras foram pesadas (3 – 5 mg) em cadinhos de platina em atmosfera de nitrogênio com vazão de 50 mL/min e velocidade de aquecimento de 10 °C/min no intervalo entre 25 a 400 °C. Todas as medições térmicas foram realizadas usando o *software* TA-60 Shimadzu®.

4.4.3 Espectroscopia no Infravermelho com Transformada de Fourier e Refletância Total Atenuada (ATR-FTIR)

As análises de todas as amostras por FTIR foram realizadas usando um espectrômetro Vari 640-IR FTIR (Varian Inc., Brasil). Os espectros foram registrados entre 4.000 e 600 cm⁻¹ com uma resolução óptica de 4 cm⁻¹, utilizando um acessório

de imagem ATR. Os espectros resultantes foram analisados considerando o coeficiente de correlação (r) entre as amostras com base nas bandas correspondentes aos grupos funcionais dos fármacos, utilizando o *software Essential FTIR* (Operant LLC, EUA) (180).

4.4.4 Difração de raios X do pó

Os espectros de difração de raios X do pó (do inglês *X-ray powder diffraction*, XRPD) das amostras utilizadas no estudo foram obtidos com um difratômetro *Rigaku Ultima IV* equipado com uma lâmpada de cobre usando radiação de 35 kV e 15 mA. Os espectros foram analisados no *Software Jade 9*. A velocidade de varredura foi de 2°/min com incremento de 0,02°/min. Os padrões de difração foram obtidos em ângulos entre 5 e 60° ($\theta - 2\theta$).

4.4.5 Análises morfológicas

As características morfológicas das amostras utilizadas no estudo foram verificadas por análise das imagens obtidas por microscopia óptica usando um estereoscópio (Laborana/SZ - SZT, China) acoplado a uma câmera de vídeo. O processamento das imagens foi realizado utilizando um *software ISCapture*, versão 2.2.1. A morfologia das amostras previamente revestidas com ouro também foi analisada em imagens obtidas por microscopia eletrônica de varredura (MEV, Microscópio Eletrônico de Varredura JEM 1011, JEOL, Tóquio, Japão - 100 kV).

4.5 Preparação de uma solução de fosfato de clindamicina e rifampicina

Os CLN desenvolvidos neste trabalho tiveram seus perfis de liberação e permeação comparados com os de uma solução contendo os dois fármacos livres (fosfato de clindamicina e rifampicina). Para isso, 4 mg de cada fármaco foram dissolvidos em 15 mL de tampão fosfato, pH 6,5, resultando em uma solução na concentração de 266,67 $\mu\text{g/mL}$ para cada fármaco.

4.6 Desenvolvimento e caracterização dos CLN contendo fosfato de clindamicina e rifampicina

4.6.1 Obtenção das formulações

Os CLN foram obtidos seguindo o método da diluição de microemulsão (181,182) usando água como fase externa e uma mistura oleosa (lipídios líquidos e sólidos) como fase interna. Dessa forma, 300 mg de lipídio sólido (ácido esteárico) e 100 mg de lipídio líquido (ácido oleico) foram misturados aos tensoativos, ou seja, 200 mg de lecitina de soja S100 e 50 mg de Tween[®] 80 (polissorbato 80) (Figura 13).

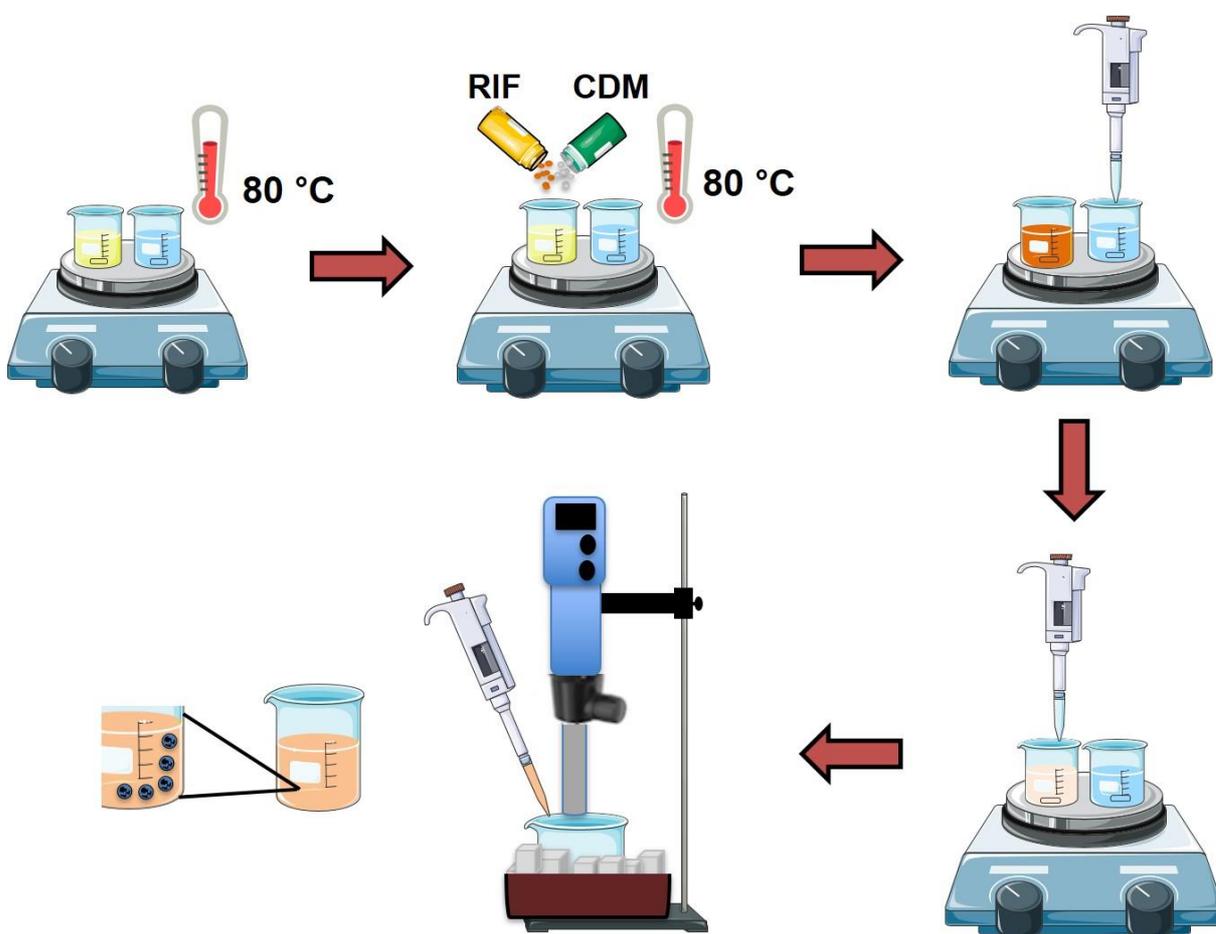


Figura 13. Esquema representativo do preparo dos CLN contendo fosfato de clindamicina (CDM) e rifampicina (RIF). Fonte: Autoria própria.

A mistura de lipídios com os tensoativos foram então aquecidos a 80 °C para garantir a completa fusão de todos os componentes. Posteriormente, foram

adicionados os fármacos (fosfato de clindamicina e rifampicina) em diferentes quantidades (Tabela 5) e o sistema foi mantido sob agitação (800 rpm) durante 10 min. O passo seguinte foi a adição de 250 μ L de água (aquecida a 80 °C) sob agitação (500 rpm) para formar uma microemulsão. Em seguida, a microemulsão foi dispersa em 14 mL de solução tampão fosfato, pH 6,5, e mantida em banho de gelo (5 °C) sob agitação vigorosa (16.000 rpm por 20 min) usando um Ultra-Turrax® (IKA-Werk GmbH & Co, Alemanha).

Os CLN sem a adição dos fármacos também foram produzidos para comparações com os CLN contendo fosfato de clindamicina e rifampicina.

Tabela 5. Quantidade de fosfato de clindamicina (CDM) e rifampicina (RIF) adicionado durante processo de produção dos CLN (CLN CDM-RIF).

	Amostra	CDM (mg)	RIF (mg)
CLN CDM-RIF	1	4	4
	2	6	6
	3	8	8

4.6.2 Caracterização dos nanocarreadores lipídicos

Os nanocarreadores lipídicos foram caracterizados por meio da determinação do diâmetro hidrodinâmico médio, da distribuição de tamanho (índice de polidispersividade), do potencial zeta, do pH, da morfologia, da recuperação dos fármacos, da eficiência de encapsulação e da carga dos fármacos, de acordo com as metodologias descritas abaixo.

4.6.2.1 Diâmetro hidrodinâmico e índice de polidispersividade

O diâmetro hidrodinâmico dos CLN com e sem os fármacos, bem como o índice de polidispersividade foram analisados por espalhamento de luz dinâmica de 1 mL das suspensões dos CLN por diluições de (1:100) (v/v) em um equipamento Zetasizer Nano (NANO ZS90, Malvern, Worcestershire, Reino Unido).

4.6.2.2 Potencial zeta

O potencial zeta dos nanocarreadores lipídicos, contendo ou não os fármacos, foi analisado por mobilidade eletroforética, utilizando o equipamento

Zetasizer Nano (NANO ZS90, Malvern, Worcestershire, Reino Unido). Antes da leitura, as amostras foram diluídas em solução aquosa contendo NaCl 10 mmol/L para assegurar os valores de condutividade de, aproximadamente, 2 mS/cm, requerido pela técnica.

4.6.2.3 pH

O pH da dispersão dos nanocarreadores lipídicos desenvolvidos foi determinado utilizando eletrodo para amostras líquidas do equipamento pHmetro (Digimed, modelo DM-22, São Paulo, Brasil).

4.6.2.4 Morfologia

A morfologia dos nanocarreadores lipídicos foi avaliada por microscopia eletrônica de transmissão (MET, JEM 1011 Microscópio Eletrônico de Transmissão, JEOL, Tóquio, Japão - 100 kV) para os CLN sem os fármacos e os CLN contendo fosfato de clindamicina e rifampicina pelo método de contrastação. Os nanocarreadores lipídicos foram diluídos (1:200 v/v) para realização das análises. Para preparar as amostras, alíquotas de 20 µL das amostras diluídas foram depositadas em uma grade de cobre revestida com *formvar* (Electron Microscopy Sciences, PA, EUA) e submetidas a secagem por 10 min em temperatura ambiente. Depois disso, 20 µL da solução de acetato de uranila a 3% (p/v) foram adicionados e submetidos a secagem por mais 10 min. Ao final desse tempo, o excesso foi removido com papel filtro. As imagens foram capturadas com uma câmera GATAN BioScan (modelo 820, GATAN, PA, EUA), utilizando o *software* Digital Micrograph 3.6.5 (GATAN, PA, EUA).

4.6.2.5 Processo de recuperação dos fármacos

A primeira etapa do processo determinou o fármaco total por meio da dissolução dos nanocarreadores lipídicos em metanol (1:10 v/v). As amostras foram então colocadas sob agitação em vórtex (IKA-lab dancer) por 60 seg e, por fim, foram diluídas em tampão fosfato pH 6,5 (1:20 v/v). Após filtração, os fármacos das amostras foram quantificados por CLAE (Figura 14).

A recuperação dos fármacos foi calculada em porcentagem (%) comparando o fármaco total com a quantidade dos fármacos que foram adicionados na produção dos nanocarreadores lipídicos:

$$\text{REC\%} = \frac{\text{FT}}{\text{FA}} \times 100 \quad (\text{Equação 3}),$$

Onde: REC% é a quantidade de fármaco recuperado; FT é o fármaco total; e FA é quantidade de fármaco adicionada.

4.6.2.6 Eficiência de encapsulação

A determinação da eficiência de encapsulação dos fármacos foi realizada em duas etapas. A primeira etapa foi a determinação do fármaco total como mencionado no item anterior (Figura 14).

Na segunda etapa, procedeu-se os experimentos para determinação do fármaco livre, em que foram transferidos 400 μL das formulações dos nanocarreadores lipídicos para um dispositivo com tamanho de poro definido em 10 kDa (Vivaspin 2, 100000, MWCO HY, Sartorio, Goettingen, Alemanha). As amostras foram centrifugadas (Hermle Labortechnik GmbH, Wehingen, Alemanha) por 10 min a 2700 G. Ao final, uma diluição (1:50 v/v) da alíquota do filtrado foi realizada, para posterior análise quantitativa dos fármacos em CLAE (Figura 14).

A quantidade de fosfato de clindamicina e rifampicina encapsulada nos nanocarreadores lipídicos foi determinada pela diferença entre a concentração inicial de fármaco, fármaco total, e a concentração dos fármacos não encapsulados, fármaco livre. A eficiência de encapsulação, então, foi calculada de acordo com a seguinte equação:

$$\text{EE} = \frac{\text{FT} - \text{FL}}{\text{FT}} \times 100 \quad (\text{Equação 4}),$$

onde: EE é a eficiência de encapsulação dos fármacos nos nanocarreadores lipídicos; FL é a concentração de fosfato de clindamicina e rifampicina que não foi encapsulada nos nanocarreadores e FT é a concentração de fosfato de clindamicina e rifampicina nos nanocarreadores.



Figura 14. Representação do protocolo de eficiência de encapsulação em duas etapas. Etapa 1 - determinação do fármaco total dos nanocarreadores lipídicos e etapa 2 - determinação do fármaco livre com dispositivo com tamanho de poro definido. Fonte: Autoria própria.

4.6.2.7 Carga dos fármacos

A carga dos fármacos relaciona a quantidade de fármaco encapsulado pela quantidade de lipídio empregado na formulação, e foi calculada utilizando a seguinte equação:

$$CF = \frac{FT - FL}{Q_{\text{lipídios}}} \times 100 \quad (\text{Equação 5}),$$

onde: CF é a carga do fármaco; FT é o fármaco total; FL é o fármaco livre e $Q_{\text{lipídios}}$ são a quantidade total de lipídios na formulação.

4.7 Determinação da influência do fosfato de clindamicina e rifampicina na dinâmica dos lipídios do CLN

A dinâmica dos lipídios que compõem a matriz dos CLN foi avaliada em ensaios de espectroscopia de ressonância paramagnética eletrônica (RPE) por meio do parâmetro espectral $2A_{\parallel}$ para o marcador de *spin* 5-DSA (Figura 15), como descrito anteriormente (183).

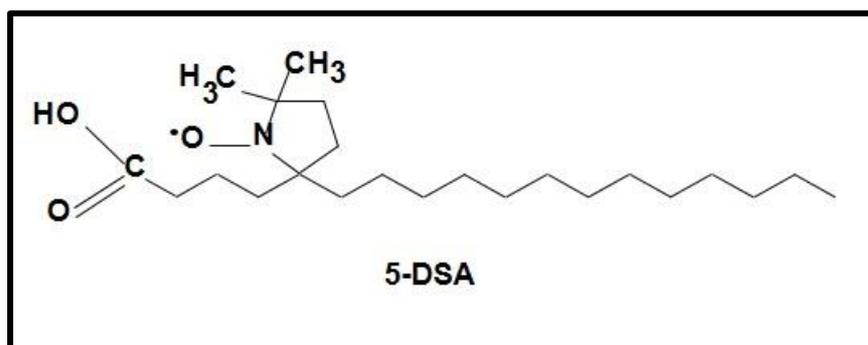


Figura 15. Estrutura química do marcador de *spin* 5-DSA.

Uma alíquota de 1 μ L de uma solução estoque de 5-DSA (possuindo o grupo doxil [radical nitróxido] ligado no 5º átomo de carbono da cadeia acila) (Figura 15) dissolvido em etanol (5 mg/mL) foi adicionada às dispersões contendo os CLN sem os fármacos e com os fármacos (fosfato de clindamicina e rifampicina). Logo em seguida, as amostras foram incubadas durante 30 min, à temperatura ambiente, e agitadas suavemente. A concentração de etanol (menor que 2%), não altera significativamente a fluidez dos nanocarreadores lipídicos (Figura 16) (184).

Para melhorar o procedimento de marcação, as amostras foram suavemente agitadas e depois introduzidas em tubos capilares com diâmetro interno de 1 mm, que foram selados à chama para análise de espectroscopia de RPE. Para evitar qualquer interação entre marcadores próximos, foi determinada a proporção mínima de lipídios:marcador de 100:1.

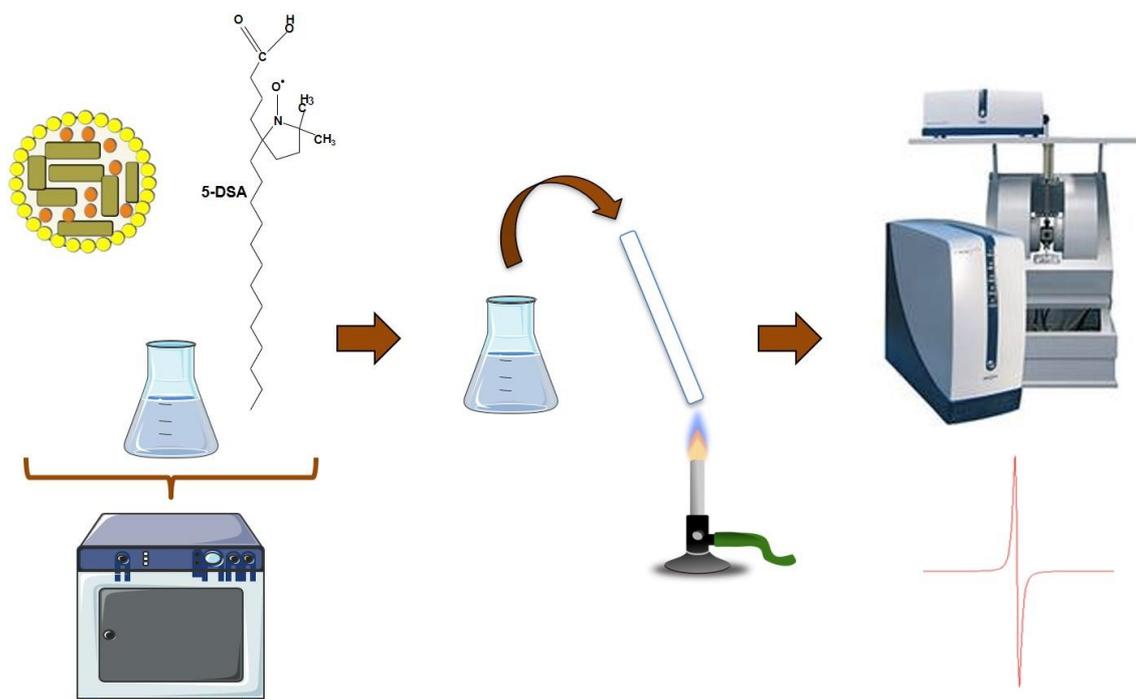


Figura 16. Representação esquemática do processo de avaliação da influência do fosfato de clindamicina e rifampicina na dinâmica dos lipídios dos CLN na superfície da matriz marcada com *spin* 5-DSA por meio da técnica de espectroscopia de RPE. Fonte: Autoria própria.

A Figura 17 ilustra como o marcador de *spin* (5-DSA) se insere na matriz lipídica e a localização do grupo paramagnético.

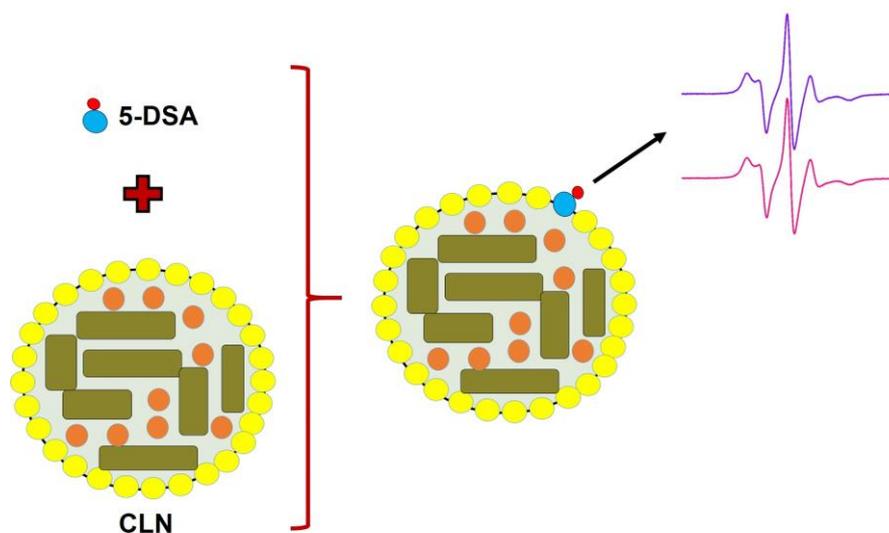


Figura 17. Representação esquemática da localização do marcador de *spin* 5-DSA nos nanocarreadores lipídicos. Fonte: Autoria própria.

As medições de espectroscopia de RPE foram realizadas a 25 ± 1 °C usando um espectrômetro *Bruker*[®] *ESP300* (Rheinstetten, Alemanha), operando na banda X (9,4 GHz) com uma cavidade ressonante ER4102 ST e os seguintes parâmetros instrumentais: potência de microondas, 2 mW; frequência de modulação, 100 kHz; amplitude de modulação, 1,0 G; varredura de campo magnético, 100 G; tempo de varredura, 168 s e constante de tempo de detecção de 41 ms.

4.8 Estudos de estabilidade

Os estudos de estabilidade dos nanocarreadores lipídicos foram conduzidos utilizando alíquotas de CLN contendo os fármacos (fosfato de clindamicina e rifampicina) armazenadas na geladeira em frascos de vidro âmbar à temperatura de 5 ± 3 °C. Durante intervalos predeterminados (0, 7, 15, 30 e 60 dias), o estudo tinha como finalidade observar possíveis alterações no diâmetro hidrodinâmico médio, índice de polidispersividade, potencial zeta, pH e teor de fármacos encapsulados. Ao final de cada período de análise, fotografias foram registradas para avaliação da coloração da formulação. Os estudos foram realizados em triplicata.

4.9 Estudos *in vitro* de liberação de fosfato de clindamicina e rifampicina a partir dos nanocarreadores lipídicos

O perfil de liberação do fosfato de clindamicina e da rifampicina a partir dos nanocarreadores lipídicos foi determinado em quintuplicata e comparado à difusão dos fármacos livres quando em solução. As células de difusão do tipo *Franz* modificadas (Figura 18) foram montadas com uma membrana de acetato de celulose separando os compartimentos doadores dos compartimentos receptores.

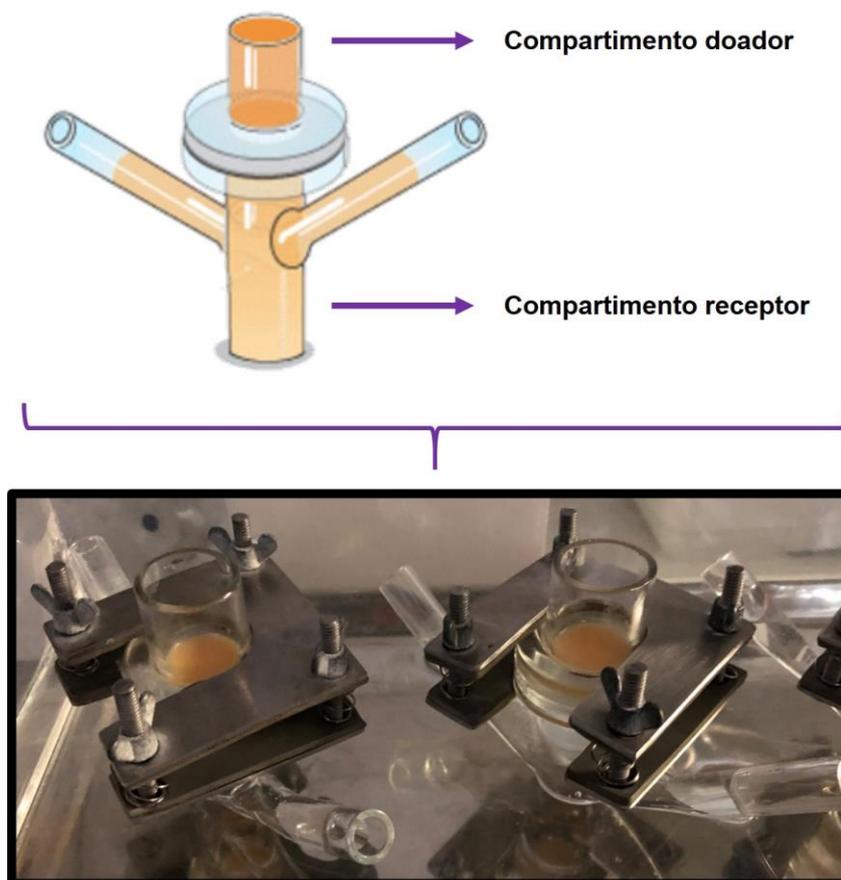


Figura 18. Representação ilustrativa das células de difusão do tipo *Franz* modificadas. Fonte: Autoria própria.

Para isso, sobre as membranas (compartimento doador) foi colocado 1 mL da dispersão dos nanocarreadores lipídicos (CLN contendo fosfato de clindamicina e rifampicina) ou da solução contendo os fármacos (preparada de acordo com o *item 4.5*), usada como controle. O compartimento receptor foi preenchido com 15 mL de solução tampão fosfato, pH 7,4 (garantindo as condições *sink*), mantida a 32 °C durante todo o tempo de experimento e sob agitação por um período de 12 h. A cada hora, uma alíquota de 1 mL da solução receptora foi removida e igual volume de solução tampão fosfato, pH 7,4, foi imediatamente repostado.

As alíquotas foram filtradas em seringas acopladas a membranas de porosidade de 0,45 μm . Posteriormente, a quantidade de fármaco liberada em cada tempo de coleta foi determinada por CLAE-UV, seguindo o método previamente validado.

O perfil de liberação de fosfato de clindamicina e rifampicina a partir desses nanocarreadores lipídicos foi analisado e comparado com a solução controle por meio de métodos gráficos relacionando a quantidade liberada dos fármacos (μg) em

função do tempo (h). Os resultados foram analisados usando ANOVA comparando todos os grupos em todos os tempos do estudo.

A equação abaixo foi utilizada para determinação da quantidade de fármaco liberada (μg) que se difundiu pela membrana de acetato de celulose em função do tempo (h):

$$Q_{\text{realt}} = C_{\text{mensurado}} \times V_r + V_a \times \sum^{n-1} C_a \quad (\text{Equação 6}),$$

onde: Q_{realt} , representa a quantidade real liberada acumulada no tempo t; $C_{\text{mensurada}}$ é a concentração mensurada dos fármacos no tempo t; V_r é o volume do compartimento receptor (15 mL); V_a é o volume de amostra coletada (1 mL) e C_a é a concentração dos fármacos na amostra removida.

Além disso, a cinética de liberação dos fármacos (fosfato de clindamicina e rifampicina) dos nanocarreadores lipídicos foi analisada segundo os modelos matemáticos de ordem zero, modelo de *Higuchi*, modelo de primeira ordem, *Hixson Crowell* e *Weibull* segundo as equações descritas na Tabela 6 abaixo:

Tabela 6. Modelos matemáticos aplicados ao estudo cinético de liberação.

Modelos matemáticos	Fórmula
Ordem zero	$Q_t = Q_0 + K_0 t$
Modelo de Higuchi	$Q_t = K_H t^{1/2}$
Primeira ordem	$\ln Q_t = \ln Q_0 - k_1 t$
Hixson Crowell	$Q_0^{1/3} - Q_t^{1/3} = K_s t$
Weibull	$\log[-\ln(1-(Q_t/Q_\infty))] = b \times \log t - \log a$

Q_t é a quantidade de fármaco liberado ao tempo t; Q_0 é a quantidade inicial de fármaco no tempo zero; a representa um parâmetro de escala relacionado com tempo decorrido de ensaio; b é o parâmetro de forma; K_0 é a constante de liberação de ordem zero; K_H é a constante de liberação de Higuchi; K_1 é a constante de liberação de primeira ordem; K_s é uma constante que incorpora a relação superfície/volume e t é o tempo do ensaio.

Basicamente, a cinética de liberação dos fármacos a partir dos nanocarreadores lipídicos testados foi analisada da seguinte forma: ordem zero (porcentagem cumulativa do fármaco liberado *versus* tempo), primeira ordem (log da porcentagem acumulada do fármaco restante *versus* tempo), *Higuchi* (porcentagem

acumulada da liberação do fármaco *versus* raiz quadrada do tempo), *Hixson Crowell* (está relacionado com a massa da molécula do fármaco inicialmente e no tempo t além da área superficial e o volume da molécula do fármaco) e *Weibull* (log da porcentagem liberada acumulada *versus* log do tempo).

A escolha do modelo cinético que melhor descreveu a liberação de cada fármaco baseou-se na análise do coeficiente de correlação linear obtido aplicando cada um deles, sendo considerado o mais apropriado aquele que apresentou o coeficiente mais próximo de um.

4.10 Ensaios *in vitro* de penetração cutânea

4.10.1 Determinação das interações entre CLN e o estrato córneo

As interações entre os nanocarreadores lipídicos e o estrato córneo também foram analisadas por meio da técnica de espectroscopia de RPE.

As amostras de estrato córneo foram obtidas de ratos recém-nascidos (menos de 24 h) da raça *Wistar* que seriam descartados e foram cedidos pelo biotério central da Universidade Federal do Goiás (UFG). Os experimentos foram conduzidos no Instituto de Física da Universidade Federal de Catalão. As peles foram removidas com tesoura e bisturi e foram lavadas. Em seguida, foram colocadas em água destilada para hidratação e logo depois estendidas sobre papel filtro com a parte externa em contato com o papel. Depois, foram colocadas em um suporte que foi introduzido em um sistema de dessecador, o qual mantinha em seu interior um recipiente contendo hidróxido de amônio. Após, as amostras foram colocadas em um recipiente com água destilada e deixadas por mais 2 horas, com as superfícies internas em contato com a água com a finalidade de formar bolhas na pele, entre a epiderme e o estrato córneo. Após esse tempo, as peles foram novamente colocadas em contato com o papel filtro, agora com o lado interno da epiderme em contato com o papel e friccionadas contra o papel. Com este procedimento foi possível separar o estrato córneo das camadas mais internas da pele.

A marcação do estrato córneo foi realizada com uma alíquota de 1 μL da solução-estoque do marcador de *spin* 5-DSA a 5 mg/mL que foi colocada em uma placa de vidro. Após a evaporação do solvente, o estrato córneo (1,5 cm^2) foi

previamente hidratado com 50 μL de solução salina tamponada com acetato (acetato 10 mmol/L, NaCl 150 mmol/L e EDTA 1 mmol/L, pH 5,1) e, então, colocado na placa contendo 5-DSA. Logo sem seguida, foi esfregado suavemente em um suporte, de acordo com o método já descrito por Anjos et al. (2008) (185) (Figura 19).

Finalmente, as membranas marcadas no estrato córneo foram incubadas por 1 h em 50 μL de (a) uma solução de fosfato de clindamicina, (b) uma solução de rifampicina, (c) CLN (sem os fármacos) e (d) CLN com os fármacos. Logo depois, as amostras foram introduzidas em tubos capilares, que foram selados à chama para medições de espectroscopia de RPE (Figura 19), como descrito na seção 4.7.

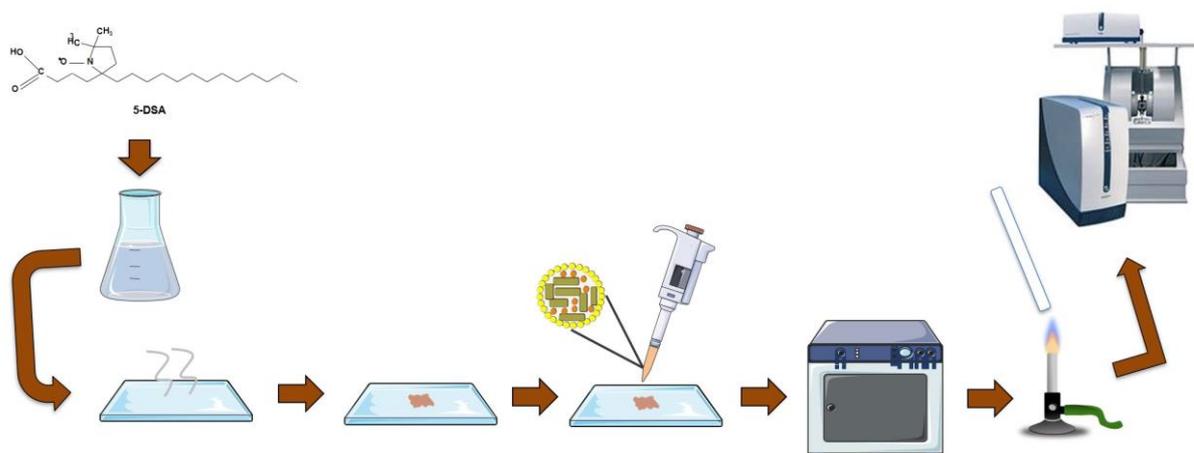


Figura 19. Representação esquemática da medição das interações entre o CLN e o estrato córneo por espectroscopia de RPE. Fonte: Autoria própria.

4.10.2 Avaliação do perfil de permeação e penetração cutânea

4.10.2.1 Experimentos em pele convencional

Em uma primeira série de experimentos *in vitro* de permeação e penetração cutânea utilizou-se o modelo de pele intacta (denominada pele convencional, Figura 20a), enquanto em uma segunda série de experimentos utilizou-se o modelo de pele com obstrução dos orifícios foliculares, como descrito anteriormente (21), com o objetivo de estabelecer o papel da via folicular para a permeação dos fármacos livres ou encapsulados nos CLN. Um microscópio óptico (Laborana/SZ - SZT, China) foi utilizado para localizar os folículos pilosos e garantir a correta aplicação de um esmalte com o auxílio de uma seringa pequena (denominado folículos obstruídos,

Figura 20b).

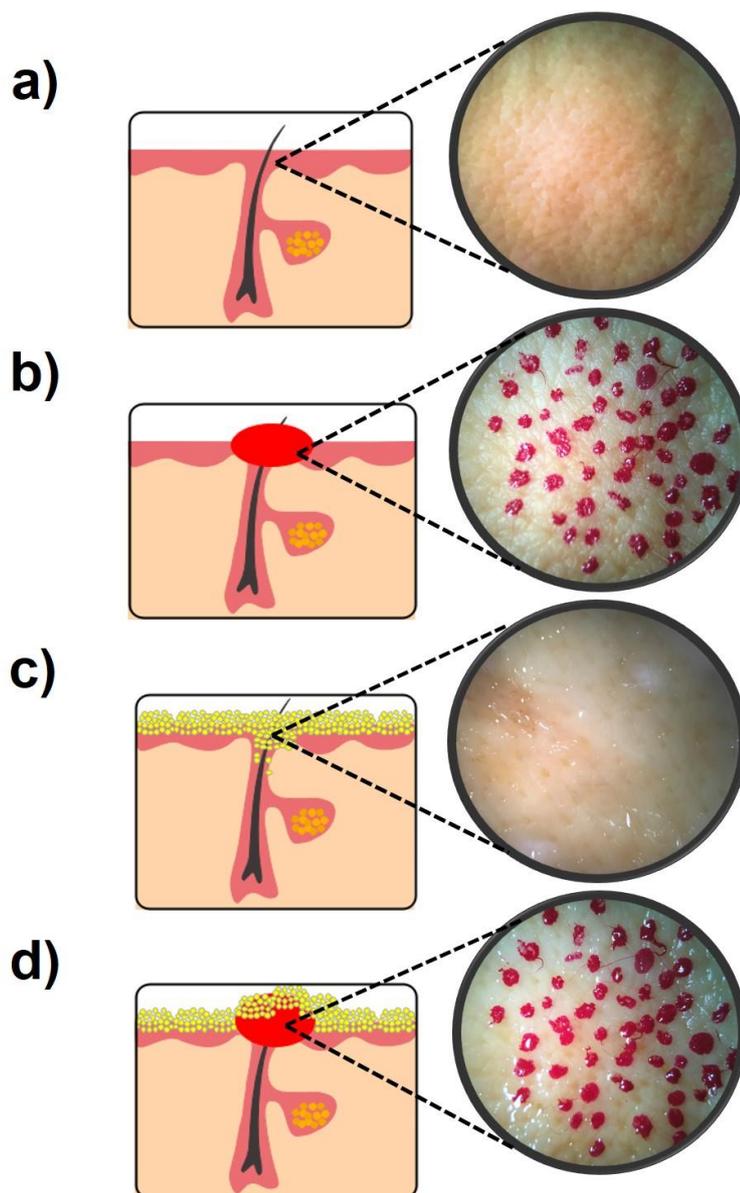


Figura 20. Representação esquemática do processamento da pele de suínos: pele convencional (a), folículos obstruídos (b), pele sebácea (c) e folículos obstruídos na pele sebácea (d). Fonte: Autoria própria.

Tanto a pele convencional quanto a pele com folículos obstruídos foram acopladas em células de difusão do tipo *Franz* modificadas (área de difusão = 1,3 cm²), separando o compartimento doador do compartimento receptor. O compartimento receptor foi preenchido com 15 mL de uma solução tampão fosfato, pH 7,4. Esta solução receptora foi mantida em agitação magnética constante a 300 rpm e em banho termostatizado a 32 °C (Figura 21).

O compartimento doador foi preenchido com 1 mL da solução controle de fosfato de clindamicina e rifampicina ou dos CLN contendo fosfato de clindamicina e rifampicina. Todos os experimentos foram conduzidos por 24 h usando pelo menos 4 replicatas de cada formulação e condição de pele.

Ao final de cada série de experimentos, a solução receptora foi retirada das células de difusão e analisada quanto ao conteúdo de fosfato de clindamicina e rifampicina permeado. Cada fragmento de pele foi removido da célula de difusão e colocado em uma superfície plana com o estrato córneo voltado para cima. A superfície da pele foi limpa com uma gaze embebida em água e o estrato córneo foi removido com a aplicação de 15 fitas adesivas de maneira sucessiva. Essas fitas foram colocadas em um frasco de vidro. Logo depois, somente para a pele convencional, uma gota de cola de cianoacrilato foi aplicada na área da pele sem estrato córneo e esta gota foi coberta com uma fita adesiva usando pressão leve. Após a polimerização total da cola (± 1 min), a fita foi removida e a biópsia dos folículos pilosos foi obtida e colocada em outro frasco de vidro. Finalmente, a pele remanescente de todos os experimentos foi cortada em pequenos fragmentos com o auxílio de uma tesoura e colocada em frascos de vidro. Para todos os frascos de vidro foram adicionados 5 mL de metanol e procedeu-se o processo extrativo conforme descrito na seção 5.2. Após o processo extrativo, as dispersões resultantes foram filtradas usando filtros de $0,22 \mu\text{m}$ e quantificadas por CLAE.

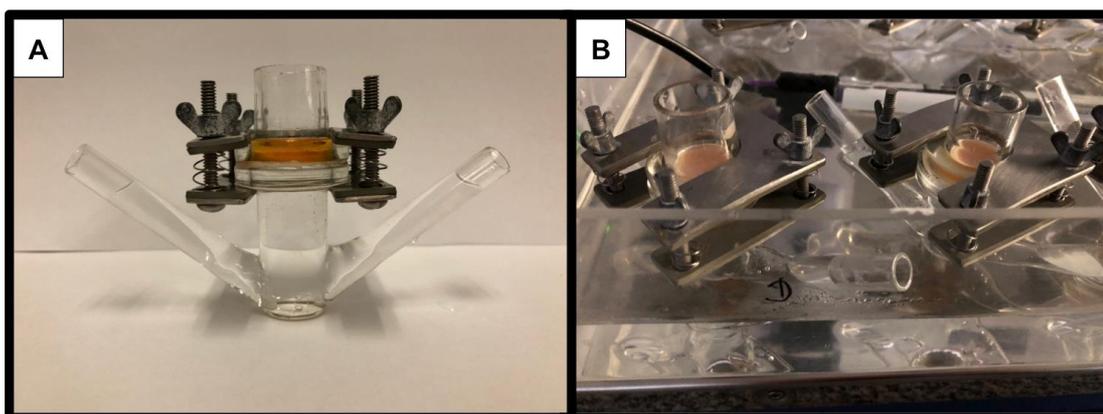


Figura 21. Célula de difusão do tipo *Franz* modificada montada com pele de suínos entre o compartimento doador e receptor (a) e em sistema de banho termostático a 32 °C (b).

4.10.2.2 Experimentos em pele sebácea

Nesta etapa do estudo, foi desenvolvida uma metodologia para produção de uma pele com características sebáceas para simular a fisiologia da pele com hidradenite supurativa e, dessa forma, avaliar a influência do conteúdo sebáceo no desempenho dos nanocarreadores lipídicos.

Para a obtenção do modelo de pele sebácea, foram realizadas as seguintes etapas como representado na Figura 22:

1. Um suporte de dimensões quadradas foi feito com isopor resistente, coberto com papel alumínio e colocado em posição horizontal.
2. A solução de fosfato de clindamicina e rifampicina e CLN contendo os fármacos foi preparada de acordo com as seções 4.5 e 4.6, respectivamente.
3. Para mimetizar a secreção sebácea que ocorre na hidradenite supurativa, o sebo de carneiro foi misturado com óleo vegetal na proporção de 1:1 (p/p) (Figura 22). A mistura foi colocada em um recipiente e aquecida a 40 °C para fusão do sebo e obtenção de uma mistura graxa homogênea.
4. Os fragmentos de pele de suínos foram cortados em forma circular para cobrir as dimensões das células de difusão do tipo *Franz* modificadas (1,3 cm²) e colocadas horizontalmente no suporte.
5. Na superfície da pele fixada ao suporte foram adicionados 0,5 mL da mistura sebácea com o auxílio de uma seringa (Figura 22). Logo depois, a superfície da pele foi levemente massageada por 10 s, de modo que a mistura sebácea se espalhasse uniformemente pela dimensão da pele (Figura 22). O excesso da mistura sebácea foi removido com o auxílio de um papel absorvente (Figura 22). Este procedimento completo foi repetido.
6. Após esse procedimento, 0,5 mL da mistura sebácea foram adicionados à superfície da pele, para garantir que os folículos pilosos fossem obstruídos (Figura 20c). O tempo de contato entre a mistura sebácea e a pele foi

estabelecido usando um estereomicroscópio que assegurava que a mistura cobrisse toda a pele.

7. Ao final, os fragmentos de pele foram montados em células de difusão do tipo *Franz* modificadas, conforme descrito na seção 4.10.2.1.

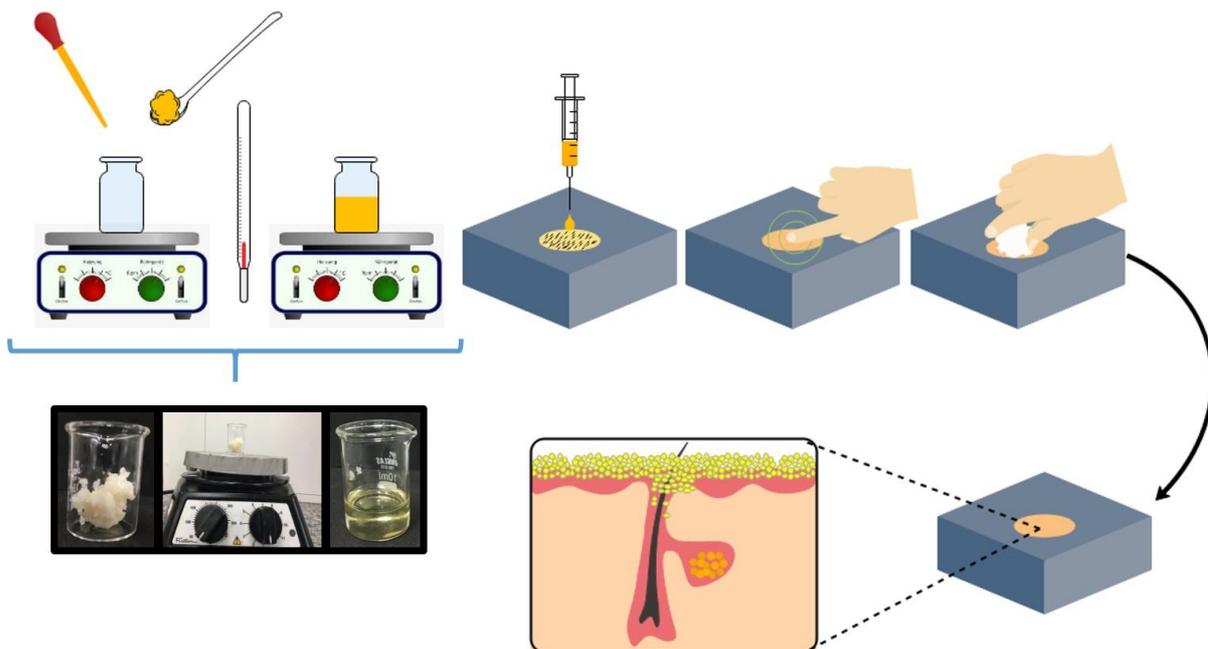


Figura 22. Representação do desenvolvimento da pele sebácea seguindo os passos: 1. Preparação da solução sebácea mimética; 2. Preparação da pele da orelha de suíno e 3. Experimento de teste de desenvolvimento da pele sebácea. Fonte: Autoria própria.

Além disso, o modelo de pele sebácea foi novamente preparado seguido da obstrução dos orifícios foliculares por esmalte (Figura 20d), como descrito para a pele da segunda série de experimentos (seção 4.10.2.1), com o objetivo de estabelecer o papel da via folicular para a permeação dos fármacos livres ou encapsulados nos CLN nesse novo modelo de pele.

4.11 Avaliação *in vitro* do potencial irritativo dos nanocarreadores lipídicos

4.11.1 Ensaio *in vitro* em membrana cório-alantoide de ovos de galinha embrionados (HET-CAM)

O grau de irritação dos nanocarreadores lipídicos foi avaliado utilizando o ensaio em membrana cório-alantoide de ovos de galinha embrionados, no inglês, *Hens Egg Test-Chorion Allantoic Membrane* (HET-CAM) seguindo metodologia de Luepke em 1985 (186) associado à legislação europeia (187), que também é indicado no Brasil pela ANVISA (188).

Os ovos de galinha foram cedidos pela Avifran (Planaltina, Brasil) no seu 10º dia de fertilização. Os ensaios foram realizados na mesma data da coleta dos ovos.

Primeiramente, a casca do ovo ao redor da câmara de ar foi retirada, evidenciando, assim, a membrana da casca. Logo em seguida, a membrana cório-alantoide foi exposta por meio da remoção de uma pequena porção da membrana da casca do ovo (Figura 23).



Figura 23. Representação da exposição da membrana cório-alantoide por meio da remoção de uma pequena porção da membrana da casca do ovo.

Após, foram aplicados 300 μ L das seguintes formulações sobre a membrana exposta (Figura 24):

- Solução salina a 0,9% (p/v) como controle negativo;
- Solução de NaOH 1 mol/L como controle positivo;
- Solução de fosfato de clindamicina e rifampicina;
- CLN contendo fosfato de clindamicina e rifampicina.

Após 20 s de exposição das amostras anteriormente listadas, a membrana cório-alantoide foi cuidadosamente enxaguada com solução salina fisiológica e examinada durante 5 min para que alterações fisiológicas como hiperemia, hemorragia e coagulação fossem observadas visualmente nos tempos de 30 s, 2 min e 5 min, por meio da utilização de um microscópio acoplado a uma lupa (Figura 24).

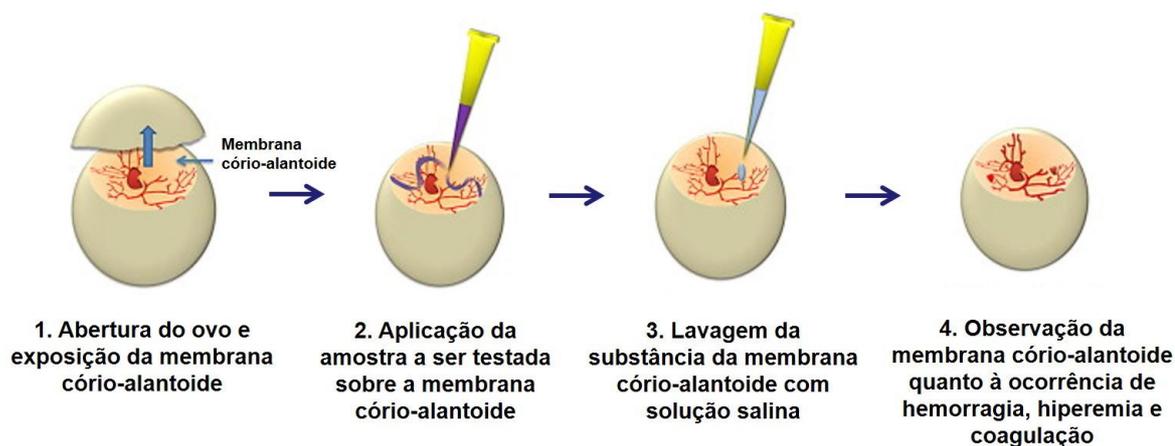


Figura 24. Representação esquemática da avaliação *in vitro* do potencial irritativo dos nanocarreadores lipídicos (HET-CAM). Fonte: Adaptado de Wilson et al. (2015) (189).

O tempo necessário para a ocorrência destas reações foi registrado e o cálculo do índice de irritabilidade foi realizado de acordo com a Equação 7;

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

onde, II = índice de irritabilidade; HE = tempo para ocorrência de hemorragia; HP = tempo para ocorrência de hiperemia e CO = tempo para ocorrência de coagulação.

A classificação final das formulações quanto ao seu potencial de irritabilidade foi então feita relacionando o valor do índice de irritabilidade com o descrito na Tabela 7.

Tabela 7. Classificação final dos nanocarreadores lipídicos considerando a pontuação acumulada quanto ao grau de irritabilidade no ensaio de HET-CAM.

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

4.11.2 Ensaio *in vitro* de irritação em epiderme humana reconstruída

Como contraprova do perfil de irritação dos CLN contendo fosfato de clindamicina e rifampicina, outro estudo do potencial irritativo foi conduzido usando a epiderme humana reconstruída fornecida pela *EpiSkin™*, de acordo com as diretrizes da OCDE descritas no teste n.º. 439 (190). Primeiro, a pele humana reconstruída foi transferida da placa de gel de agarose para placas de 24 poços contendo 300 µL/poço de meio de cultura fresco e mantida por 24 h.

Logo depois, 16 µL ± 0,5 µL de CLN contendo fosfato de clindamicina e rifampicina foram adicionados usando malha de nylon (2 repetições de tecido por condição) e incubados por 42 min em estufa a 5% de CO₂, 37 °C e 95% de umidade. A mesma quantidade foi adicionada para o controle positivo com potencial irritante (dodecil sulfato de sódio 5%, p/v) e para o controle negativo potencialmente não irritante (solução salina a 0,9%, p/v).

Ao final deste período de exposição da pele humana reconstruída às amostras, foi realizada a lavagem de cada poço com 25 jatos de 1 mL de solução salina 0,9% (v/v) e as amostras foram incubadas por mais 42 h (CO₂ a 5%, 37 °C e 95% de umidade).

A viabilidade celular da epiderme humana reconstruída foi então determinada com base na atividade da desidrogenase mitocondrial celular, medida pela redução da solução de brometo de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difenil-2H-tetrazólio (MTT) e conversão em sal azul de formazan, que foi medida quantitativamente após extração dos tecidos (Figura 25) (191).

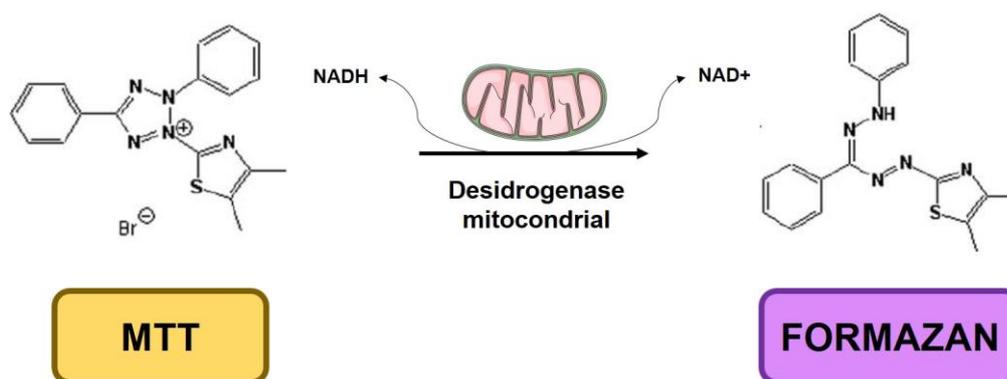


Figura 25. Representação esquemática da conversão do brometo de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difenil-2H-tetrazólio (MTT) para sal de formazan. Fonte: Autoria própria.

Assim, após o período de 42 h, os tecidos foram incubados em solução de MTT (1 mg/mL) por 2 h \pm 15 min (5% de CO₂, 37 °C e 95% de umidade) e, em seguida, as amostras foram extraídas com 750 μ L de isopropanol, adicionando 750 μ L em cima de cada tecido. Finalmente, o desvio óptico foi lido com espectrofotômetro de microplacas (Bio-Tec PowerWave, HT, EUA) a 570 nm para avaliar a viabilidade celular em porcentagem (%).

4.12 Análise estatística

A construção dos cromatogramas e termogramas foi realizada com o uso do programa *Origin 8*. A análise de normalidade dos dados foi feita por *IBM SPSS Statistics 22*. Para a análise estatística dos dados foi utilizado o programa *GraphPad Prism 6*. A análise comparativa foi realizada por ANOVA, seguida do pós-teste de Tukey. O Teste t de Student foi utilizado para comparar amostras dependentes e independentes. O nível de significância estatística foi aceito como $p < 0,05$.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Estabelecimento das condições cromatográficas

O método analítico desenvolvido e validado neste trabalho para quantificação simultânea de fosfato de clindamicina e rifampicina no desenvolvimento de formulações tópicas, considerando estudos de permeação e penetração cutânea dos fármacos, é o primeiro deste tipo relatado na literatura.

Vários comprimentos de onda foram inicialmente avaliados usando o modo de varredura na faixa de 190 nm a 900 nm para cada fármaco. A absorção máxima de rifampicina ocorreu a 238 nm e 338 nm, e a absorção máxima de fosfato de clindamicina esteve entre 197 nm e 200 nm. Considerando que os contaminantes da pele têm seus picos de absorção na faixa de 190 nm a 197 nm, os comprimentos de onda de 200 nm e 238 nm foram selecionados para determinação de fosfato de clindamicina e rifampicina, respectivamente, na tentativa de tornar o método mais seletivo.

Para o desenvolvimento do método analítico, foram realizados testes com solução estoque contendo os dois fármacos diluídos em metanol:água (100 µg/mL) e os diferentes interferentes das camadas da pele, injetados separadamente. Os dados apresentados na Tabela 8 resumem as condições analíticas testadas.

O desenvolvimento deste método representa um desafio, uma vez que os fármacos apresentam características diferentes, isto é, o fosfato de clindamicina é hidrofílico e a rifampicina tem um caráter mais lipofílico (17,18). Desta forma, os testes iniciais foram realizados testando diferentes combinações para fase móvel, como: metanol:água, acetonitrila:água, metanol:água:acetonitrila, acetonitrila:ácido fosfórico 0,01 mol/L e metanol:ácido fosfórico 0,01 mol/L em uma coluna de fase reversa-C₈ (150 mm x 4,6 mm, 5 µm) (ensaios 1 - 9).

Tabela 8. Condições cromatográficas utilizadas no desenvolvimento do método CLAE-UV para quantificação simultânea de fosfato de clindamicina (CDM) e rifampicina (RIF).

Coluna	Ensaio	Fase móvel (v:v)	Tempo de retenção (min)		Fator de cauda		Pratos teóricos		Característica do pico	
			CDM	RIF	CDM	RIF	CDM	RIF	CDM	RIF
Método isocrático										
FR C ₈ 150 x 4.6 mm; 5 µm	1	MeOH:H ₂ O (75:25)	-	2,3	-	1,7	-	458	-	Pico adiantado
	2	MeOH:H ₂ O (60:40)	6,9	9,9	1,4	1,3	300	656	Pico largo	Pico largo
	3	MeOH:H ₂ O (58:42)	9,9	11,6	2,0	1,9	348	651	Pico largo	Pico largo
	4	ACN:H ₂ O (60:40)	3,2	11,7	1,2	1,7	795	2691	Picos sobrepostos	Pico largo
	5	ACN:H ₂ O (30:70)	-	-	-	-	-	-	-	-
	6	MeOH:ACN:H ₂ O (48:10:42)	17,3	23,6	1,3	1,2	228	567	Pico largo	Pico largo
	7	ACN:H ₃ PO ₄ 0,01 mol/L (60:40)	1,7	2,3	-	1,2	258	1021	Picos sobrepostos	Picos sobrepostos
	8	ACN:H ₃ PO ₄ 0,01 mol/L (40:60)	2,3	4,6	0,9	2,0	849	1666	Picos sobrepostos	Picos sobrepostos
	9	MeOH:H ₃ PO ₄ 0,01 mol/L (40:60)	1,8	18,3	1,3	1,7	802	1603	Picos sobrepostos	Pico largo
	10	MeOH:H ₂ O (60:40)	17,5	18,3	1,6	2,1	405	497	Pico largo	Pico largo
FR C ₁₈ 150 x 4.6 mm; 5 µm	11	ACN:H ₂ O (60:40)	7,8	19,6	2,3	1,6	758	384	Pico largo	Pico largo
	12	ACN:H ₃ PO ₄ 0,01 mol/L (80:20)	9,3	-	1,1	-	8923	-	Pico adequado	-
	13	ACN:H ₃ PO ₄ 0,01 mol/L (50:50)	5,1	25,3	1,1	1,7	5405	847	Picos sobrepostos	Pico adequado
	14	MeOH:H ₃ PO ₄ 0,01 mol/L (75:25)	-	8,6	-	1,2	-	3436	-	Pico adequado
	15	MeOH:H ₃ PO ₄ 0,01 mol/L (45:55)	7,5	-	1,1	-	6465	-	Picos adequados	-
Método gradiente										
FR C ₁₈ 150 x 4.6 mm; 5 µm	16	MeOH:H ₃ PO ₄ 0,01 mol/L 6:10 → 45:55 7:10 → 75:25 14:00 → 75:25	6,9	12,8	1,0	1,2	620	11096	Pico adequado	Pico adequado
	17	MeOH:H ₃ PO ₄ 0,01 mol/L 6:00 → 45:55 7:30 → 75:25 9:00 → 75:25 9:30 → 45:55 16:00 → Final	7,4	12,2	1,0	1,1	6058	9632	Pico adequado	Pico adequado

*Na Tabela: FR C₈ = Coluna de fase reversa C₈; FR C₁₈ = Coluna de fase reversa C₁₈; MeOH = metanol; H₂O = água ultrapurificada; ACN = acetonitrila e H₃PO₄ 0,01 mol/L = ácido fosfórico a 0,01 mol/L.

Os ensaios 2, 3, 4 e 6 demonstraram separação dos fármacos em uma mesma corrida; no entanto, os picos não seguiram os requisitos mínimos requeridos para valores de pratos teóricos, que é de $N > 2.000$ (175). Além disso, outros ensaios mostraram os picos dos fármacos sobrepostos e interferindo com o pico do solvente e as camadas da pele (ensaios 7, 8 e 9) ou resultaram em não aparecimento de pico referente a um dos fármacos, mesmo em uma corrida de 30 min (ensaios 1, 5 e 7).

Para otimizar os inconvenientes dos testes anteriores, foi testada uma coluna cromatográfica com número maior de carbonos (Fase reversa C_{18} : 150 x 4,6 mm, 5 μ m), variando também algumas composições e proporções dos solventes da fase móvel, para obtenção da melhor resolução dos picos. Contudo, os resultados mostraram inadequação das características fundamentais: os ensaios 14 e 15 apresentaram valores adequados dentro dos parâmetros requeridos, mas no método 14 apenas a rifampicina eluiu com tempo de retenção de 8,5 min e no ensaio 15 apenas o fosfato de clindamicina eluiu aos 7,4 min, conforme Tabela 8.

Diante disso, o metanol (bomba A) e o ácido fosfórico 0,01 mol/L (bomba B) foram mantidos na fase móvel modificando as proporções dos solventes em um método que envolveu gradiente de concentração. O método proposto foi obtido em razão de gradiente como segue: 45% v/v bomba A no tempo zero; de 0 a 6 min, até 75% v/v bomba A; de 6 a 6,30 min, manutenção a 75% v/v na bomba A. Após 9 min, o programa de gradiente retornou as condições iniciais e a coluna analítica foi recondicionada durante 6,30 min a uma vazão fixada em 1,0 mL/min.

Assim, todos os contaminantes das frações da pele eluíram até 5 min de corrida, enquanto o fosfato de clindamicina eluiu a 7,4 min e a rifampicina a 12,2 min, com um tempo de corrida igual a 16 min (Figura 26). O número de pratos teóricos (6058 e 9632) seguiu o parâmetro estabelecido pelo *Food and Drug Administration* de $N > 2.000$ e os fatores de cauda estavam dentro do limite de $T < 1,5$ (1,080 e 1,189 para fosfato de clindamicina e rifampicina, respectivamente), de acordo, portanto, com as exigências das legislações vigentes (175,192).

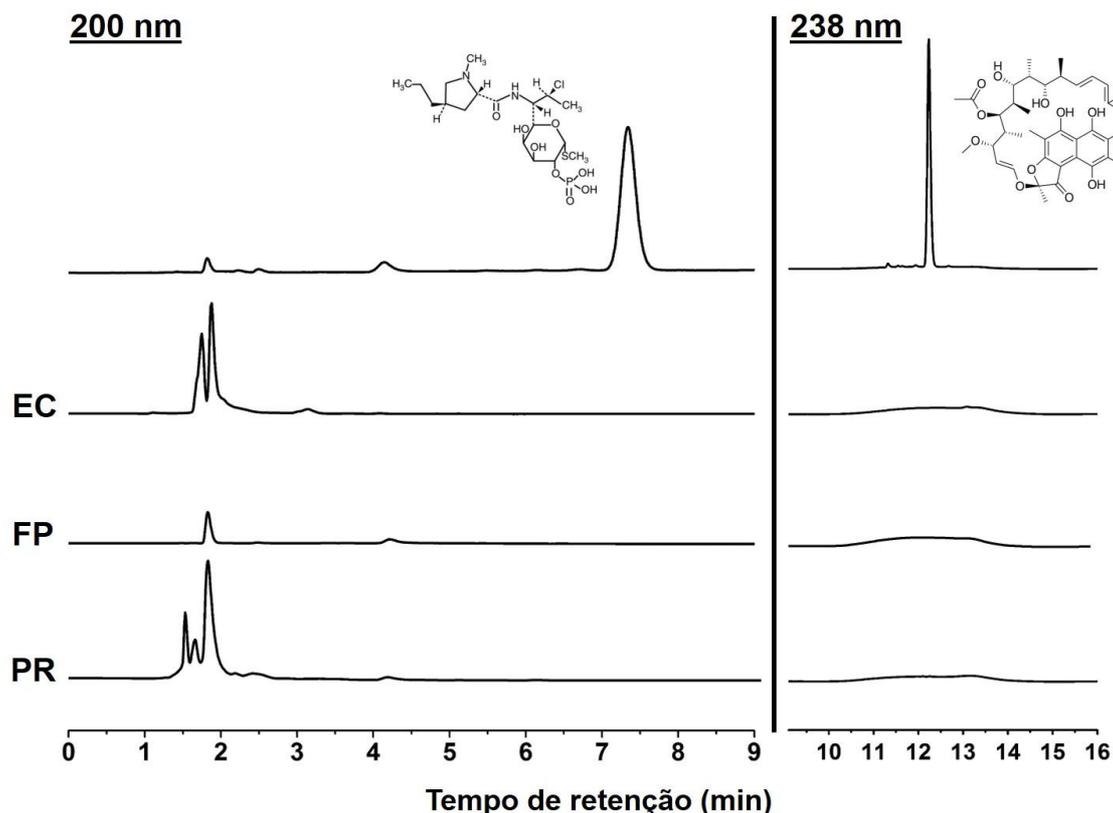


Figura 26. Cromatogramas representativos de CLAE do fosfato de clindamicina (CDM), rifampicina (RIF) a 100 µg/mL, estrato córneo (EC), folículos pilosos (FP) e pele remanescente (PR) obtidos seguindo o método estabelecido com detecção UV dos fármacos em diferentes comprimentos de onda (200 nm e 238 nm para CDM e RIF, respectivamente).

5.2 Desenvolvimento do processo de extração dos fármacos retidos nas camadas da pele

Nessa parte do estudo, os passos experimentais visaram otimizar as condições de extração simultânea de fosfato de clindamicina e rifampicina das três camadas da pele (estrato córneo, folículos pilosos e pele remanescente). Os testes preliminares de extração foram realizados nestas matrizes biológicas contendo concentrações conhecidas dos fármacos variando diferentes aspectos das condições de extração, tais como composição dos solventes de extração, tempo de extração e uso ou não de agitação magnética e banho ultrassônico.

Os procedimentos extrativos envolvendo condições mais vigorosas, conseguidas especificamente ao submeter as amostras ao banho ultrassônico ou à agitação magnética, implicaram na extração de vários componentes da matriz biológica juntamente com os antibióticos do estudo. No caso da determinação do

fosfato de clindamicina, esses interferentes absorveram no mesmo comprimento de onda utilizado para a detecção desse fármaco (200 nm), causando interferências significativas em sua quantificação. Sendo assim, as condições de extração foram delimitadas para evitar interferências das matrizes biológicas utilizando um planejamento fatorial envolvendo apenas a composição do solvente de extração e o tempo de repouso, na tentativa de se obter condições otimizadas de extração. Os resultados estão apresentados na Tabela 9.

Tabela 9. Resultados obtidos para recuperação do fosfato de clindamicina (CDM) e rifampicina (RIF) nas camadas da pele: Estrato córneo (EC), folículos pilosos (FP) e pele remanescente (PR).

Concentração de metanol (%)	Tempo de repouso (horas)	Recuperação CDM (%)			Recuperação RIF (%)		
		EC	FP	PR	EC	FP	PR
0,50	0,08	61,0	81,4	1,71	24,3	66,7	37,4
0,75	0,08	62,1	90,1	19,6	62,6	107,9	25,9
1,00	0,08	71,3	83,6	61,5	111,0	107,3	21,9
0,50	0,5	60,3	79,5	14,4	10,9	45,2	16,3
0,75	0,5	56,8	85,3	13,3	35,4	100,8	79,3
1,00	0,5	53,4	114,8	42,8	112,8	88,8	39,6
0,50	2	56,8	98,4	12,6	12,1	41,3	14,5
0,75	2	59,5	101,0	15,5	20,8	55,1	113,4
1,00	2	64,6	104,1	65,9	103,1	75,9	41,4
0,50	12	72,6	83,9	8,2	27,7	66,2	3,6
0,75	12	82,6	101,5	10,2	51,8	70,1	25,1
1,00	12	81,6	108,1	59,6	87,3	80,5	48,1
0,50	24	59,7	83,9	8,0	44,9	73,7	10,6
0,75	24	73,7	112,3	20,9	55,5	52,4	38,5
1,00	24	76,4	105,6	113,7	94,4	89,9	71,3

As superfícies de resposta obtidas para a extração de fosfato de clindamicina estão representadas na Figura 27. Todos os modelos obtidos foram significativos ($p < 0,05$) e apresentaram valores de r^2 maior que 0,5 e *Adequate precision* (*Adeq prec*) superior a 4, o que indica uma boa capacidade preditiva (193).

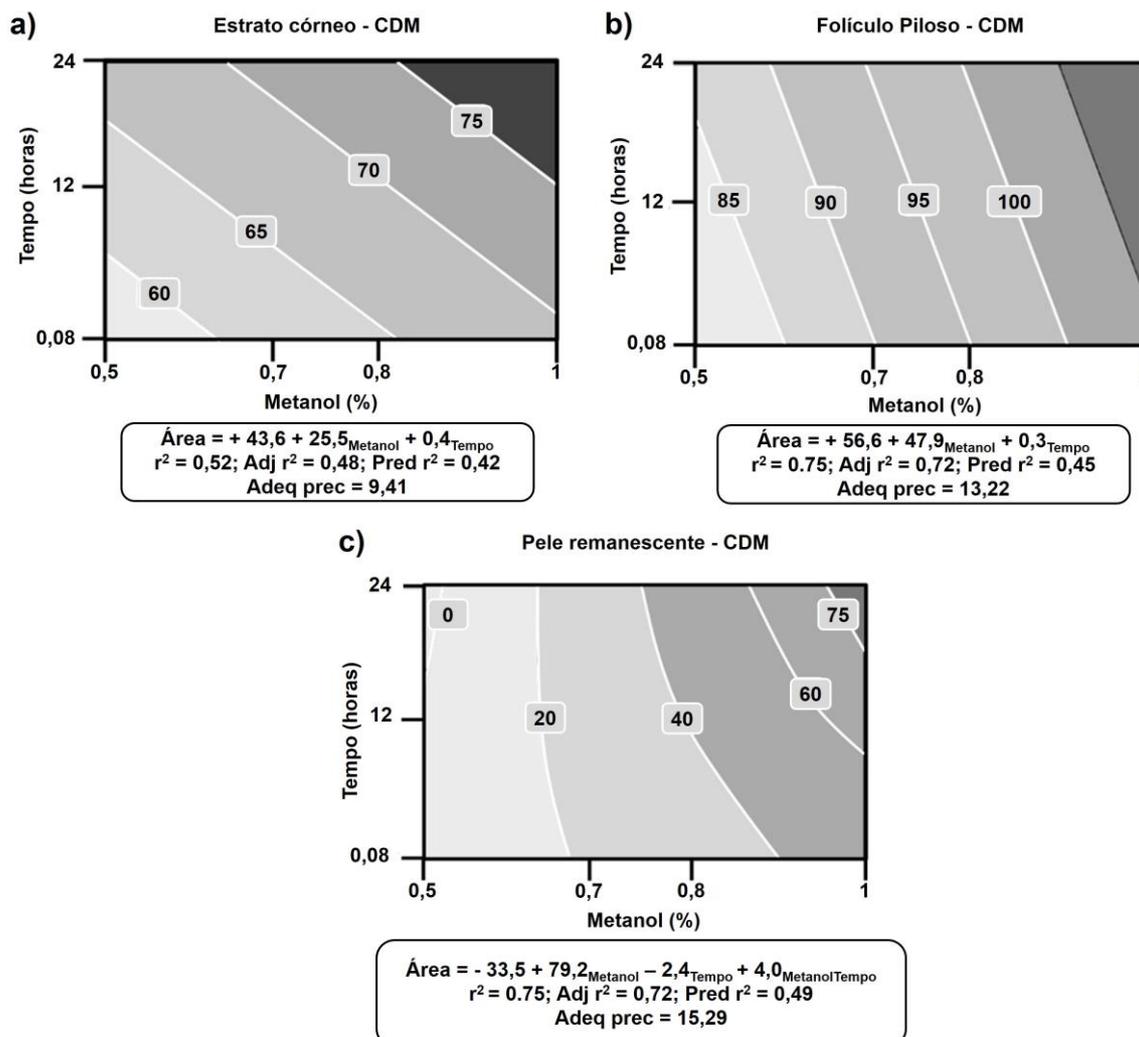


Figura 27. Superfícies de resposta da extração de fosfato de clindamicina (CDM) em porcentagem obtida de acordo com o tempo de extração e a composição do solvente de extração para as camadas da pele: Estrato córneo (a), foliculos pilosos (b) e pele remanescente (c). As áreas escuras mostram as regiões com maior recuperação. Adj r^2 , adjusted r^2 ; Pred r^2 , predicted r^2 e Adeq prec, Adequate precision.

As altas porcentagens de extração de fosfato de clindamicina (acima de 75%) puderam ser obtidas para todas as matrizes biológicas sob certas condições operacionais (Figura 27). Além disso, obteve-se quase 100% da extração de fosfato de clindamicina nos foliculos pilosos em uma ampla região da superfície de resposta (Figura 27b).

A composição do solvente de extração é o fator mais relevante para a extração do fosfato de clindamicina, independentemente da camada da pele. Os altos coeficientes positivos para este fator nas equações preditivas corroboram essa afirmação (Figura 27). O tempo de extração é um fator significativo a ser considerado para a extração de fosfato de clindamicina do estrato córneo e da pele

remanescente (Figuras 27a e 27c). Além disso, a interação aumentada do fosfato de clindamicina com os componentes da pele remanescente (a fração mais interna da pele) também justifica a necessidade de um período de extração mais longo.

No caso da extração do folículo piloso, o tempo não é um fator relevante para o fosfato de clindamicina. De fato, a extração de praticamente toda a quantidade do fármaco foi obtida sob condições de alta porcentagem de metanol em um curto período de tempo (Figura 27b).

A Figura 28 mostra os resultados das superfícies de resposta obtidas para a extração da rifampicina nas camadas da pele. Os parâmetros estatísticos indicam a alta adequação dos modelos (194).

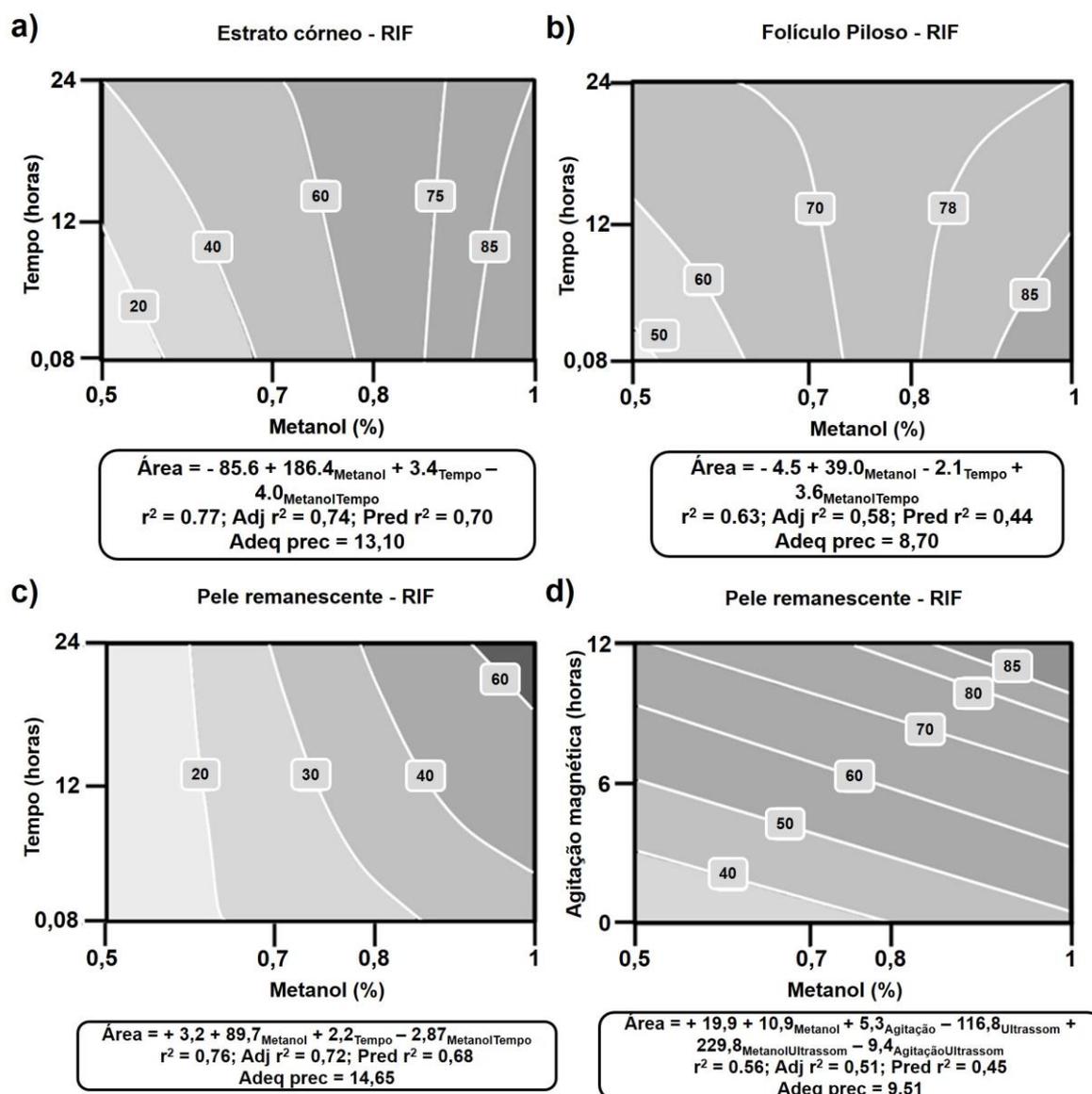


Figura 28. Superfícies de resposta da extração da rifampicina (RIF) em porcentagem obtida de acordo com o tempo de extração e a composição do solvente de extração para as camadas da pele: Estrato córneo (a), folículos pilosos (b) e pele remanescente (c). Superfície de resposta da extração da RIF da pele remanescente em porcentagem obtida de acordo com o tempo magnético de agitação e a composição do solvente (d). As áreas escuras mostram as regiões com maior recuperação. *Adj r²*, *adjusted r²*; *Pred r²*, *predicted r²* e *Adeq prec*, *Adequate precision*.

No processo extrativo para a rifampicina, conclusões similares podem ser obtidas em relação à relevância da composição do solvente de extração como o principal fator da extração (Figura 28). No caso desse fármaco, o tempo de extração não foi relevante na sua extração do estrato córneo e folículos pilosos. Ou seja, para estas frações de pele, altos níveis de extração (maior que 85%) foram sucedidos em pouco tempo (Figuras 28a e 28b).

Em contraste, a recuperação da rifampicina da pele remanescente sob condições otimizadas de extração só conseguiu atingir níveis ligeiramente acima de 60%. Provavelmente, a interação dos componentes biológicos com a rifampicina na pele remanescente é maior do que com o fosfato de clindamicina, devido ao maior log P do primeiro composto em comparação ao último, que são de 3,17 e 0,50 (195,196), respectivamente.

Portanto, no caso de quantificação desse fármaco em tal matriz, seria necessário um processo de extração mais agressivo.

Considerando que as condições analíticas da rifampicina não sofrem interferência dos componentes da pele devido ao comprimento de onda utilizado (238 nm), foi aplicado um planejamento fatorial suplementar, incluindo a agitação magnética e a inserção da amostra no banho ultrassônico, além de alterações na composição do solvente de extração (Tabela 10). Assim, com condições de extração mais vigorosas, a superfície de resposta mostrou regiões com mais de 85% de recuperação da rifampicina na camada de pele remanescente (Figura 28d).

Tabela 10. Resultados obtidos para recuperação da rifampicina (RIF) da pele remanescente (PR).

Concentração de metanol (%)	Tempo de agitação magnética (h)	Tempo de ultrassom (h)	Recuperação da RIF da PR (%)
0,50	0	0	37,4
0,50	3	0	54,6
0,50	12	0	95,8
0,50	0	0,16	21,6
0,50	3	0,16	16,8
0,50	12	0,16	79,8
0,50	0	0,33	22,4
0,50	3	0,33	39,1
0,50	12	0,33	34,6
0,75	0	0	25,9
0,75	3	0	29,0
0,75	12	0	80,1
0,75	0	0,16	16,9
0,75	3	0,16	54,7
0,75	12	0,16	50,6
0,75	0	0,33	39,2
0,75	3	0,33	79,9
0,75	12	0,33	109,7
1,00	0	0	21,9
1,00	3	0	55,2
1,00	12	0	108,6
1,00	0	0,16	57,5
1,00	3	0,16	76,8
1,00	12	0,16	91,1
1,00	0	0,33	58,7
1,00	3	0,33	73,2
1,00	12	0,33	76,9

A avaliação estatística desse delineamento mostrou que o uso do ultrassom não modificou o processo extrativo, mas o tempo de agitação magnética foi o fator mais relevante para a extração ($p < 0,0001$), seguido da composição do solvente ($p = 0,0016$). Assim, a condição ótima de extração da rifampicina da pele remanescente foi obtida com o uso de metanol (100%) e agitação magnética por 9 h a 12 h (Figura 28d).

Nesse sentido, a partir do primeiro planejamento fatorial, estabeleceu-se uma resposta otimizada considerando a extração máxima e simultânea dos fármacos de cada uma das frações da pele. A desejabilidade estimada foi de 0,75 e a melhor resposta combinada foi obtida nas condições de extração utilizando 100% de metanol e 24 h de repouso com extrações estimadas de fosfato de clindamicina de

83%, 100% e 83% do estrato córneo, folículos pilosos e pele remanescente, respectivamente, e de rifampicina de 85%, 77% e 70% nas mesmas frações. Na extração de rifampicina da pele remanescente, valores de extração superiores a 90% foram obtidos apenas adicionando a agitação magnética por mais 9 h.

Cabe ressaltar que as altas taxas de recuperação obtidas para os fármacos extraídos das diferentes frações da pele excluíram a necessidade do uso de fatores de correção e são um contraponto nesse tipo de extração, que frequentemente apresentam valores de recuperação abaixo de 70% (197,198).

5.3 Validação do método analítico

A seletividade do método analítico foi determinada comparando os cromatogramas de uma solução contendo fosfato de clindamicina e rifampicina quando eluídos na presença e na ausência dos contaminantes de cada camada da pele (estrato córneo, folículos pilosos e pele remanescente). Nas condições cromatográficas selecionadas, as áreas dos picos dos fármacos não foram alteradas na presença das matrizes biológicas ($p > 0,05$). Além disso, a presença dos contaminantes da pele não causou alterações significativas no tempo de retenção dos analitos, que foram mantidos em 7,4 min e 12,2 min para fosfato de clindamicina e rifampicina, respectivamente, com oscilações menores que 0,005 min (Figura 29), o que reforça a seletividade do método. Ainda, não ocorreram variações quando foram colocados os fármacos frente aos contaminantes de pele sebácea e os constituintes dos CLN ($p > 0,05$, dados não mostrados).

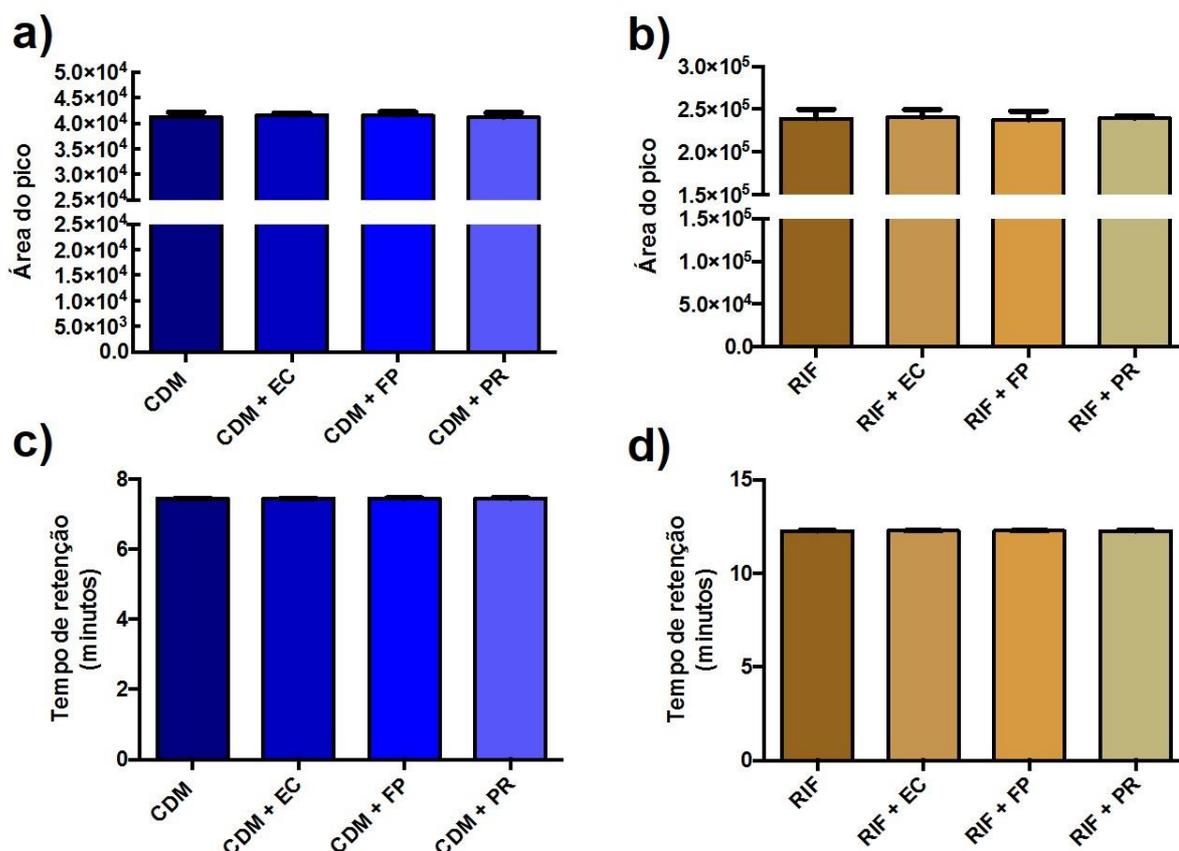


Figura 29. Seletividade do método para quantificação de fosfato de clindamicina (CDM) e rifampicina (RIF). Quantificação dos fármacos (7,5 µg/mL) isolados e adicionados aos extratos de pele. Análises em termos de áreas dos picos de CDM (a) e RIF (b), **além do** tempo de retenção de CDM (c) e RIF (d). EC = estrato córneo, FP = folículo piloso e PR = pele remanescente. Análise estatística por ANOVA.

A plotagem da área do pico para cada amostra em relação à respectiva concentração dos fármacos foi considerada linear na faixa de 0,5 µg/mL a 20 µg/mL. A linearidade foi avaliada após análise de regressão linear usando o método dos mínimos quadrados. As equações de regressão foram $y = 5190,6x + 510,3$, $y = 21904x + 66903$ e o coeficiente de correlação das curvas padrão foi 0,9991 e 0,9995, para fosfato de clindamicina e rifampicina, respectivamente, mostrando alta probabilidade de correlação. Observou-se que o coeficiente de correlação linear e a análise de regressão estão dentro dos limites estabelecidos (175).

O método analítico mostrou proporcionalidade entre a área e os valores de concentração em uma ampla faixa de concentrações. Os coeficientes angulares foram diferentes de zero de acordo com o teste *t Student* e seus altos valores numéricos (fosfato de clindamicina: 5190,6 e rifampicina: 21904) indicaram resposta apropriada do método as alterações na concentração, com um intervalo de

confiança de 5114 a 5313 para fosfato de clindamicina, e de 20958 a 22523 para rifampicina.

Os resíduos apresentaram aproximadamente o mesmo valor absoluto e uma distribuição aleatória de dados, sem tendência para os dois fármacos. O coeficiente de variação médio dos fatores de resposta foi abaixo de 3,6%, caindo dentro do limite aceitável de 5% (175).

O LD foi de 0,12 µg/mL e 0,25 µg/mL e o LQ do método foi de 0,35 µg/mL e 0,76 µg/mL para fosfato de clindamicina e rifampicina, respectivamente. Os baixos valores encontrados devem ser suficientes para monitorar com segurança os pontos iniciais dos perfis de liberação e permeação dos fármacos, além de possibilitar a determinação de pequenas quantidades retidas nas camadas da pele. De fato, os ensaios de permeação e penetração cutânea que serão descritos a seguir comprovarão a capacidade do método em determinar e diferenciar os fármacos retidos na pele após tratamento com as formulações.

A precisão foi avaliada usando seis replicatas tanto para o fosfato de clindamicina quanto para a rifampicina (7,5 µg/mL). Para precisão inter-dia, o coeficiente de variação para fosfato de clindamicina e rifampicina exibiu valores abaixo de 4,04% (Tabela 11). Os valores de coeficiente de variação obtidos para avaliar a precisão intra-dia mostraram respostas adequadas mesmo com a variação do analista e o dia da análise, sendo sempre inferior a 0,50% para os fármacos.

A repetibilidade do método foi comprovada por valores de coeficiente de variação abaixo de 1,71%, demonstrando que o método foi capaz de se ajustar e quantificar mesmo com uma variação entre as diferentes pesagens das amostras. Este valor estava dentro dos critérios de aceitação (menor que 5%) do ICH (175).

Tabela 11. Resultados dos testes de precisão para determinação de fosfato de clindamicina (CDM) e rifampicina (RIF). CV = coeficiente de variação (%).

Fármaco			Concentração Experimental (µg/mL)	CV (%)	CV geral (%)
Precisão intermediária					
CDM	Analista 1	Dia 1	7,35	1,80	2,78
	Analista 2	Dia 1	7,37	3,16	
	Analista 1	Dia 2	7,25	4,03	
	Analista 2	Dia 2	7,29	1,99	
RIF	Analista 1	Dia 1	7,71	4,04	3,10
	Analista 2	Dia 1	7,62	3,51	
	Analista 1	Dia 2	7,64	1,69	
	Analista 2	Dia 2	7,76	3,30	
Repetibilidade instrumental					
CDM			7,67	0,33	-
RIF			7,54	0,50	
Repetibilidade do método					
CDM			7,87	1,60	-
RIF			7,30	1,71	

A exatidão foi expressa como a porcentagem de recuperação de quantidades conhecidas dos fármacos adicionadas à matriz biológica (179).

A Tabela 12 resume os resultados da recuperação dos fármacos a partir do estrato córneo, folículos pilosos e pele remanescente. O método desenvolvido mostrou alta recuperação dos fármacos (> 85%) obtidos nas diferentes frações da pele. Os valores encontrados confirmaram as recuperações esperadas de acordo com as equações preditivas estabelecidas no desenvolvimento do método de extração. Os coeficientes de variação foram inferiores a 15%, considerando os limites estabelecidos pelas autoridades sanitárias, no caso dos métodos bioanalíticos (176,199,200).

Tabela 12. Resultados da exatidão para determinação de fosfato de clindamicina (CDM) e rifampicina (RIF) das camadas da pele. CT, concentração teórica; CM, concentração mensurada e CV, coeficiente de variação.

Fármacos	Amostra	Estrato córneo			Folículos pilosos			Pele remanescente			
		CT (µg/mL)	CM (µg/mL)	CV (%)	Exatidão (%)	CM (µg/mL)	CV (%)	Exatidão (%)	CM (µg/mL)	CV (%)	Exatidão (%)
CDM		7,5	6,53	7,75	87,04	7,28	13,48	97,05	7,57	5,08	100,89
RIF		7,5	6,95	6,82	92,72	6,39	3,95	85,21	6,64	7,08	88,50

5.4 Estudos de compatibilidade entre fosfato de clindamicina e rifampicina

Considerando que este é o primeiro estudo a propor uma associação dos antibióticos, fosfato de clindamicina e rifampicina, em uma única formulação, que nesse caso ocorrerá pelo co-aprisionamento em CLN, procedeu-se ensaios para verificar a compatibilidade entre os fármacos.

A associação de técnicas térmicas, tais como DSC e TGA, são úteis na compreensão dos mecanismos físico-químicos relativos aos processos de decomposição térmica, interpretação dos processos térmicos ou no estudo e desenvolvimento de novos compostos e produtos. Dessa forma, os estudos de compatibilidade entre fosfato de clindamicina e rifampicina foram avaliados comparando os fármacos isolados e após a mistura física. Além disso, os fármacos isolados e em mistura física foram avaliados antes (A1, A2 e A3 da Tabela 4) e após passarem por processamento farmacêutico (A4, A5 e A6 da Tabela 4) de umectação e aquecimento a 80 °C, para simular o que ocorre durante o processo de obtenção dos CLN.

As análises de DSC do fosfato de clindamicina revelaram a presença de dois eventos térmicos (Figura 30). O primeiro é endotérmico e corresponde à fusão do fármaco com T_{peak} a 183,2 °C e o segundo evento foi exotérmico correspondente à decomposição do fármaco.

No caso da rifampicina, a literatura reporta dois polimorfismos (forma I e forma II). A forma I é mais estável e a forma II é considerada metaestável. Além disso, após uma dessolvatação a rifampicina converte-se em seu estado amorfo. As formas comerciais disponíveis são mais comumente apresentadas como uma mistura da forma polimórfica II e da forma amorfa em várias proporções (201). Foram obtidas curvas de DSC para a rifampicina em aquecimento de 25 °C a 300 °C em atmosfera de nitrogênio (Figura 30). Três eventos térmicos foram observados caracterizando-a em sua forma polimórfica II. O primeiro evento foi um pico endotérmico com T_{peak} a 178 °C, correspondente à sua fusão, o segundo foi um pico exotérmico em 199 °C, representando a sua recristalização e correspondendo à conversão da forma polimórfica II em forma polimórfica I, que caracteriza a transição sólido-líquido-sólido, e o terceiro evento correspondeu a um pico exotérmico mais alargado referente ao seu processo de decomposição.

A análise de DSC dos fármacos puros após umectação e aquecimento a 80 °C (A4 e A5) exibiram um perfil semelhante sem alterações importantes nos seus eventos térmicos esperados.

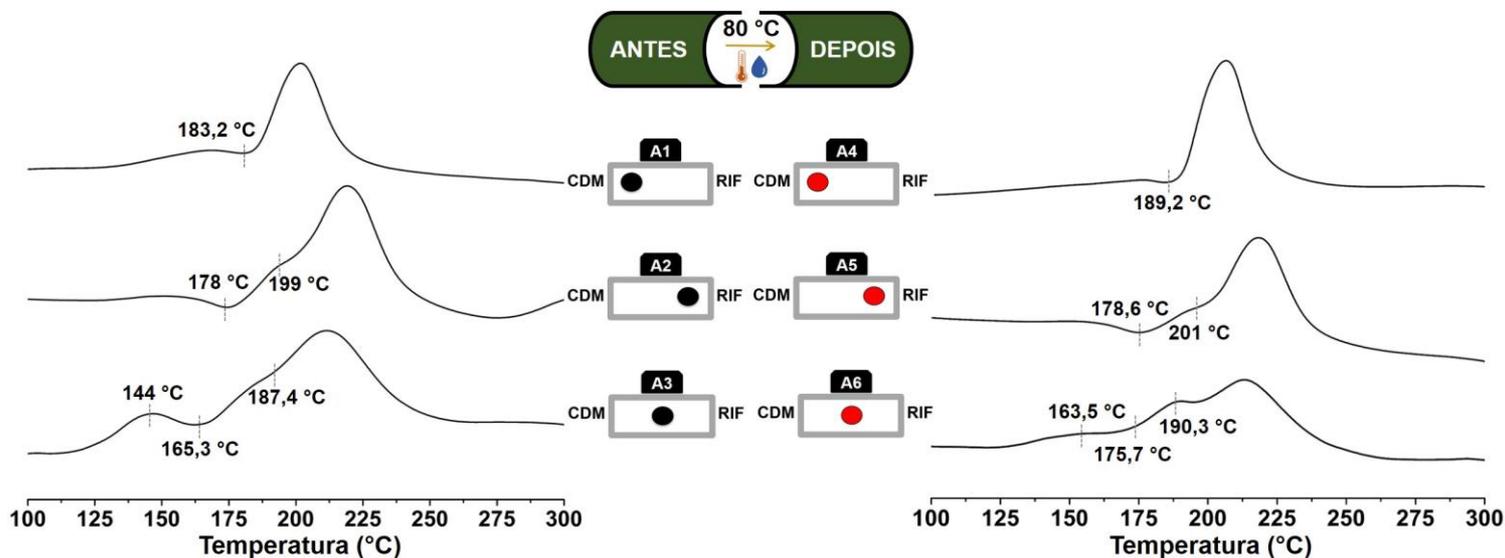


Figura 30. Análises de DSC de fosfato de clindamicina (CDM), rifampicina (RIF) e mistura física antes e após o processamento farmacêutico (A1 a A6). Taxa de aquecimento de 5 °C/min de 25 a 300 °C sob atmosfera controlada de nitrogênio com vazão de 50 mL/min.

O perfil calorimétrico obtido por DSC das misturas dos fármacos (A3 e A6) revelou uma alteração no perfil térmico esperado da amostra, apresentando novos eventos térmicos em temperaturas iniciais (Figura 30). Isso pode indicar interação entre eles, o que exige testes complementares para elucidar a repercussão dessa interação.

As análises de DSC em ciclo de aquecimento de 25 a 195 °C para fosfato de clindamicina e mistura física de 25 a 210 °C para rifampicina, seguidas de resfriamento para todas as amostras até -40 °C e aquecimento até 300 °C (5 °C/min) estão representadas na Figura 31.

Para o fosfato de clindamicina (Figura 31a), observa-se a presença de uma endotérma de sua fusão em 181,1 °C seguido do início de sua decomposição. A rifampicina (Figura 31b) também manteve o aparecimento dos seus dois eventos térmicos, fusão e início da recristalização/decomposição. A mistura física dos fármacos (Figura 31c) mostraram o mesmo perfil térmico encontrado nas análises de DSC anteriormente relatadas.

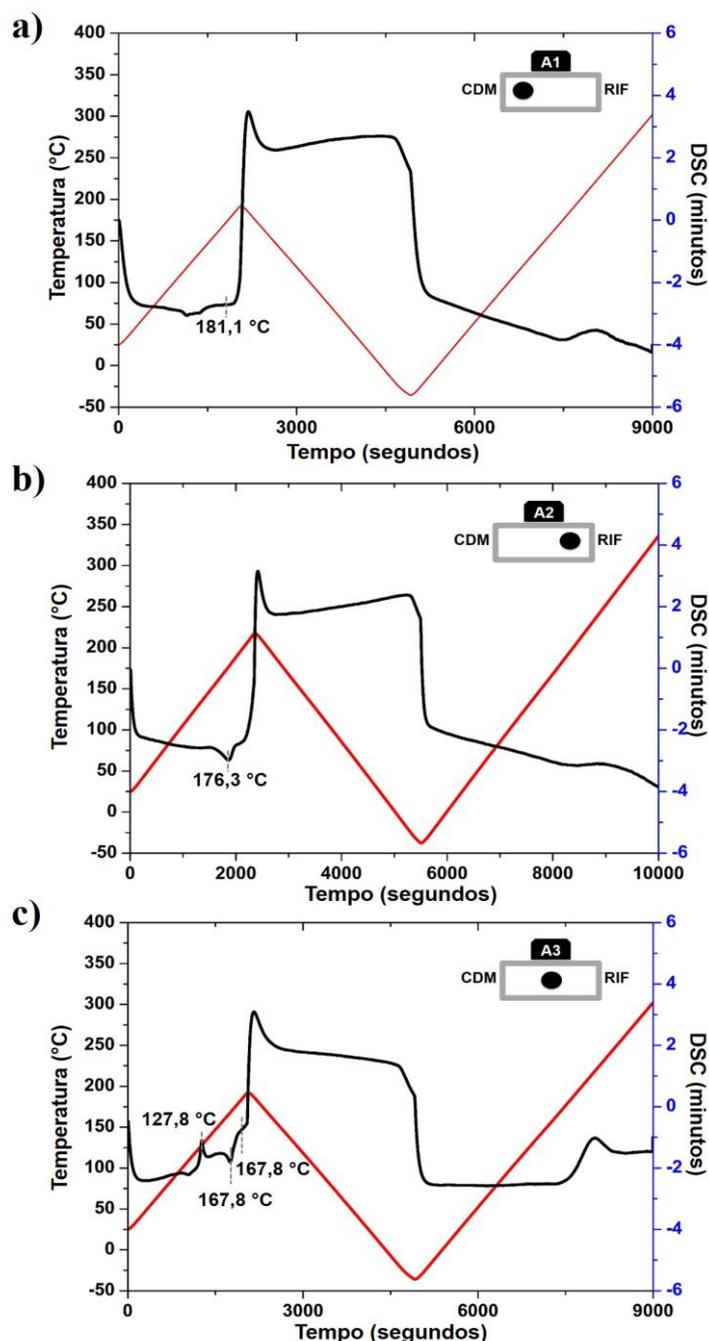


Figura 31. Análises de ciclos de DSC do fosfato de clindamicina (CDM) (a), rifampicina (RIF) (b) e mistura física dos fármacos (c) antes do processamento farmacêutico (A1, A2 e A3). Taxa de aquecimento de 5 °C/min de 25 a 195 °C para CDM e mistura física (A1 e A3) e 25 a 210 °C para RIF (A2) seguida de resfriamento a -40 °C e aquecimento a 300 °C, sob atmosfera controlada de nitrogênio com vazão de 50 mL/min.

Para todas as amostras (A1, A2 e A3), o resfriamento até -40 °C não propiciou cristalização dos fármacos e nenhum outro evento ocorreu durante a análise, confirmando os dados anteriormente relatados. Além disso, o novo aquecimento de -40 °C até 300 °C proporcionou a continuação da decomposição

das amostras. Esses resultados demonstram a tendência dos fármacos de assumirem a forma amorfa, o que muito provavelmente ocorrerá quando da inserção deles nos sistemas lipídicos nanoestruturados.

O grau de decomposição dos sistemas medido pela TGA é um parâmetro importante para se obter indícios sobre a estabilidade da amostra. O uso da primeira derivada das curvas de perda de massa fornecida pela TGA (DrTGA) permite distinguir os eventos de decomposição de cada componente, mesmo em misturas complexas, além de permitir distinguir diferentes estágios de perda de massa nas amostras de acordo com os limites dos picos obtidos (202).

A Figura 32 apresenta as curvas de DrTGA de todas as amostras avaliadas (A1 a A6). Uma pequena perda de massa (0,56%) do fosfato de clindamicina ocorre logo no início da análise. Na segunda etapa, em 194,7 °C, inicia-se um processo de perda de massa que chega a 41,55%, caracterizando um evento de decomposição do fármaco, já observado nas análises de DSC do fosfato de clindamicina (Figura 30) ($T_{\text{peak}} = 200,8 \text{ °C}$). Uma última etapa de perda de massa de 6,80% é observada em 343,4 °C.

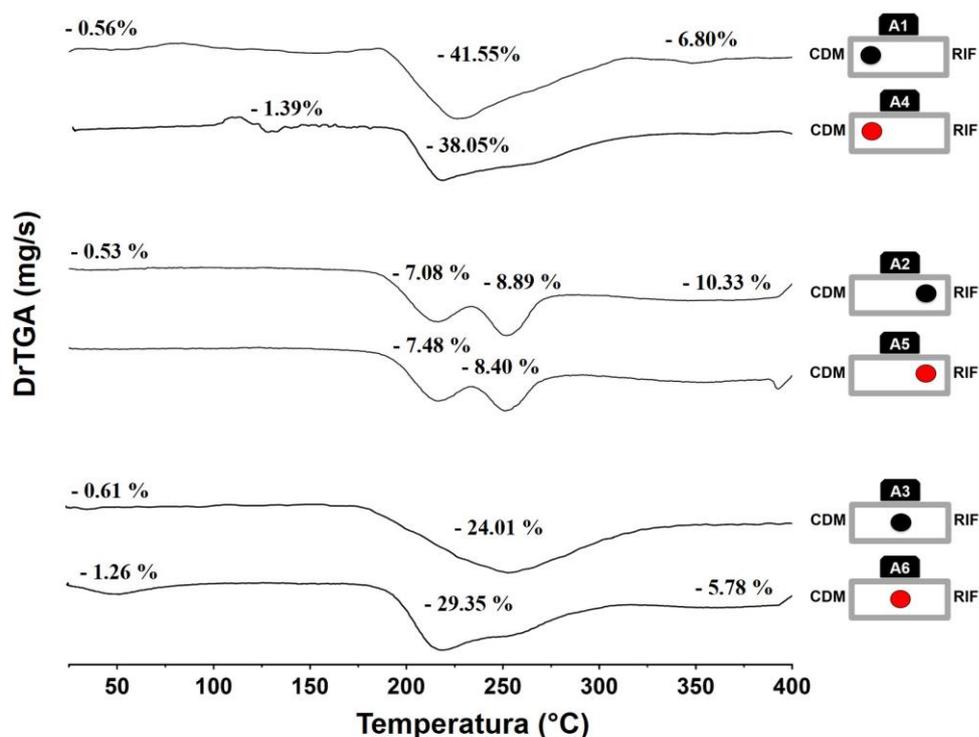


Figura 32. Primeira derivada de análises termogravimétricas (DrTGA) de fosfato de clindamicina (CDM), rifampicina (RIF) e mistura física antes e após o processamento farmacêutico (A1 a A6) juntamente com a porcentagem de perda de massa em cada pico. Taxa de aquecimento de 10 °C/min de 25 a 400 °C sob atmosfera controlada de nitrogênio com vazão de 50 mL/min.

As curvas DrTGA da rifampicina comprovam o seu estado na isoforma II, de acordo com relatos da literatura (201,203). Com as análises de DrTGA da amostra 2, (Figura 32), observa-se seu estado cristalino que mantém estabilidade térmica até 188 °C. Após essa temperatura, dois eventos significativos ocorrem em 214 °C e 252,9 °C (perda de massa de 7,08% e 8,89%, respectivamente). Essas faixas de perda de massa estão diretamente relacionadas aos eventos térmicos (recristalização simultânea à decomposição) das temperaturas das curvas de DSC (Figura 30).

As análises de DrTGA, representadas na Figura 32 da mistura física dos fármacos (A3) também estão de acordo com os resultados do DSC dessa mesma amostra (Figura 30). A mistura física apresentou um primeiro evento de perda de massa (0,61%) seguida de um passo largo de perda de massa expressiva de 24% iniciando em 201 °C, correspondendo ao somatório de eventos de decomposição do fosfato de clindamicina e recristalização/decomposição da rifampicina. É importante ressaltar que não houve antecipação da decomposição das amostras contendo os fármacos combinados, indicando que a interação térmica observada no DSC não repercute na sua estabilidade sob altas temperaturas.

Invariavelmente, as amostras processadas termicamente (A4, A5 e A6) apresentaram um perfil de degradação e porcentagens de perda de massa equivalentes aos das amostras não processadas, como mencionado anteriormente.

Os fármacos, separadamente e em mistura na proporção 1:1 (p/p), também foram avaliados utilizando TGA relacionada a análise de DSC acoplada à microscopia óptica (DSC-fotovisual) (Figura 33). A fusão do fosfato de clindamicina iniciou-se a 160° C, quase indistinguível ao escurecimento da amostra e do início da perda de massa que, segundo a TGA, ocorreu a partir de 193 °C em um único passo com 41% de perda de massa. Por sua vez, a rifampicina apresentou decomposição começando em 232 °C compreendendo dois eventos térmicos de perda de massa, a primeira terminando em 284 °C com uma perda de massa de 20% e a segunda ultrapassando 500 °C com uma perda de massa de 36%. Nesses dois casos, a proximidade dos fenômenos de fusão e decomposição, que ocorrem de forma sucessiva e quase simultânea impedem a distinção visual da liquefação dos cristais.

A mistura física dos fármacos apresentou um perfil de decomposição térmica composto pela soma dos eventos individuais de decomposição de cada fármaco. Essa amostra apresentou um primeiro passo de decomposição na faixa de 198 –

310 °C, correspondente à decomposição do fosfato de clindamicina e à primeira fase de degradação da rifampicina. A perda de massa teórica esperada para essas etapas (31%) praticamente coincide com o valor experimental observado de 33%. O segundo evento térmico da mistura física apresentou uma perda de massa de 23%, correspondente à decomposição da segunda fase da rifampicina.

Esses resultados indicam a preservação da estabilidade de seus componentes mesmo em altas temperaturas, sugerindo compatibilidade entre os fármacos, inclusive nas condições de produção de CLN.

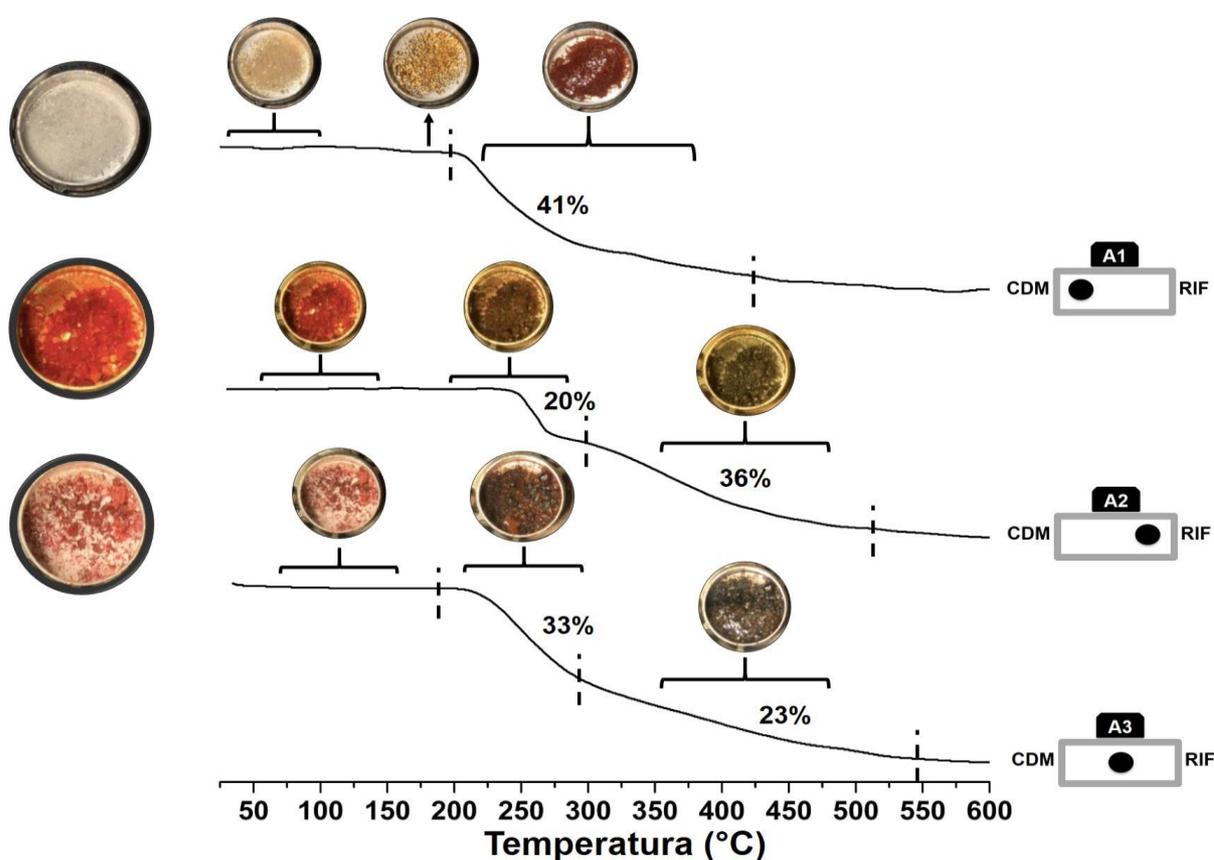


Figura 33. Análise fotovisual obtida por DSC e relacionada a TGA do fosfato de clindamicina (CDM), rifampicina (RIF) e mistura física CDM:RIF (1:1, m/m) (A1, A2 e A3).

Os resultados de análise térmica foram associados aos resultados de FTIR visando à melhor interpretação dos fenômenos observados, uma vez que esta técnica consegue avaliar a ocorrência de interações entre as diferentes moléculas em seu estado sólido mediante a comparação das bandas referentes às moléculas de interesse (204).

Assim, os espectros FTIR do fosfato de clindamicina, da rifampicina e da mistura física sem e com processamento farmacêutico (A1 a A6) foram obtidos com objetivo de (i) avaliar possíveis degradações químicas nos sistemas devido aos tratamentos que foram submetidos e (ii) investigar a possível ocorrência de interações fármaco/fármaco. As posições das bandas nos espectros de FTIR são apresentadas em número de ondas cuja unidade é o centímetro inverso (cm^{-1}) e as intensidades das bandas estão expressas como transmitância. A chamada radiação infravermelha corresponde à parte do espectro situada entre as regiões do visível e das micro-ondas e a região de maior interesse na identificação de estruturas está situado entre 4.000 e 400 cm^{-1} .

O espectro FTIR do fosfato de clindamicina (A1) (Figura 34a) apresenta os principais picos, indicados na região entre 1600 cm^{-1} e 600 cm^{-1} pelo aparecimento de vibrações esqueléticas que se originam das vibrações dos anéis de pirrol e sacarídeo, que são os principais componentes da estrutura das moléculas do fosfato de clindamicina (205,206). Dessa forma, observa-se uma primeira banda larga com um máximo a 3444 cm^{-1} , o que corresponde às vibrações dos grupos O-H dos álcoois aromáticos. Uma outra banda é evidenciada em 1683 cm^{-1} devido ao estiramento N-C=O do grupo carbonila. Além disso, em 1460 cm^{-1} ocorre o estiramento C-N do grupo pirrolidina e em 1049 cm^{-1} o estiramento do éter cíclico (C-O) no grupamento da galactose. E por fim, o grupamento fosfato (P-O) é marcado por uma banda em 788 cm^{-1} .

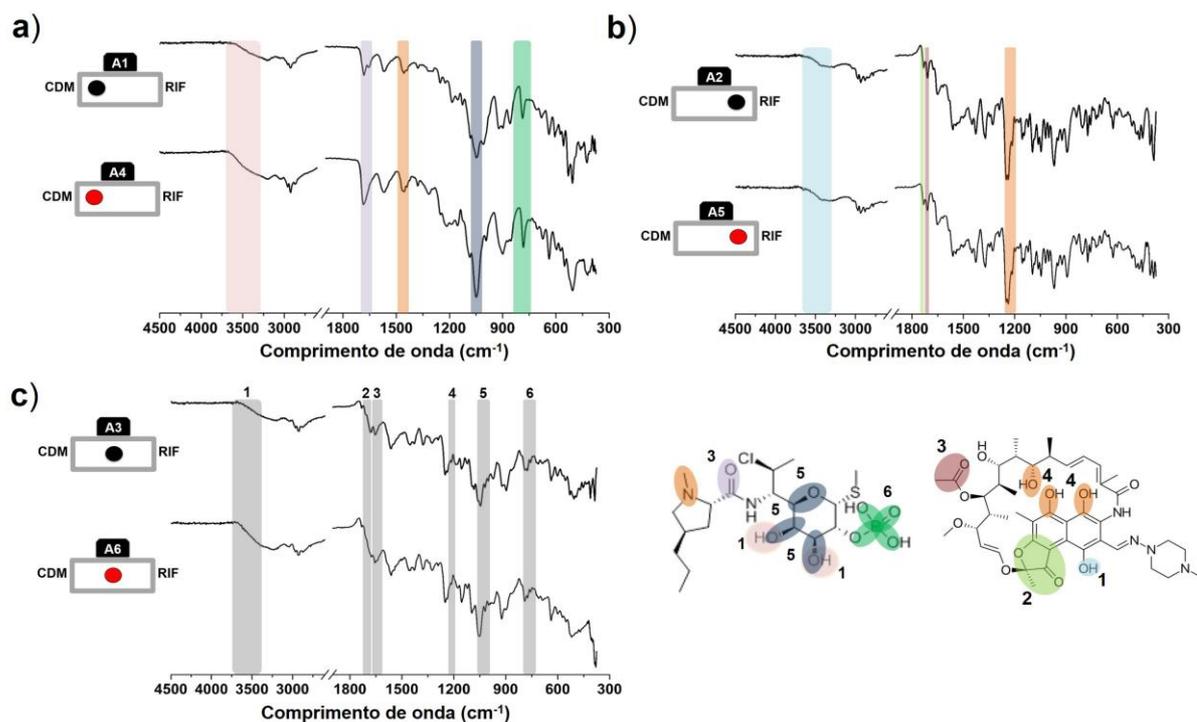


Figura 34. Espectros FTIR de fosfato de clindamicina (CDM) (a), rifampicina (RIF) (b) e da mistura física (c) antes e após processamento farmacêutico. Uma estrutura química de cada fonte é mostrada e seus respectivos grupos são acordados com cores ou numerados de acordo com a estrutura.

Como anteriormente mencionado, a literatura relata um polimorfismo da rifampicina, podendo estar na forma I ou na forma II. As dissimilaridades nos espectros de FTIR para as formas I e II foram baseadas nas diferenças na ligação de hidrogênio intramolecular (201,207). A área de interesse é principalmente na região de 1700 a 1750 cm^{-1} .

O espectro FTIR da rifampicina (A2) apresentou uma única banda em 3423 cm^{-1} referente às hidroxilas (—OH) da cadeia ansamicina, além de bandas de absorção em números de onda de, aproximadamente, 1732 cm^{-1} (grupo furanona), 1710 cm^{-1} (grupo acetil) e estiramento C-O com bandas fortes em 1247 cm^{-1} , como evidenciados na Figura 34b. Esses resultados estão de acordo com estudos encontrados na literatura (208–210). Portanto, as diferenças observadas nas bandas de absorção referentes aos grupos —OH da cadeia ansa, furanona e acetil foram suficientes para de fato comprovar que a rifampicina encontra-se em sua isoforma II (209).

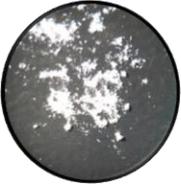
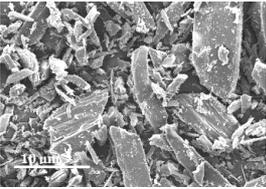
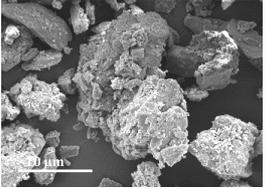
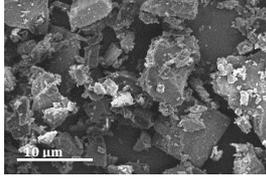
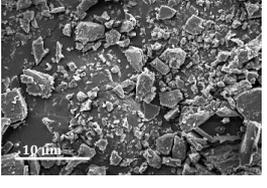
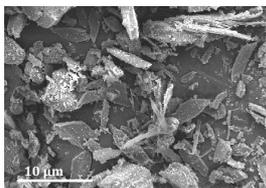
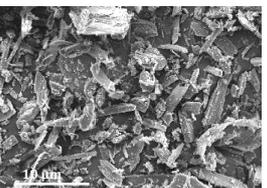
O espectro FTIR da mistura física (Figura 34c) (A3) apresentou as bandas referentes ao grupo furanona da rifampicina seguida do grupamento acetil sobreposto ao grupamento N-C=O do grupo carbonila do fosfato de clindamicina

relacionados na mesma posição dos fármacos sem tratamento. Além disso, o estiramento C-O presente na estrutura molecular da rifampicina e as bandas do estiramento do éter cíclico (C-O) no grupamento da galactose e o grupamento fosfato (P-O) permaneceram inalterados.

Além disso, o processamento simulado de produção dos CLN realizado com cada fármaco separadamente (A4 e A5) não afetou seu perfil espectroscópico com base na similaridade dos espectros antes e após o tratamento (coeficientes de correlação para o fosfato de clindamicina e rifampicina de 0,991 e 0,985, respectivamente, Tabela 13).

Já o espectro de FTIR da mistura física após o processamento mostrou as bandas características referentes às amostras sem o processamento farmacêutico não apresentando alterações expressivas (coeficientes de correlação = 0,958, Tabela 13), o que demonstra alto grau de similaridade para cada banda do espectro apresentado e indica a não-ocorrência de reações destrutivas nas amostras (211).

Tabela 13. Fotomicrografias e coeficientes de correlação do FTIR do fosfato de clindamicina (CDM), rifampicina (RIF) e mistura física antes e após tratamento farmacêutico. MEV: Microscopia eletrônica de varredura.

Amostra	Antes		Depois		FTIR
	Fotomicrografias	MEV	Fotomicrografias	MEV	
CDM					0,991
RIF					0,985
Mistura física					0,958

O aspecto morfológico dos fármacos com e sem processamento farmacêutico também foi avaliado por meio de fotomicrografias capturadas por microscopia óptica e microscopia eletrônica de varredura (Tabela 13). Antes do processamento, os fármacos mostraram individualmente suas características típicas de coloração: rifampicina com uma cor vermelha escura e o fosfato de clindamicina com uma cor branca. As fotomicrografias de microscopia eletrônica de varredura mostraram apenas algumas mudanças no tamanho das partículas dessas amostras. Após a mistura dos fármacos, os componentes individuais puderam ser facilmente identificados e o sistema manteve sua homogeneidade, tanto para análise de microscopia óptica quanto para a microscopia eletrônica de varredura. O processamento térmico das amostras mostrou um ligeiro escurecimento dos sistemas nas fotomicrografias capturadas por microscopia óptica, o que provavelmente se deve a uma solubilização parcial da rifampicina e subsequente cristalização na superfície do fosfato de clindamicina.

Por fim, as características difratométricas das amostras foram avaliadas por análise de XRPD, e os difratogramas estão apresentados na Figura 35.

Os fármacos revelaram um perfil cristalino antes e após o tratamento farmacêutico (Figura 35). No entanto, uma mudança notável no perfil difratométrico do fosfato de clindamicina ocorreu após este tratamento. Enquanto o fosfato de clindamicina não tratado mostrou picos em $5,54^\circ$ e $10,96^\circ$, o perfil de difratometria da amostra tratada sugeriu uma mudança de fase, com o aparecimento de vários picos de pequena intensidade, mostrando particularmente picos em $5,62^\circ$ e $9,52^\circ$. A simulação das etapas de produção dos CLN leva a uma solubilização e recristalização do fosfato de clindamicina que modificam seu perfil cristalino. No entanto, essa alteração não deve ter repercussões farmacêuticas importantes, pois a amostra apresentou o mesmo perfil térmico e a mesma estabilidade (212).

O perfil difratométrico da rifampicina apresentou um padrão de pico principal em ângulos 2θ de $9,96^\circ$, $10,8^\circ$, $11,18^\circ$, $15,74^\circ$, $17,02^\circ$ e $19,94^\circ$. Em particular, os picos que apareceram em 9° e 11° , juntamente com a ausência de picos em 13° e 14° , evidenciam mais uma vez o polimorfo II da rifampicina (208). A ausência de novos picos indica a manutenção da fase cristalina original da rifampicina, mesmo após o processamento farmacêutico da amostra, que envolveu intervenções físicas

abruptas, uma vez que os principais picos da fase cristalina do fármaco original em 9° e 11° podem ainda ser identificados.

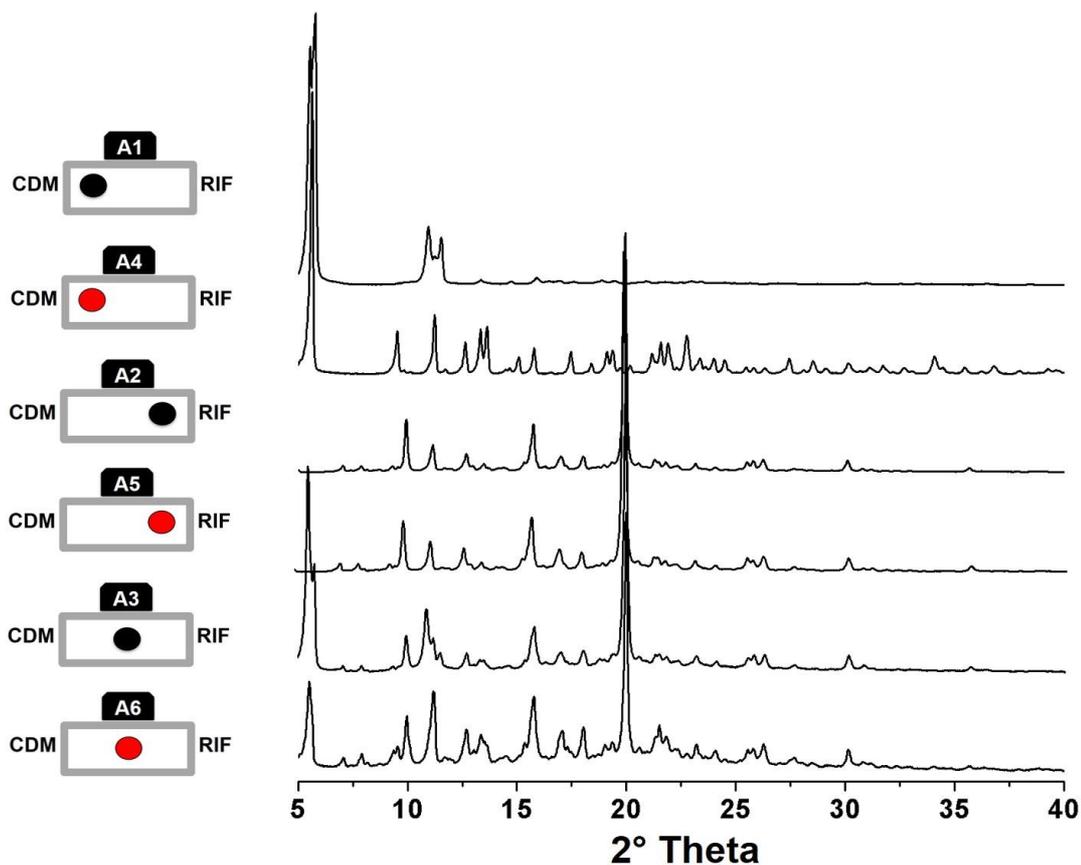


Figura 35. Difratogramas XRPD do fosfato de clindamicina (CDM), rifampicina (RIF) e mistura física (antes e após processamento farmacêutico). Velocidade de varredura de $2^\circ/\text{min}$ com incremento de $0,02^\circ/\text{min}$. Os padrões de difração em ângulos entre 5 e 60° ($\theta - 2\theta$).

Os perfis difractométricos da mistura física (Figura 35) exibiram os picos característicos de cada fármaco ($9,94^\circ$ e $10,86^\circ$ para o polimorfo II da rifampicina e $5,46^\circ$ e $9,94^\circ$ para o fosfato de clindamicina). Com o processamento farmacêutico, os picos nos ângulos para a rifampicina permaneceram inalterados e para o fosfato de clindamicina observou-se o mesmo comportamento mencionado anteriormente quando este fármaco foi aquecido de forma isolada.

Em geral, esses resultados demonstraram que não houve alterações químicas e físicas significativas nos fármacos quando associados, o que torna possível a sua formulação em um mesmo produto farmacêutico. Esse conjunto de ensaios também apontaram para o fato de que o processamento farmacêutico utilizado no preparo de CLN não deve afetar essa compatibilidade fármaco-fármaco.

5.5 Obtenção e caracterização dos nanocarreadores lipídicos

O desenvolvimento de formulações contendo fosfato de clindamicina e rifampicina como opção terapêutica tópica para a hidradenite supurativa, assim como de outras infecções menos severas que atingem as unidades pilosebáceas da pele, como foliculites e queratoses capilares, é ainda uma demanda no panorama mundial. Este trabalho propôs a co-encapsulação desses fármacos em nanocarreadores lipídicos na tentativa de direcionar a liberação dos fármacos para o alvo de ação da doença, que são as estruturas pilosebáceas da pele.

Os CLN foram obtidos baseado no método de diluição da microemulsão (181). Primeiramente, os CLN sem os fármacos e com os fármacos foram preparados e logo em seguida foram realizadas as primeiras análises de caracterização, avaliando-se diâmetro hidrodinâmico, índice de polidispersividade, potencial zeta, rendimento de produção, eficiência de encapsulação, carga dos fármacos e pH.

A formulação constituída de CLN apresentou uma coloração branco-amarelada e os CLN contendo fosfato de clindamicina e rifampicina uma cor alaranjada, que é característica da presença de rifampicina na formulação (Figura 36).

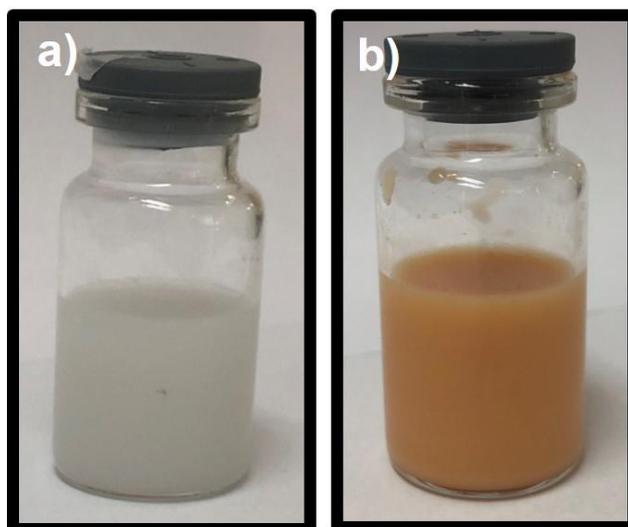


Figura 36. Imagens capturadas dos CLN desenvolvidos. Na figura, CLN sem os fármacos (a) e CLN com os fármacos (b).

Com o objetivo de avaliar a influência da quantidade dos fármacos (fosfato de clindamicina e rifampicina) nas propriedades físico-químicas dos nanocarreadores, especialmente na eficiência de encapsulação e carga dos fármacos, os CLN foram preparados contendo diferentes proporções de fosfato de clindamicina e rifampicina. Assim, o sistema 1 continha 4 mg de cada fármaco (proporção molar fármacos/lipídios = 3,5:1000), o sistema 2 continha 6 mg de cada fármaco (proporção molar fármacos/lipídios = 5,25:1000) e o sistema 3 era composto com 8 mg de cada fármaco (proporção molar fármacos/lipídios = 7:1000). Os resultados de caracterização podem ser observados na Tabela 14.

Tabela 14. Dados da caracterização dos CLN. Para cada CLN: diâmetro hidrodinâmico; índice de polidispersividade (Pdl); potencial zeta; eficiência de encapsulação; carga dos fármacos e pH. O CLN CDM-RIF 1 corresponde a 4 mg de cada fármaco; CLN CDM-RIF 2, 6 mg de cada fármaco e CLN CDM-RIF 3, 8 mg de cada fármaco - fosfato de clindamicina (CDM) e rifampicina (RIF) (n = 3).

Amostra	Diâmetro (nm)	Pdl	Potencial Zeta (mV)	Eficiência de encapsulação (%)		Carga dos fármacos (%)		pH
				CDM	RIF	CDM	RIF	
CLN	433 ± 22	0,29 ± 0,04	-43 ± 2	-	-	-	-	6,3
1	400 ± 14	0,27 ± 0,01	-49 ± 1	80,2 ± 0,4	93,4 ± 0,7	0,49 ± 0,01	0,57 ± 0,01	6,4
2	877 ± 29	0,42 ± 0,01	-48 ± 2	86,7 ± 0,6	98,1 ± 0,8	0,78 ± 0,01	0,86 ± 0,01	6,5
3	905 ± 77	0,39 ± 0,06	-55 ± 2	81,5 ± 1,8	99,7 ± 0,1	0,97 ± 0,02	1,19 ± 0,01	6,3

Os CLN sem a presença dos fármacos (Tabela 14) apresentaram diâmetros hidrodinâmicos médios iguais a $433,2 \pm 21,7$ nm e uma distribuição de tamanho monomodal e homogênea, com índice de polidispersividade de $0,29 \pm 0,04$. Um estudo reportou que nanossistemas que apresentem diâmetro hidrodinâmico na faixa de 400 a 700 nm são capazes de penetrar mais profundamente os folículos pilosos do que nanossistemas maiores que essa faixa ou menores (213) e, portanto, esses CLN foram considerados adequados para o objetivo do estudo.

O potencial zeta é uma medida da magnitude da repulsão/atração eletrostática ou da carga entre partículas e é um dos parâmetros fundamentais conhecidos por afetar a estabilidade trazendo uma noção das causas da dispersão, agregação ou floculação (214). A estabilidade das partículas é relacionada ainda com a magnitude do potencial zeta, podendo ser positivo ou negativo. Dessa maneira, quanto maior for o valor do potencial zeta, maior será a estabilidade da

formulação, pois as partículas estarão em maior repulsão mantendo os sistemas mais estáveis (214–216).

Os nanocarreadores lipídicos sem os fármacos apresentaram valores elevados de potencial zeta com carga superficial negativa ($-43,4 \pm 2,53$ mV). Essa carga negativa é proveniente da própria composição do nanocarreador lipídico de ácido esteárico e ácido oleico, que são negativamente carregados em pHs próximos à neutralidade (6,3 a 6,5). Esses valores são próximos aos encontrados na literatura para sistemas semelhantes em termos de composição (163,217,218).

A inserção das menores proporções de fármaco nos CLN não alterou significativamente ($p > 0,05$) o diâmetro médio das partículas ou índice de polidispersão (Tabela 14). Observou-se, no entanto, que à medida que a proporção dos fármacos aumentava nos CLN, o diâmetro das partículas também era aumentado, assim como o índice polidispersibilidade (Tabela 14). Por exemplo, quantidades mais elevadas dos fármacos (amostra 2 e 3) resultaram em diâmetros hidrodinâmicos das partículas acima de 800 nm além de um índice de polidispersividade em torno de 0,4. Em relação ao potencial zeta, a incorporação dos fármacos no sistema aumentou significativamente ($p < 0,05$) o seu valor, e o maior valor de potencial zeta foi conseguido com a inserção de maiores quantidades dos fármacos nos CLN.

Por fim, avaliando a eficiência de encapsulação dos fármacos nos CLN, entre 80,2 e 86,7% de fosfato de clindamicina foi encapsulada ao passo que proporções maiores (entre 93,4 e 99,7%) de rifampicina conseguiram se associar aos nanocarreadores lipídicos, dependendo da proporção de fármacos adicionada ao sistema. Essa maior taxa de encapsulação da rifampicina relativa ao fosfato de clindamicina pode ser explicada à maior lipossolubilidade do primeiro fármaco [$\log P_{\text{CDM}} = 0,50$ (18); $\log P_{\text{RIF}} = 3,17$ (17)], o que permite uma melhor acomodação dele no interior dos nanocarreadores lipídicos.

Para a seleção do melhor sistema para dar prosseguimento aos estudos, levou-se em consideração que o parâmetro mais significativamente afetado pelo aumento da proporção de fármaco nos CLN foi o tamanho médio das nanoestruturas, uma vez que poderiam influenciar negativamente o direcionamento dos fármacos para os folículos pilosos, que era o objetivo majoritário do trabalho. Assim, a amostra 1 dos CLN produzida com 4 mg de fosfato de clindamicina e 4 mg de rifampicina (concentração de cada fármaco = 266,67 $\mu\text{g/mL}$), que apresentaram

diâmetro hidrodinâmico de $400,0 \pm 14,2$ nm, distribuição de tamanho mais homogêneo (PDI = 0,27), potencial zeta igual a $-48,9 \pm 0,70$ mV foi capaz de encapsular $80,2 \pm 0,4\%$ de fosfato de clindamicina e $93,4 \pm 0,7\%$ de rifampicina foi selecionado para o estudo. A recuperação avalia a perda de fármaco durante o processo de produção das nanopartículas, nesse caso foram obtidos valores $> 80\%$.

As cargas dos fármacos nesse sistema estiveram dentro do intervalo esperado considerando a composição teórica usada na preparação dos CLN (com carga de $0,49 \pm 0,01\%$ para fosfato de clindamicina e $0,57\%$ para rifampicina). Por fim, os valores de pH da dispersão dos nanocarreadores contendo os fármacos, que variaram pouco em comparação ao CLN sem os fármacos, (Tabela 14) foi igual a 6,4, que é compatível com a faixa de pH tolerada pela pele, que seria entre 5,5 e 7,4 (219).

5.6 Análise morfológica

Em um sistema nanoparticulado, um parâmetro que corrobora para transporte e interação de fármacos com as membranas biológicas é a superfície de contato da partícula. Na Figura 37, as fotomicrografias obtidas por microscopia eletrônica de transmissão para os nanocarreadores lipídicos selecionados estão mostradas.

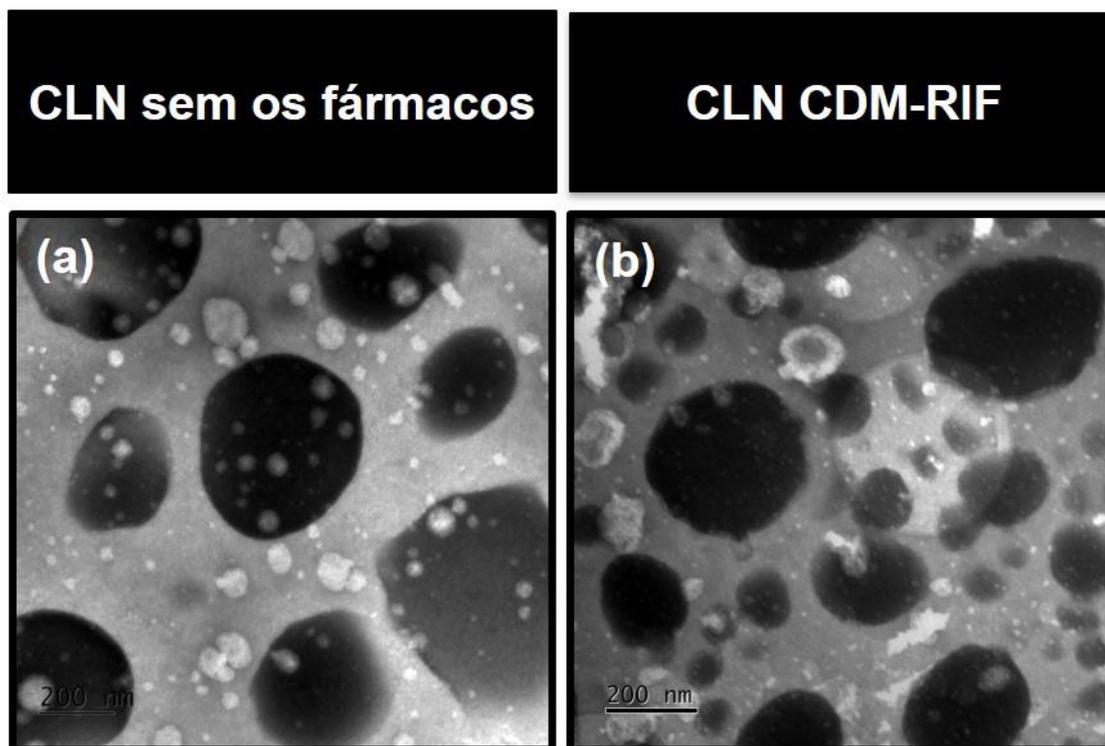


Figura 37. Fotomicrografias obtidas por microscopia eletrônica de transmissão dos CLN sem os fármacos, fosfato de clindamicina (CDM) e rifampicina (RIF) (a) e CLN contendo os dois fármacos (CLN CDM-RIF) (b).

As imagens confirmaram a formação dos nanocarreadores lipídicos sem uma distinção morfológica entre as amostras que contêm ou não os fármacos. Além disso, os tamanhos de partícula encontrados são semelhantes aos determinados pelas análises de espalhamento de luz dinâmica (Tabela 14). Embora a morfologia apresente algumas diferenças no valor de diâmetro hidrodinâmico, a secagem do solvente da formulação e a necessidade de submissão da amostra ao processo de coloração para análise por microscopia eletrônica de transmissão pode ter alterado sutilmente a dimensão dos nanocarreadores lipídicos (214).

5.7 Estudo preliminar de estabilidade dos nanocarreadores lipídicos

A estabilidade dos CLN contendo os fármacos (fosfato de clindamicina e rifampicina) foi um estudo preliminar avaliado nos dias 0 (logo após o preparo), 7, 15, 30 e 60, com triplicata das amostras armazenadas à temperatura de 5 ± 3 °C. Optou-se por não se avaliar em temperaturas maiores, uma vez que a própria natureza lipídica desses sistemas requerem o seu armazenamento em temperaturas menores que a temperatura ambiente. As análises para se determinar estabilidade

física e química das amostras foram realizadas por meio da observação das possíveis alterações do diâmetro hidrodinâmico, índice de polidispersividade e potencial zeta dos CLN, além da eficiência de encapsulação, pH da nanodispersão e aspectos visuais (Tabela 15).

Tabela 15. Diâmetro hidrodinâmico (nm), índice de polidispersividade, potencial zeta (mV), eficiência de encapsulação (%). pH e imagens dos CLN contendo fosfato de clindamicina (CDM) e rifampicina (RIF) (CLN CDM-RIF) armazenados a 5 ± 3 °C nos dias 0, 7, 15, 30 e 60.

Dia	Diâmetro (nm)	Pdl	Potencial Zeta (mV)	Eficiência de encapsulação (%)		pH	Imagem
				CDM	RIF		
0	433 ± 22	0.31 ± 0.06	-46 ± 1	81.2 ± 0.6	95.1 ± 0.7	6.6 ± 0.1	
7	428 ± 22	0.34 ± 0.04	-47 ± 3	82.6 ± 0.9	94.2 ± 0.4	6.7 ± 0.3	
15	458 ± 15	0.38 ± 0.06	-46 ± 1	81.7 ± 1.6	93.0 ± 0.5	6.4 ± 0.7	
30	439 ± 5	0.37 ± 0.06	-42 ± 1	80.2 ± 0.5	89.1 ± 0.5	6.4 ± 0.7	
60	491 ± 8	0.37 ± 0.01	-45 ± 1	79.9 ± 0.2	82.3 ± 1.4	6.4 ± 0.7	

Com o passar do tempo, os nanocarreadores lipídicos podem se aderir uns aos outros, formando agregados, que sob a influência da gravidade se sedimentam, reduzindo o seu tempo de armazenamento e a validade de um medicamento contendo essas nanoestruturas.

Durante os 60 dias de armazenamento, o tamanho médio dos nanocarreadores lipídicos permaneceu estável com uma variação significativa ($p < 0,05$), mas inferior a 59 nm (~ 10%) entre o primeiro e último dia de análise. O sistema manteve-se monodisperso com valores de Pdl abaixo de 0,38 (Tabela 15). Em relação aos aspectos da coloração, a formulação permaneceu um líquido de cor alaranjada sem sinais de escurecimento ou clareamento ao longo do tempo

(Tabela 15). O potencial zeta e o pH mantiveram-se sem alterações significativas para a condição de estudo ($p > 0,05$). Esse conjunto de resultados mostra que a formulação é fisicamente estável, possivelmente devido às cargas superficiais das nanopartículas, que contribuem para que elas sofram repulsão, evitando a agregação durante o período de estocagem. Com relação ao teor de fármacos encapsulados, foi observado que aproximadamente 1,6% de clindamicina e 13% de rifampicina foram expulsos dos CLN após 60 dias de estocagem (Tabela 15). Esse conteúdo de fármacos expelido é pequeno em relação ao período de estocagem que foi estudado e sua viabilidade como produto industrial, no entanto, poderá ser alcançada promovendo, por exemplo, a secagem do material por liofilização. Dessa forma, esses ensaios de estabilidade apontaram para a necessidade de se manter o sistema na temperatura de 5 ± 3 °C, que é a temperatura de refrigeração, para garantir estabilidade pelo período de pelo menos 60 dias, e da necessidade de se trabalhar com o sistema seco ou implementar algumas alterações na formulação para garantir estabilidade por períodos mais prolongados.

5.8 Dinâmica molecular dos nanocarreadores lipídicos

Os espectros de RPE obtidos a partir da marcação do *spin* 5-DSA das amostras de nanocarreadores lipídicos (CLN sem os fármacos e CLN com os fármacos) foram obtidos para analisar a dinâmica molecular dos CLN com a inserção dos fármacos. Os espectros estão apresentados na Figura 38, que também mostra os valores médios do parâmetro de divisão hiperfina $2A_{||}$ (medidos diretamente no espectro), de modo que a rigidez (mobilidade reduzida) do ambiente lipídico é representada pelos valores mais altos de $2A_{||}$.

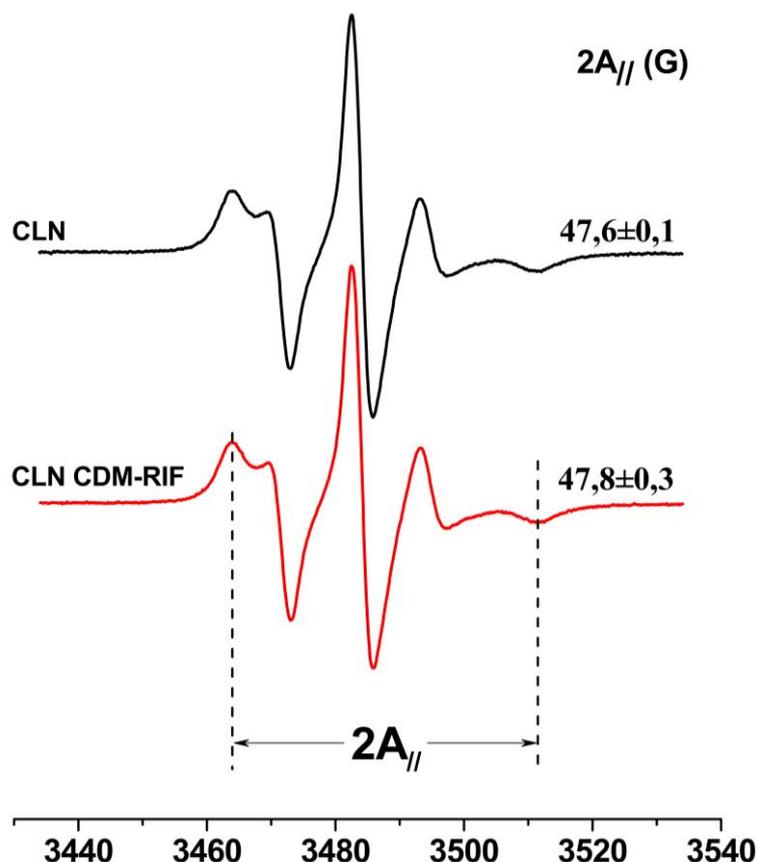


Figura 38. Espectros de RPE a 298 K com marcador de *spin* 5-DSA estruturado em CLN sem os fármacos e CLN contendo fosfato de clindamicina e rifampicina (CLN CDM-RIF). Para todos os espectros, a faixa total de varredura do campo magnético foi de 100 G. Os valores médios do parâmetro de divisão hiperfina externa da espectroscopia de RPE ($2A_{||}$) medidos diretamente no espectro de RPE (separação entre linhas tracejadas, em unidades de campo magnético) são indicados, $n = 3$.

O marcador de *spin* 5-DSA, que contém o nitróxido (grupo paramagnético) conectado à posição 5 da cadeia de carbono, já foi usado em estudos anteriores para monitorar a dinâmica lipídica no microambiente mais próximo da superfície do transportador polar (183,184).

Em geral, o espectro de RPE do 5-DSA estruturado em sistemas lipídicos à temperatura ambiente mostra linhas mais amplas, indicando movimento mais lento e anisotrópico. Esta linha espectral permite a medição do parâmetro $2A_{||}$ (indicado na Figura 38), amplamente utilizado para monitorar a fluidez lipídica (139,185).

Os espectros de 5-DSA incorporados aos CLN sem os fármacos mostraram valores de $2A_{||}$ em torno de $47,6 \pm 0,1$ G. Esse valor é consistente com a alta fluidez dessas membranas lipídicas, de acordo com os relatados por Da Rocha et al.

(2019), que observaram valores de $2A_{//}$ em torno de 46,5 G para rotação de outros CLN marcados com a mesma sonda (183).

Desta forma, os CLN sem os fármacos demonstraram ser um ambiente rígido, sugerindo que a mistura lipídica empregada nessa partícula tem uma melhor capacidade de acomodação molecular no ambiente próximo ao 5-DSA, que deve resultar em controle de liberação dos fármacos neles encapsulados (161,220).

Com a inserção dos fármacos nos CLN (Figura 38) não foram observadas diferenças significativas nos valores de $2A_{//}$ nem na forma da linha das formulações ($p > 0,05$). Em outras palavras, a adição dos fármacos (fosfato de clindamicina e rifampicina) dentro das nanoestruturas lipídicas não foi capaz de alterar nem a fluidez nem a localização do 5-DSA na partícula. Como esse marcador é mais sensível às mudanças na superfície polar, esse resultado indica que os fármacos provavelmente estão distribuídos mais perto do núcleo dos nanocarreadores (220), o que deve resultar em uma liberação controlada deles.

5.9 Ensaios *in vitro* de liberação de fosfato de clindamicina e rifampicina a partir dos nanocarreadores lipídicos

O estudo de liberação foi realizado *in vitro* com o objetivo de avaliar a velocidade com que os fármacos eram liberados dos nanocarreadores lipídicos. O perfil de liberação de fosfato de clindamicina e rifampicina foi comparado ao controle contendo mesma quantidade dos fármacos livres em solução. Os perfis de liberação dos fármacos a partir das formulações estão apresentados na Figura 39.

Quase a totalidade do fosfato de clindamicina e rifampicina em solução atravessaram a membrana hidrofílica de celulose no período de 12 h. Por outro lado, o fosfato de clindamicina (Figura 39a) foi liberado dos CLN em uma velocidade significativamente menor ($p \leq 0,001$), como era esperado. Pela análise do perfil de liberação obtido, foi verificado que a liberação do fosfato de clindamicina da estrutura dos CLN ocorreu em duas fases, com uma taxa de liberação maior no início, que deve estar relacionado à quantidade de fármaco livre na formulação ou que estavam associados à superfície das nanoestruturas, e logo após uma liberação um pouco mais lenta.

De fato, perfís semelhantes de liberação já foram observados em estudos anteriores no desenvolvimento nanopartículas contendo outros fármacos hidrofílicos, como por exemplo a arginina (221) e o minoxidil (51).

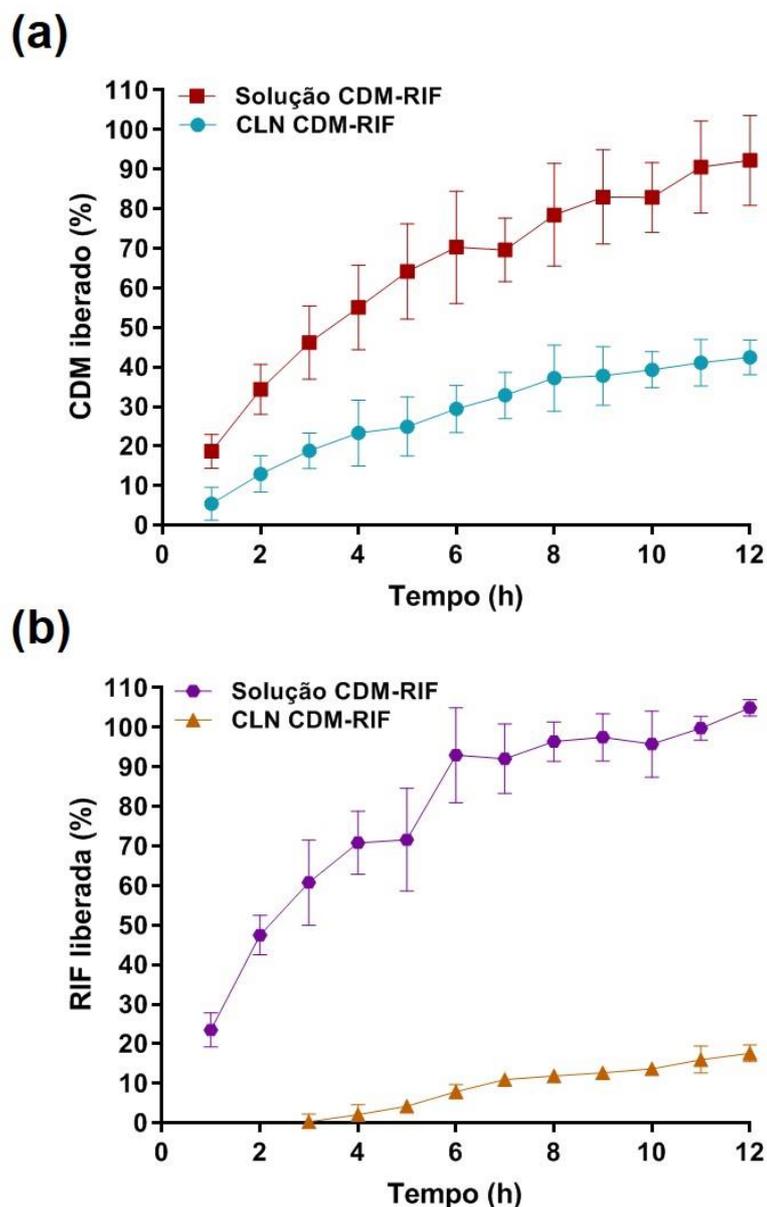


Figura 39. Perfís de liberação de fosfato de clindamicina (CDM) (a) e rifampicina (RIF) (b) a partir dos CLN (CLN CDM-RIF) em comparação ao controle contendo a mesma concentração dos fármacos (solução CDM-RIF), pH 6.5 (n = 5). Análise estatística por Teste t *Student* para amostras independentes.

Com base nos valores de regressão (r^2) obtidos pelo cálculo matemático (ordem zero, modelo de *Higuchi*, modelo de primeira ordem, *Weibull* e *Hixson*

Crowell), cujos valores estão apresentados na Tabela 16, observou-se que a liberação do fosfato de clindamicina seguiu um perfil cinético de liberação que se aproxima mais do modelo de *Higuchi*, já que se aplicando este modelo obteve-se um valor de coeficiente de correlação linear mais próximo de um.

Tabela 16. Valores de r^2 encontrados nos diferentes modelos de cinética de liberação para os nanocarreadores lipídicos. CDM = fosfato de clindamicina e RIF = rifampicina.

Amostra	Fármaco	Ordem zero r^2	<i>Higuchi</i> r^2	Primeira ordem r^2	<i>Weibull</i> r^2	<i>Hixon-Crowell</i> r^2
CLN	CDM	0,9459	0,9914	0,7854	0,9741	0,9625
	RIF	0,9944	0,9803	0,8921	0,9647	0,9282

Em 1963, *Higuchi* (222) desenvolveu e descreveu vários modelos teóricos para avaliar a liberação dos fármacos de matrizes. O modelo de *Higuchi* descreve a liberação dos fármacos baseando na lei de *Fick* dependente do tempo da raiz quadrada. Essa relação pode ser usada para descrever a dissolução do fármaco a partir de vários tipos de formas farmacêuticas de liberação modificada (223).

Os perfis para rifampicina a partir das formulações mostraram uma cinética de liberação diferente do fosfato de clindamicina, com maior controle de liberação do fármaco. Isto porque a rifampicina tem características mais lipofílicas (18) e, como mencionado anteriormente, deve se associar mais fortemente à matriz lipídica, o que retardou a sua liberação (Figura 39b). Assim, os CLN mostraram uma liberação controlada da rifampicina de 20,71% em 12 h, e a liberação foi significativamente menor que o respectivo controle ($p \leq 0,0001$). Esse mesmo perfil de liberação foi observado durante o desenvolvimento de nanopartículas contendo moléculas que também apresentam baixa solubilidade aquosa como a camptotecina (224), espirolactona (172) e o carvedilol (225).

Quanto ao modelo cinético de liberação desempenhado pela rifampicina encapsulada nos CLN, foi observada uma relação linear entre a porcentagem de fármaco liberada em função do tempo, seguindo o modelo de ordem zero (valores de r^2 em torno de 0,99) (Tabela 16). Como as formulações farmacêuticas que apresentam esse perfil de ordem zero liberam a mesma quantidade do fármaco por unidade de tempo, são consideradas mais apropriadas para o desenvolvimento de sistemas de liberação prolongada (226).

Um perfil de liberação prolongado dos antibióticos encapsulados nos CLN é desejável para o tipo de terapia que se pretende, uma vez que se de fato as nanoestruturas se acumularem nos folículos pilosos após aplicação tópica, poderão atuar como um reservatório dos fármacos na pele. Isto proporcionaria um maior tempo de contato do fosfato de clindamicina e rifampicina ao local de desencadeamento da hidradenite supurativa e assim favorecer a manutenção de níveis altos de fármacos nessas estruturas cutâneas por períodos prolongados, beneficiando a terapia.

5.10 Estudos *in vitro* de permeação e penetração cutânea

5.10.1 Interações dos CLN com o estrato córneo

Este estudo teve como objetivo verificar o comportamento físico dos CLN quando aplicados topicamente.

O espectro de RPE do marcador de *spin* 5-DSA incorporado no estrato córneo (Figura 40a) mostrou uma forma de linha ampla e alto valor de $2A_{||}$ ($64,3 \pm 0,5$ G) consistente com a baixa fluidez dessas membranas; esse resultado está de acordo com os dados publicados anteriormente por Anjos et al. (2008) (185). No tratamento do estrato córneo com uma solução de fosfato de clindamicina ou rifampicina, não foi observada diferença significativa nos valores de $2A_{||}$ ($p > 0,05$), indicando que nenhum dos dois fármacos foi capaz de penetrar significativamente o microambiente do estrato córneo ao redor do marcador de *spin*.

Para avaliar a capacidade dos CLN de permitir a penetração dos fármacos no estrato córneo, as amostras de CLN sem os fármacos e CLN com os fármacos também foram marcadas e tratadas com amostras do estrato córneo.

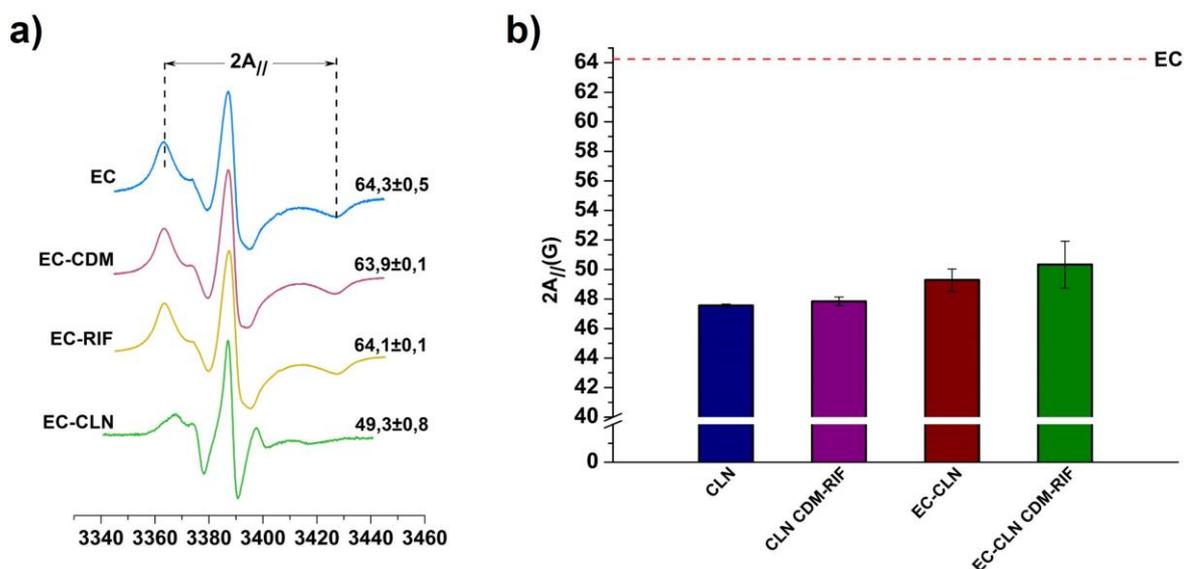


Figura 40. Espectros de RPE a 298 K do marcador de *spin* 5-DSA incorporado no estrato córneo (EC) tratado com fosfato de clindamicina (CDM), EC tratado com rifampicina (RIF) e EC tratado com CLN sem os fármacos (EC-CLN) (a) e valores médios de $2A_{||}$ das amostras com marcador de *spin* 5-DSA para todos os sistemas avaliados: CLN sem os fármacos, CLN contendo os dois fármacos (CLN CDM-RIF), EC-CLN e EC tratado com CLN com os fármacos (EC-CLN CDM-RIF), para comparação, o valor de $2A_{||}$ para o EC é indicado por linha tracejada (b). Os valores médios do parâmetro de divisão hiperfina externa do RPE ($2A_{||}$) medidos diretamente no espectro de RPE (separação entre linhas tracejadas, em unidades de campo magnético) são indicados, $n = 3$.

Como pode ser observado na Figura 40a, em comparação com a Figura 38, aqui, a dinâmica molecular nos CLN sem os fármacos aplicados nas membranas do estrato córneo foi aumentada, com aumentos nos valores de $2A_{||}$ de 47,6 G para 49,3 G (1,7 G). Essa redução na fluidez pode estar associada as interações diretas com os lipídios do estrato córneo, que por sua vez têm movimentos restritos ($2A_{||} = 64,3 \pm 0,5$ G, linha tracejada na Figura 40b). Os espectros de RPE dos CLN sem os fármacos com interação ao estrato córneo (EC-CLN) (Figura 40a) foram muito semelhantes aos dos CLN sem os fármacos (Figura 38) e distintos dos espectros do 5-DSA incorporados na estrutura do estrato córneo intacto. Esses resultados sugerem que a interação com os lipídios do estrato córneo não é suficiente para desestabilizar a organização molecular dos CLN sem os fármacos.

Nesse contexto, Mendanha et al. (2018) investigaram as interações de lipossomas flexíveis com as membranas do estrato córneo e analisadas por espectroscopia de RPE (227). Nesse estudo, foram observados que os nanotransportadores foram capazes de promover a migração do marcador de *spin*

das membranas do estrato córneo para o ambiente molecular da formulação, o que foi evidenciado pelos aumentos no parâmetro $2A_{||}$. Curiosamente, esse efeito dos lipossomas nas membranas do estrato córneo também ocorreu sem perda da relativa integridade lipossômica (227).

Curiosamente, quando os CLN contendo os fármacos foram aplicados ao estrato córneo (EC-CLN CDM-RIF), a rotação do marcador detectou um ambiente mais rígido do que aquele experimentado com as membranas tratadas com CLN sem os fármacos (EC-CLN), com valor de $2A_{||}$ de, aproximadamente, 50,5 G (aumento de 2,5 G). Diferentemente do encontrado apenas para as nanoestruturas sem os fármacos, aqui, a presença dos fármacos diminuiu consistentemente a mobilidade do sistema EC-CLN CDM-RIF em comparação com todos os outros sistemas avaliados.

Esse efeito pode ser interpretado como sendo decorrente da migração dos fármacos da região dos nanocarreadores lipídicos onde estavam inseridos para o ambiente lipídico do estrato córneo. Por sua vez, essa migração altera a rede de interação entre os fármacos próximos aos marcadores de *spin*, modificando a fluidez do meio, o que pode não ter sido observado nas nanoformulações devido à localização dos fármacos mais inseridos nos nanocarreadores.

A espectroscopia de RPE foi recentemente usada em outro estudo para investigar a interação de formulações veículo-fármaco com lipídios do estrato córneo que foram marcados com 5-DSA. Observou-se um aumento na permeabilidade das membranas do estrato córneo associado ao grande aumento da mobilidade dos lipídios do estrato córneo (evidenciado por uma diminuição no parâmetro $2A_{||}$) na presença de sistemas transportadores (228). Da Rocha e colaboradores (2019) notaram um efeito adicional na dinâmica molecular do estrato córneo marcado com *spin* quando este foi tratado com CLN carregado com um extrato em comparação com o CLN sem o extrato, que foi associado à liberação dos fármacos (183).

Os resultados apresentados neste trabalho corroboram a interpretação de que os CLN são capazes de fundir com os constituintes superficiais da pele, aumentando a fluidez da membrana do estrato córneo e permitindo a liberação dos fármacos, possivelmente pela ruptura do empacotamento fosfolipídico e pela alteração da temperatura de transição de fase das bicamadas lipídicas. Ainda, as alterações na linha da forma dos espectros de RPE foram mínimas, isto é, a

liberação ocorreu sem perda da integridade relativa do CLN, como observado anteriormente por Mendanha et al. (2018) em seus estudos com lipossomas (227).

No presente trabalho, a dinâmica dos CLN pode ser resumida em ordem crescente de fluidez de acordo com os resultados mostrados na Figura 40 da seguinte maneira:

CLN > CLN CDM-RIF > EC-CLN > EC-CLN CDM-RIF

onde: CLN: são os CLN sem os fármacos, CLN CDM-RIF: são os CLN contendo os dois fármacos, EC-CLN: são os CLN sem os fármacos interagindo com o estrato córneo e EC-CLN CDM-RIF: são os CLN com os fármacos interagindo com o estrato córneo.

Assim, os dados de RPE sugerem que os CLN sem os fármacos interagem com os domínios lipídicos do estrato córneo e ocorre uma troca lipídica entre os dois sistemas. Quando os lipídios do estrato córneo migram para os CLN, eles se tornam mais rígidos. Com a presença dos fármacos nos CLN, esse efeito foi intensificado, sugerindo que os fármacos causam instabilidade no CLN ou aumentam suas afinidades pelos lipídios do estrato córneo.

*5.10.2 Ensaio *in vitro* de penetração cutânea em diferentes modelos de pele*

Os estudos de permeação e penetração *in vitro* em pele de suínos que passaram por diferentes tratamentos foram realizados durante um período de 24 h com a aplicação da solução contendo fosfato de clindamicina e rifampicina (controle) ou os CLN contendo os dois fármacos sobre a pele.

Os diferentes pré-tratamentos dados para a pele tiveram como objetivo estudar tanto o impacto da via folicular para a penetração dos fármacos na pele em sua forma livre ou encapsulado nos CLN (bloqueio ou não dos folículos pilosos com resina esmalte), quanto verificar a influência da condição sebácea, que é característica da hidradenite supurativa, no perfil de penetração dos fármacos a partir dos CLN e da solução controle. A Figura 41 mostra o aspecto físico da pele que foi tratada com uma mistura de sebo de carneiro e óleo (1:1 p/p) para simular a condição sebácea da pele afetada pela hidradenite supurativa.

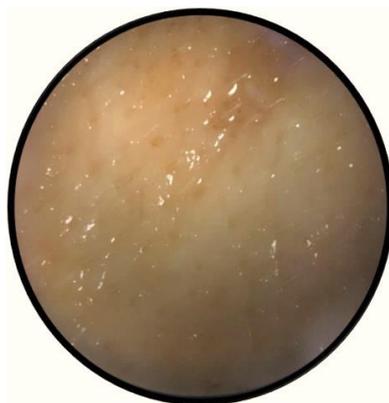


Figura 41. Fotografia obtida pelo estereomicroscópio após processo de preparo da pele sebácea.

Ao final de 24 h de experimento, em nenhum dos experimentos realizados os fármacos foram quantificados na solução receptora ou sequer detectados nela, indicando que tanto a nanoformulação quanto a solução controle mantiveram os fármacos apenas nas porções mais superiores da pele. Esse transporte dos fármacos restrito somente para as camadas da pele impede uma possível absorção sistêmica e assim a ocorrência dos efeitos adversos indesejáveis, o que é muito desejável em um tratamento tópico.

A Figura 42 e a Figura 43 mostram a recuperação do fosfato de clindamicina e rifampicina, respectivamente, a partir de camadas da pele ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$) após experimentos de permeação com diferentes modelos de pele para ambas as formulações testadas (solução contendo fosfato de clindamicina e rifampicina e CLN contendo fosfato de clindamicina e rifampicina).

Para o fosfato de clindamicina em solução, não houve diferença estatística entre as quantidades que penetraram no estrato córneo ($0,5 \pm 0,04$ e $0,9 \pm 0,4 \mu\text{g}/\text{cm}^2$) ou que atingiram a pele remanescente ($6,2 \pm 0,6$ e $6,7 \pm 0,2 \mu\text{g}/\text{cm}^2$) antes e após o bloqueio dos folículos pilosos ($p > 0,05$), respectivamente. Isso indica que a via folicular não é uma rota relevante para a permeação do fosfato de clindamicina em sua forma livre (Figuras 42a, 42b e 42c), ou seja, a presença ou não dessas estruturas não influenciam o perfil de penetração cutânea do fármaco.

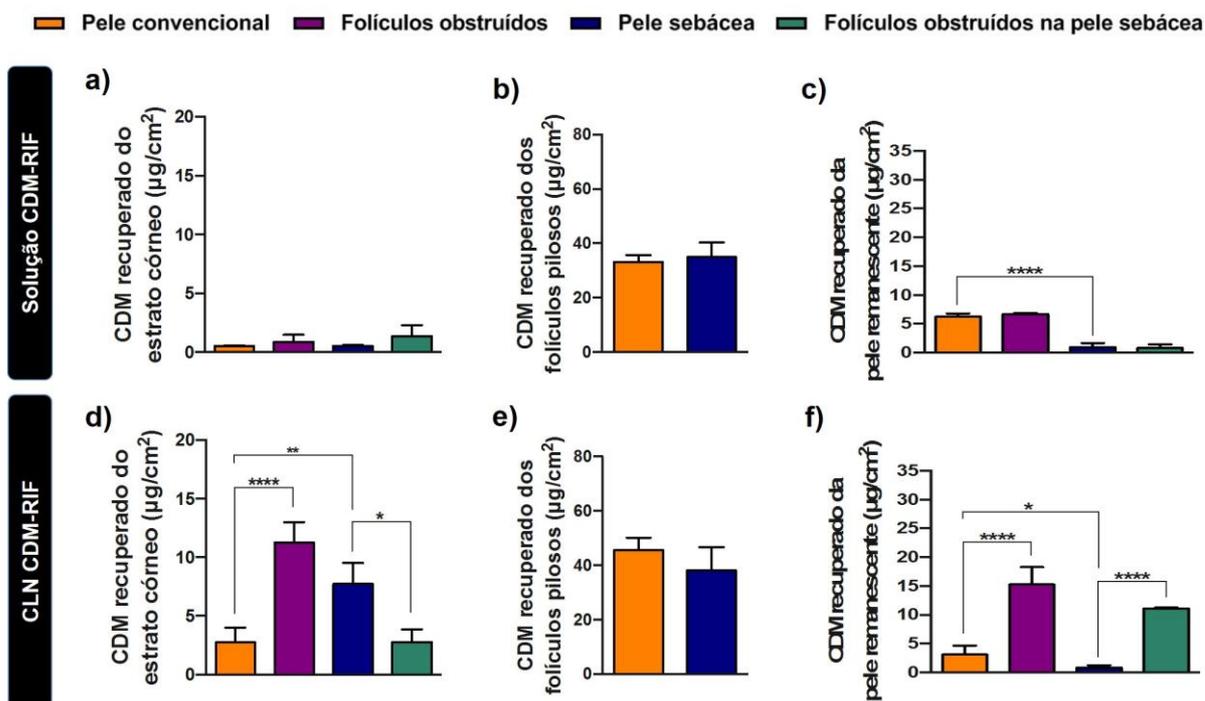


Figura 42. Quantidade de fosfato de clindamicina (CDM) recuperada das camadas da pele ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$) após 24 h de tratamento com os nanocarreadores lipídicos em comparação ao controle contendo os dois fármacos (solução CDM-RIF) seguindo os protocolos de permeação: pele convencional, folículos obstruídos, pele sebácea e folículos obstruídos na pele sebácea. Estrato córneo (a, d), folículo piloso (b, e) e pele remanescente (c, f). Os dados representam médias de 4 determinações \pm desvio-padrão. Análise estatística por Teste t *Student* para amostras independentes (*) $p \leq 0,05$; (**) $p \leq 0,01$; (***) $p \leq 0,001$ e (****) $p \leq 0,0001$.

Por outro lado, ocorreram diferenças estatísticas ($p \leq 0,05$) no perfil de penetração do fosfato de clindamicina quando o mesmo protocolo foi aplicado para a formulação contendo os fármacos encapsulados nos CLN. Assim, com o bloqueio dos folículos pilosos, as quantidades de fosfato de clindamicina recuperadas do estrato córneo (pele convencional: $2,80 \pm 1,30 \mu\text{g}/\text{cm}^2$; folículos obstruídos: $11,30 \pm 1,70 \mu\text{g}/\text{cm}^2$) e da pele remanescente (pele convencional: $3,12 \pm 1,50 \mu\text{g}/\text{cm}^2$; folículos obstruídos: $15,30 \pm 3,0 \mu\text{g}/\text{cm}^2$) aumentaram de maneira substancial (Figura 42d e 42f). Isto mostra que os folículos pilosos passam a ter papel importante na penetração do fosfato de clindamicina quando está encapsulado em CLN.

Comparando-se as quantidades de fosfato de clindamicina que penetraram a pele convencional a partir das duas formulações, observa-se que o fosfato de clindamicina, que possui baixa lipofilia (18) apresentou dificuldade em interagir com

o estrato córneo e folículos pilosos em sua forma não encapsulada. A encapsulação do fármaco nos CLN foi capaz de aumentar 5,4 vezes a penetração de fármaco no estrato córneo ($p \leq 0,05$), e isto pode ter ocorrido devido à oclusão que o sistema lipídico ocasiona à pele, aumentando a hidratação e consequentemente a permeabilidade da camada córnea (229,230) e também devido à interação que foi mostrada anteriormente entre lipídios que compõem os CLN e os lipídios da camada córnea. Além disso, observa-se um incremento significativo de 1,4 vezes a quantidade de fosfato de clindamicina retida nos folículos pilosos com a sua encapsulação nos CLN ($p \leq 0,05$).

Considerando que na hidradenite supurativa há excesso de secreção sebácea que pode representar uma barreira à penetração dos fármacos, as formulações foram aplicadas em uma pele sebácea. Nessa condição de simulação da secreção de sebo, os CLN com os fármacos desempenharam um papel notório na promoção da penetração do fosfato de clindamicina pela via folicular. Nesse caso, os folículos pilosos serviram como depósito do fármaco, pois, ao analisar a pele sebácea, houve uma diferença nas quantidades de fosfato de clindamicina recuperadas do estrato córneo ($6,60 \pm 2,80$ e $2,80 \pm 1,10 \mu\text{g}/\text{cm}^2$) ou na pele remanescente ($0,84 \pm 0,40$ e $11,12 \pm 0,20 \mu\text{g}/\text{cm}^2$) após o modelo de pele sebácea ter os folículos pilosos obstruídos com esmalte (Figura 42d e 42f).

A quantidade de fosfato de clindamicina retida nos folículos pilosos da pele sebácea permaneceu sem diferença estatística significativa quando comparada ao modelo de pele convencional ($45,6 \pm 4,60 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ para pele convencional e $38,1 \pm 8,50 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ para pele sebácea, dados dos folículos pilosos) ($p > 0,05$, Figura 42e), muito provavelmente devido à natureza lipídica dos CLN que promove uma melhor interação com os lipídios da mistura sebácea.

Em geral, pode-se notar que o principal impacto do uso dos CLN em comparação ao fármaco livre foi o acúmulo significativo desse fármaco hidrofílico no estrato córneo, formando um depósito, que foi aprimorado quando a pele estava em uma condição sebácea.

Semelhante ao que ocorre para o fosfato de clindamicina, para a rifampicina em solução, os folículos pilosos demonstram não desempenhar um papel importante como via de penetração (Figura 43a e 43c), sem diferenças significativas nas quantidades de fármaco encontradas no estrato córneo ou na pele remanescente

quando comparado ao modelo de pele convencional com obstrução dos folículos pilosos ($p > 0,05$).

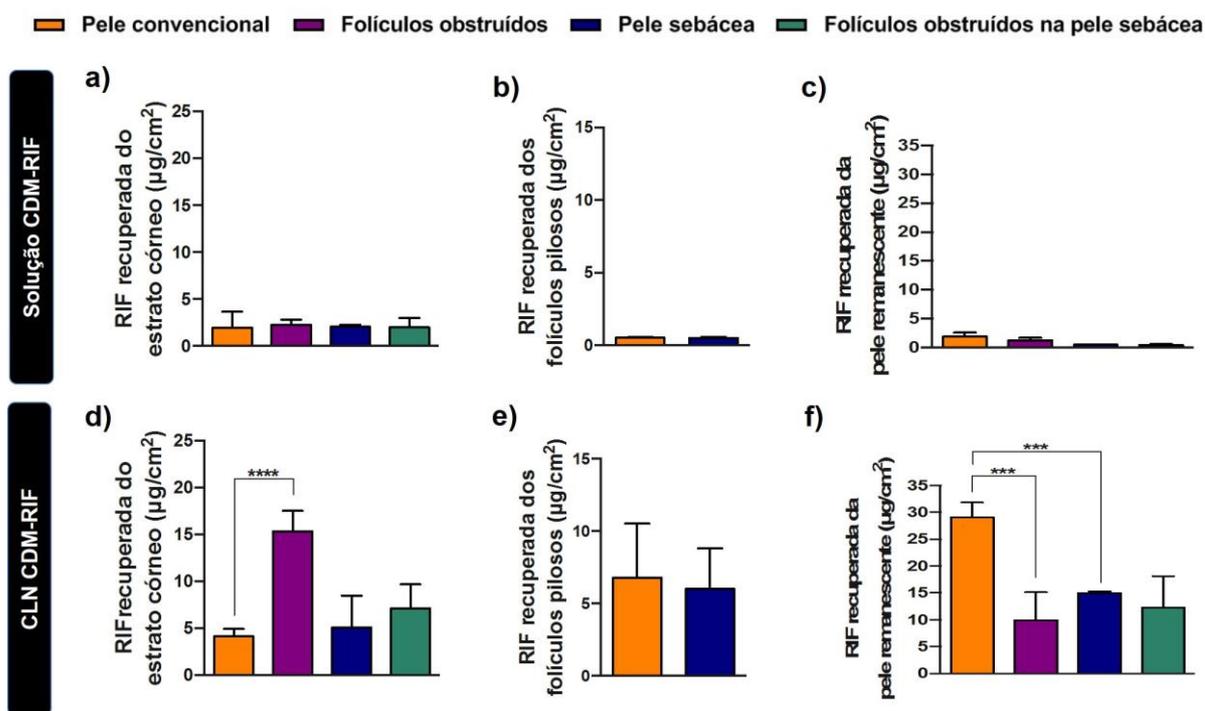


Figura 43. Quantidade de rifampicina (RIF) recuperada das camadas da pele ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$) após 24 h de tratamento com os nanocarreadores lipídicos em comparação ao controle contendo os dois fármacos (solução CDM-RIF) seguindo os protocolos de permeação: pele convencional, folículos obstruídos, pele sebácea e folículos obstruídos na pele sebácea. Estrato córneo (a, d), folículo piloso (b, e) e pele remanescente (c, f). Os dados representam médias de 4 determinações \pm desvio-padrão. Análise estatística por Teste t *Student* para amostras independentes (*) $p \leq 0,05$; (**) $p \leq 0,01$; (***) $p \leq 0,001$ e (****) $p \leq 0,0001$.

Quando o sistema coloidal foi aplicado aos dois modelos de pele, os folículos pilosos passaram a desempenhar um papel significativo para a permeação da rifampicina. Isso porque foram observadas diferenças estatísticas nas quantidades de rifampicina recuperadas do estrato córneo ($4,10 \pm 0,80$ e $15,32 \pm 2,80 \mu\text{g}/\text{cm}^2$, $p \leq 0,0001$) e da pele remanescente ($29,08 \pm 2,80$ e $9,90 \pm 5,20 \mu\text{g}/\text{cm}^2$, $p \leq 0,001$), respectivamente, com o bloqueio das estruturas foliculares (Figura 43d e 43f).

A condição sebácea não afetou o perfil de penetração da pele da rifampicina quando o fármaco estava em sua forma não encapsulada (solução controle, Figuras 43a, 43b e 43c), nem alterou seu acúmulo no estrato córneo e nos folículos pilosos quando a rifampicina estava encapsulada nos CLN ($p > 0,05$) (Figura 43d e 43e). De

fato, observou-se que a mesma quantidade de fármaco foi encontrada nos folículos pilosos para pele convencional ($6,80 \pm 3,80 \mu\text{g}/\text{cm}^2$) e pele sebácea ($6,00 \pm 2,80 \mu\text{g}/\text{cm}^2$), demonstrando que os CLN permanecem no local desejado, mesmo quando a condição patológica foi simulada. Além disso, quando a pele apresenta características mais sebáceas, os folículos pilosos passam a não interferir na penetração do fármaco em outras camadas da pele, uma vez que o bloqueio dos folículos pilosos nesse caso não alterou o perfil de penetração da rifampicina (Figuras 43d e 43f).

Isso pode estar relacionado ao fato da rifampicina possuir características lipofílicas [$\log P_{\text{RIF}}$: 3,17 (17)] e interagir bem com o sebo. Assim, a rifampicina deve penetrar a pele pelo folículo piloso ou pelo estrato córneo e depois se difundir para a pele remanescente e, por causa disso, não foram encontradas diferenças quanto ao papel do folículo piloso para a penetração do fármaco nessa condição.

Os fármacos com maior $\log P$ podem apresentar uma maior interação e permeação na pele através do estrato córneo, atingindo a epiderme e a derme viáveis, como no caso observado para rifampicina (231). Por outro lado, os CLN controlaram a permeação da rifampicina mais expressivamente que o fosfato de clindamicina, pois a rifampicina provavelmente apresenta uma forte interação com os componentes lipídicos dos CLN tornando a liberação mais lenta. Dessa forma, o fármaco lipofílico é retido na matriz dos CLN e se difunde lentamente desse sistema (232).

Quando se analisou a razão entre a quantidade dos fármacos acumulados nos folículos pilosos pela quantidade total de fármacos que penetrou em todas as camadas da pele (233) (Tabela 17), verificou-se que houve um direcionamento folicular dos fármacos com a aplicação dos CLN contendo os dois fármacos. Para o fosfato de clindamicina, o valor é 0,89 na pele convencional e 0,84 na pele sebácea, demonstrando que, mesmo em uma condição sebácea, esse fármaco era direcionado aos folículos pilosos. Da mesma forma, a rifampicina mostrou valores de razão de direcionamento de 0,17 e 0,23 para pele convencional e pele sebácea, respectivamente, mostrando que a quantidade de direcionamento permanece nas duas condições, mas mostrou um direcionamento menor que o fosfato de clindamicina devido às diferentes características dos fármacos (Tabela 17).

Tabela 17. Valores do fator de direcionamento folicular para o fosfato de clindamicina (CDM) e rifampicina (RIF) da solução contendo CDM e RIF (Solução CDM-RIF) e nanocarreadores lipídicos contendo os dois fármacos (CLN CDM-RIF) nos modelos de pele convencional e pele sebácea.

	Modelo de pele	Solução CDM-RIF	CLN CDM-RIF
Fator de direcionamento folicular	CDM	Pele convencional	0,83
		Pele sebácea	0,97
	RIF	Pele convencional	0,12
		Pele sebácea	0,17

A análise da penetração cutânea da rifampicina mostra um efeito mais pronunciado no acúmulo de CLN nos folículos pilosos em relação ao controle, uma vez que foi alcançado um aumento significativo de aproximadamente 12 vezes do fármaco recuperado dessas estruturas com a aplicação das nanoestruturas, independentemente se a pele estava ou não com o conteúdo sebáceo alterado ($p < 0,05$). Esse aumento da penetração nos folículos pilosos deve explicar o consequente aumento do fármaco na pele remanescente, o que deve ocorrer por difusão.

O estudo de Lademann e colaboradores (2009) demonstra que o tamanho ideal de partícula para uma penetração folicular eficiente está entre 300 e 600 nm, como o CLN apresentado neste estudo (234). De maneira geral, devido às características lipídicas do CLN, esses nanocarreadores apresentam alta afinidade pelo sebo nos folículos pilosos e nas glândulas sebáceas, encontrando outro local de armazenamento. Sendo assim, os CLN mostraram-se capazes de atuar tanto no controle inicial quanto na fase de manutenção do tratamento da hidradenite supurativa.

Cabe ressaltar aqui que os folículos pilosos são ambientes propícios para ampla colonização de *S. aureus*, que é um dos micro-organismos mais prevalentes em lesões cutâneas na hidradenite supurativa (96,168). Considerando que, em geral, a concentração inibitória mínima do fosfato de clidamicina e da rifampicina para o *S. aureus* está na faixa de 0,06-0,25 $\mu\text{g/mL}$ e 0,004-0,015 $\mu\text{g/mL}$ (235), respectivamente, observa-se que as concentrações de fármacos que penetraram as estruturas foliculares com a aplicação dos CLN contendo os dois fármacos em uma condição de pele com aumento de sebo (respectivamente $\sim 9,92 \mu\text{g/mL}$

correspondente a $8,1 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ e $\sim 1,75 \mu\text{g}/\text{mL}$ correspondete a $6 \mu\text{g}/\text{cm}^2$) são, na teoria, mais que suficientes para inibir o crescimento do micro-organismo e assim combater efetivamente a infecção existente.

O esquema apresentado na Figura 44 ilustra os efeitos da formulação desenvolvida neste trabalho na promoção do tratamento tópico da hidradenite supurativa.

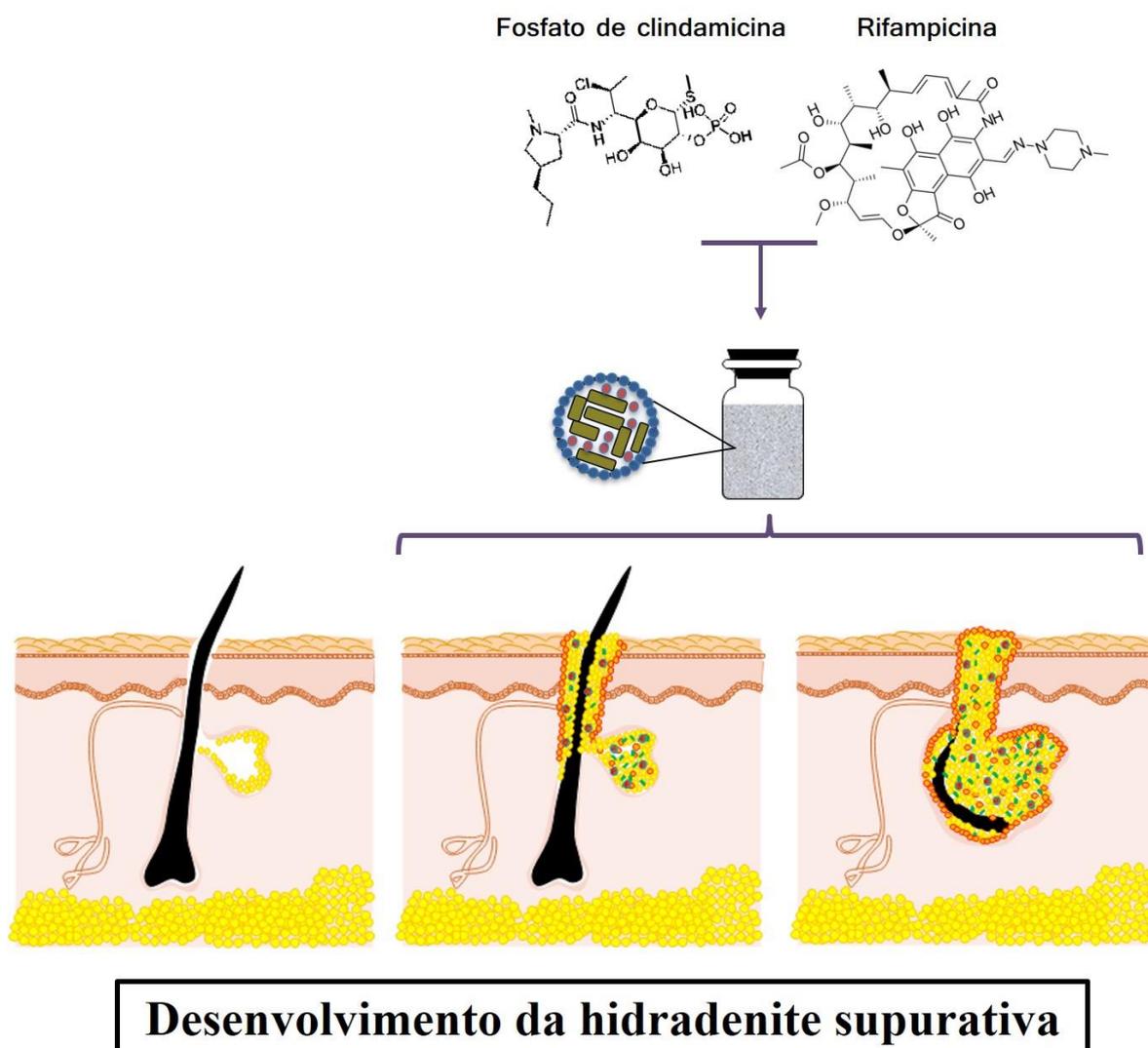


Figura 44. Representação ilustrativa do tratamento tópico com os nanocarreadores lipídicos contendo fosfato de clindamicina e rifampicina na hidradenite supurativa.

5.11 Ensaios *in vitro* do potencial irritativo dos nanocarreadores lipídicos

5.11.1 HET-CAM

O HET-CAM é uma alternativa ao teste em animais (teste de *Draize*) (186) para avaliação de irritabilidade de formulações que se baseia na aplicação direta de amostras na membrana córneo-alantoide de ovos fecundados e avaliação das principais reações resultantes dessa aplicação durante o tempo do estudo. Inicialmente, o HET-CAM era empregado para avaliar o potencial de irritabilidade ocular de formulações (236,237). Entretanto, esse ensaio é bastante eficiente para avaliar a irritabilidade de substâncias no geral e, conseqüentemente, existe a possibilidade de utilizá-lo para avaliar a irritação cutânea (238).

Os resultados da caracterização do potencial irritativo dos nanocarreadores lipídicos desenvolvidos estão apresentados na Figura 45.

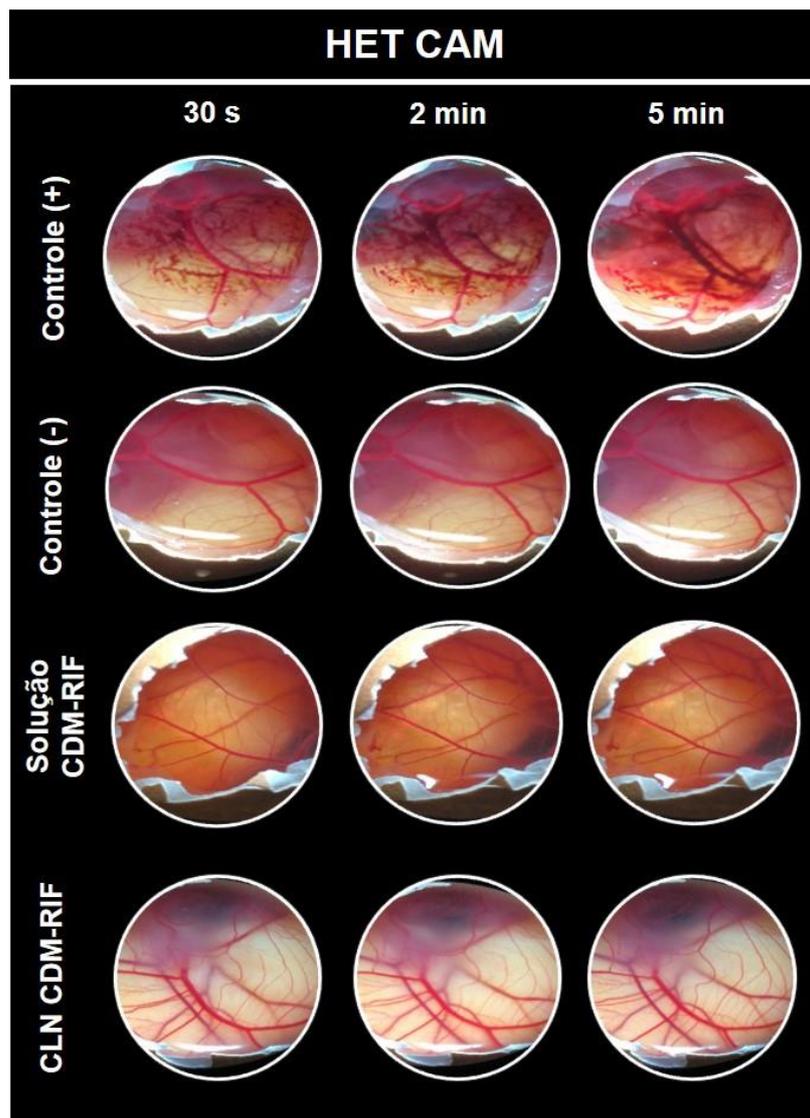


Figura 45. Sequência ilustrativa das imagens do ensaio de HET-CAM demonstrando o efeito do controle positivo (NaOH 1 mol/L), controle negativo (NaCl 0,9%), solução contendo fosfato de clindamicina (CDM) e rifampicina (RIF) e CLN contendo os dois fármacos (CLN CDM-RIF) na membrana cório-alantoide após 30 s, 2 min e 5 min.

As imagens foram capturadas durante 30 s, 2 min e 5 min após a exposição da membrana cório-alantoide pelas amostras testadas. O controle positivo proporcionou a ocorrência de diversas alterações vasculares na membrana logo nos primeiros segundos, com aumento da vascularização e calibre dos vasos, além de uma alteração da coloração associada ao rompimento dos vasos e extravasamento de sangue. Em contraposição, o controle negativo (solução fisiológica) não apresentou a ocorrência de nenhum desses fenômenos nos primeiros segundos de exposição.

As amostras, solução de fosfato de clindamicina e rifampicina livres e CLN

contendo esses dois fármacos, tiveram efeito semelhante ao desempenhado pelo controle negativo.

A Tabela 18 apresenta os resultados da classificação final das amostras correspondentes aos índices de irritabilidade calculados. Os resultados foram expressos com a média \pm desvio padrão dos valores obtidos nos três ovos analisados para cada formulação.

Tabela 18. Classificação da irritabilidade das formulações testadas, de acordo com a escala acumulativa. CDM = fosfato de clindamicina, RIF = rifampicina e CLN = carreadores lipídicos nanoestruturados.

Amostras	Índice de irritabilidade	Classificação
Controle positivo	11,90 \pm 0,01	Irritante Severo (IS)
Controle negativo	0,07 \pm 0,02	Não Irritante (NI)
Solução CDM e RIF	0,84 \pm 0,01	Não Irritante (NI)
CLN CDM-RIF	0,89 \pm 0,03	Não Irritante (NI)

Após 5 min de observação da membrana cório-alantoide, o índice de irritabilidade foi de 0,07 \pm 0,02 para o controle negativo e 11,90 \pm 0,01 para o controle positivo. O escore final da solução contendo fosfato de clindamicina e rifampicina foi de 0,84 \pm 0,01 e para o sistema coloidal contendo os dois fármacos foi de 0,89 \pm 0,03.

Desta forma, o controle positivo foi classificado como “Irritante Severo (IS)” e o controle negativo como “Não Irritante (NI)” e esses resultados servem de base para uma correta interpretação das imagens dos nanocarreadores lipídicos desenvolvidos. Da mesma forma que o controle negativo, a solução contendo os dois fármacos e os nanocarreadores lipídicos encapsulados com os dois fármacos foram classificados como “Não Irritante (NI)”.

Os resultados obtidos nesse teste foram descritos na literatura para outros nanocarreadores lipídicos. Eiras et al., (2017) (239) avaliaram o potencial irritativo de CLN contendo vitamina E veiculados em hidrogel demonstrando uma característica de não ser irritativo. Essa mesma classificação foi observada com CLN contendo óleo de *Vetiveria zizanoides* incorporados em gel (240) e CLN contendo miconazol no mesmo veículo (241).

5.11.2 Protocolo de irritação em epiderme humana reconstruída

A irritação cutânea acontece como um dano reversível produzido após a exposição da pele a alguma substância irritante, podendo ocorrer manifestações clínicas como eritema e edema. As células danificadas produzem mediadores inflamatórios ou induzem uma cascata inflamatória que também age em células da derme. O teste em epiderme humana reconstruída (EpiSkin™) se baseia em um modelo tridimensional *in vitro* imitando as propriedades bioquímicas e fisiológicas das partes superiores da primeira camada mais externa da pele humana. O tecido apresenta uma organização em camadas que seguem a camada basal, espinhosa, granular e o estrato córneo (190). O método é considerado cientificamente válido como um método independente para identificar substâncias irritantes da pele que foi implementado pela OCDE na diretriz de teste nº 439 (190). Os métodos de teste de irritação da pele internacionalmente aceitos são baseados no fato de que as substâncias podem ter efeitos citotóxicos após aplicação tópica a curto prazo de exposição da epiderme. Esse teste avalia o potencial irritativo através da mensuração da viabilidade celular.

A Figura 46 apresenta a porcentagem de células da epiderme viáveis ao final do tratamento com as formulações. A classificação das formulações em irritante ou não-irritante é baseada em uma viabilidade superior a 50% para a amostra não irritante e menor ou igual a 50% para a amostra potencialmente irritante.

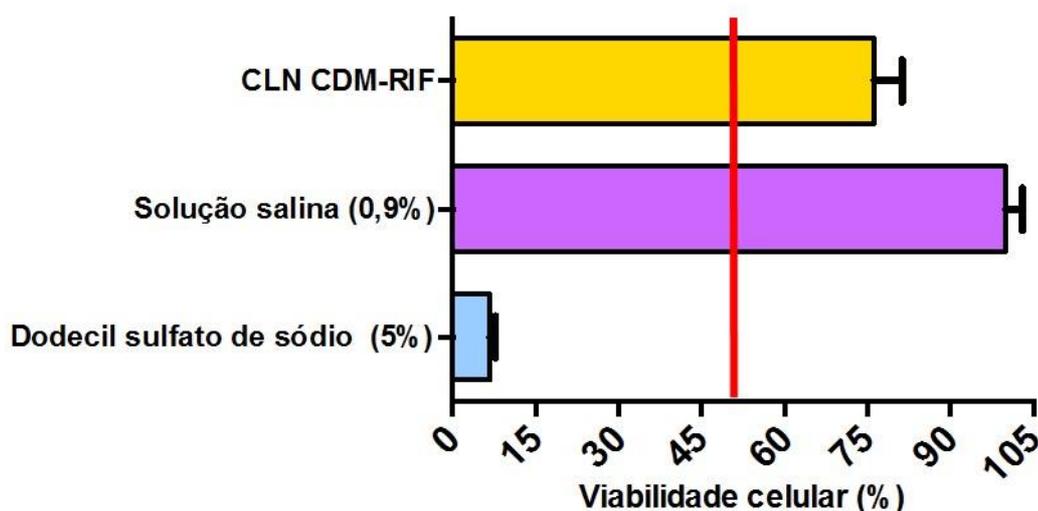


Figura 46. Viabilidade celular em porcentagem (%) a partir de testes de potencial irritativo em epiderme humana reconstruída (Episkin™) após tratamento com solução salina 0,9% (controle negativo), dodecil sulfato de sódio 5% (controle positivo) e CLN contendo fosfato de clindamicina e rifampicina (CLN CDM-RIF). Os dados representam médias de 3 determinações \pm desvio-padrão.

Observa-se que o controle positivo utilizado neste experimento (dodecil sulfato de sódio a 5%) apresentou resultado de $6,75 \pm 1\%$ de viabilidade celular ao final do estudo, ao passo que o controle negativo (solução salina a 0,9% p/v) resultou em $100 \pm 5\%$ de viabilidade celular.

Os CLN contendo os dois fármacos após a aplicação no sistema do teste demonstrou um potencial de irritação semelhante ao do controle negativo com uma viabilidade de $76,27 \pm 3\%$, o que classificou a amostra como sendo não-irritante para a pele humana.

Dessa forma, considerando que tanto o HET-CAM quanto o ensaio em epiderme humana reconstruída indicaram que a formulação dos CLN de fosfato de clindamicina e rifampicina é não irritante, conclui-se que sua aplicação tópica deve ser segura para o tratamento da hidradenite supurativa.

6. CONCLUSÕES

O método de CLAE descrito forneceu uma quantificação simples e simultânea de fosfato de clindamicina e rifampicina, que pode ser útil para a determinação e quantificação desses fármacos nas camadas da pele e, portanto, ser útil no desenvolvimento de novas abordagens terapêuticas para o tratamento de doenças foliculares. O método analítico demonstrou seletividade frente aos interferentes cutâneos e alto índice de recuperação simultânea dos fármacos das camadas da pele, além de menores limites de detecção e quantificação, permitindo sua utilização em ensaios cinéticos de permeação.

Os estudos de compatibilidade entre fosfato de clindamicina e rifampicina demonstraram a viabilidade de utilização desses fármacos concomitantemente em preparações farmacêuticas.

Os CLN contendo fosfato de clindamicina e rifampicina desenvolvidos apresentaram características adequadas para uma administração tópica. A técnica da diluição da microemulsão foi eficaz para preparo dos nanocarreadores lipídicos, que apresentaram diâmetro médio de 400 nm, índice de polidispersividade de 0,3 e potencial zeta negativo (-43,4 mV).

Os dois fármacos foram encapsulados nos CLN com sucesso, tendo-se conseguido eficiência de encapsulação em torno de 80% para o fosfato de clindamicina, e acima de 90% para rifampicina.

A formulação de nanocarreadores contendo os fármacos foram estáveis físico-quimicamente durante 60 dias quando armazenados sob refrigeração.

A adição de fármacos no CLN não alterou a fluidez dos nanotransportadores e os dados de espectroscopia de RPE com marcador de *spin* mostraram que os CLN interagem com os domínios lipídicos do estrato córneo, sugerindo que os fármacos causam instabilidade nos CLN ou aumentam suas afinidades pelos lipídios do estrato córneo.

Os CLN mostraram um controle de liberação dos fármacos em relação aos fármacos livres, e mais importante, os fármacos parecem se acumular nos folículos pilosos, aumentando significativamente a captação de rifampicina nessas estruturas e criando um depósito de fosfato de clindamicina ainda maior na superfície da pele, mesmo quando a pele está em uma condição sebácea, imitando o que ocorre durante a fisiopatologia da hidradenite supurativa.

Os nanocarreadores lipídicos não mostraram potencial para irritação da pele, provando ser uma alternativa segura para aplicação tópica contínua.

Assim, os CLN desenvolvidos contendo fosfato de clindamicina e rifampicina parecem ser uma alternativa efetiva e segura por viabilizar o tratamento tópico da hidradenite supurativa.

7. REFERÊNCIAS

1. Karagiannidis I, Nikolakis G, Sabat R, Zouboulis CC. Hidradenitis suppurativa/Acne inversa: an endocrine skin disorder? *Rev Endocr Metab Disord.* 2016;17(3):335–41.
2. Hessam S, Sand M, Meier NM, Gambichler T, Scholl L, Bechara FG. Combination of oral zinc gluconate and topical triclosan: An anti-inflammatory treatment modality for initial hidradenitis suppurativa. *J Dermatol Sci.* 2016;84:197–202.
3. Wollina U, Koch A, Heinig B, Kittner T, Nowak A. Acne inversa (Hidradenitis suppurativa): A review with a focus on pathogenesis and treatment. *Indian Dermatol Online J.* 2013;4(1):2–12.
4. Vasanth V, Chandrashekar B. Follicular occlusion tetrad. *Indian Dermatol Online J.* 2014;5(4):491.
5. Hood C, Shanmugam VK. Hidradenitis Suppurativa—Diagnosis and Management. *J Nurse Pract.* 2019;15(10):713–6.
6. Sabat R, Jemec GBE, Matusiak Ł, Kimball AB, Prens E, Wolk K. Hidradenitis suppurativa. *Nat Rev Dis Prim.* 2020;6(1).
7. MINISTÉRIO DA SAÚDE. PORTARIA CONJUNTA Nº 14, DE 11 DE SETEMBRO DE 2019. [Internet]. 2019. p. 200–200. Available from: <https://brasilsus.com.br/wp-content/uploads/2019/09/portconj14.pdf>
8. Zee HH Van Der, Prens EP, Jemec BE. The Effect of Combined Treatment with Oral Clindamycin and Oral Rifampicin in Patients with Hidradenitis Suppurativa. *Dermatology.* 2009;219:143–147.
9. Ather S, Chan DSY, Leaper DJ, Harding KG. Surgical treatment of hidradenitis suppurativa: case series and review of the literature. *Int Wound J.* 2006;3:159–69.
10. Gener G, Canoui-Poitrine F, Revuz JE, Faye O, Poli F, Gabison G, et al. Combination Therapy with Clindamycin and Rifampicin for Hidradenitis Suppurativa: A Series of 116 Consecutive Patients. *Dermatology.* 2009;2:148–54.

11. Ring HC, Emtestam L. The Microbiology of Hidradenitis Suppurativa. *Dermatol Clin.* 2016;34(1):29–35.
12. Ochi H, Tan L, HH HO. The effect of oral clindamycin and rifampicin combination therapy in patients with hidradenitis suppurativa in singapore. *Clin Cosmet Investig Dermatol.* 2018;11:37–9.
13. Bettoli V, Join-lambert O, Nassif A. Antibiotic Treatment of Hidradenitis Suppurativa. *Dermatol Clin.* 2016;34(1):81–9.
14. Mendonça CO, Griffiths CEM. Clindamycin and rifampicin combination therapy for hidradenitis suppurativa. *Br J Dermatol.* 2006;154:977–8.
15. Jafari SMS, Hunger RE, Schlapbach C. Hidradenitis Suppurativa: Current Understanding of Pathogenic Mechanisms and Suggestion for Treatment Algorithm. *Front Med.* 2020;7:18–20.
16. Vural S, Gündoğdu M, Akay BN, Boyvat A, Erdem C, Koçyiğit P, et al. Hidradenitis suppurativa: Clinical characteristics and determinants of treatment efficacy. *Dermatol Ther.* 2019;32(5):1–5.
17. USP. Rifampin – official monographs USP 40. United States Pharmacop. 2018;
18. USP. Clindamycin Phosphate – official monographs USP 40. United States Pharmacop. 2018;
19. Andrade LM, Silva LAD, Krawczyk-Santos AP, Amorim IC de SM, Rocha PBR da, Lima EM, et al. Improved tacrolimus skin permeation by co-encapsulation with clobetasol in lipid nanoparticles: Study of drug effects in lipid matrix by electron paramagnetic resonance. *Eur J Pharm Biopharm.* 2017;119:142–9.
20. Angelo T, El-Sayed N, Jurisic M, Koenneke A, Gelfuso GM, Cunha-Filho M, et al. Effect of physical stimuli on hair follicle deposition of clobetasol-loaded Lipid Nanocarriers. *Sci Rep.* 2020;10(1).
21. Santos GA, Angelo T, Andrade LM, Silva SMM, Magalhães PO, Cunha-Filho M, et al. The role of formulation and follicular pathway in voriconazole cutaneous delivery from liposomes and nanostructured lipid carriers. *Colloids Surfaces B Biointerfaces.* 2018;170:341–6.
22. Pires FQ, da Silva JKR, Sa-Barreto LL, Gratieri T, Gelfuso GM, Cunha-Filho M.

- Lipid nanoparticles as carriers of cyclodextrin inclusion complexes: A promising approach for cutaneous delivery of a volatile essential oil. *Colloids Surfaces B Biointerfaces*. 2019;182:110382.
23. Lin YK, Al-Suwayeh SA, Leu YL, Shen FM, Fang JY. Squalene-containing nanostructured lipid carriers promote percutaneous absorption and hair follicle targeting of diphenacyprone for treating alopecia areata. *Pharm Res*. 2013;30(2):435–46.
 24. Hussain SH, Limthongkul B, Humphreys TR. The Biomechanical Properties of the Skin. *Dermatol Surg*. 2013;39:193–203.
 25. Maharlooei MK, Mohammadi AA, Farsi A, Ahrari I, Attar A, Monabati A. A comparison between different existing methods used to separate epidermal cells from skin biopsies for autologous transplantation. *Indian J Dermatol*. 2011;56(6):666–9.
 26. Little AC, Jones BC, Debruine LM. Facial attractiveness: evolutionary based research. *Phil Trans R Soc B*. 2011;366:1638–59.
 27. Brodell LA, Ba Ñ, Rosenthal KS. Skin Structure and Function The Body's Primary Defense Against Infection. *Infect Dis Clin Pract*. 2008;16(2):113–7.
 28. Menon GK. New insights into skin structure: scratching the surface. *Adv Drug Deliv Rev*. 2002;1:3–17.
 29. Tang W, Bhushan B. Adhesion, friction and wear characterization of skin and skin cream using atomic force microscope. *Colloids Surfaces B Biointerfaces*. 2009;76:1–10.
 30. Gratieri T, Martins G, Fonseca R, Lopez V. Princípios básicos e aplicação da iontoforese na penetração cutânea de fármacos. *Quim Nova*. 2008;31(6):1490–8.
 31. Elias P, Choi E. Interactions among stratum corneum defensive functions. *Exp Dermatol*. 2005;14:719–26.
 32. Bouwstra JA, Ponc M. The skin barrier in healthy and diseased state. *Biochim Biophys Acta*. 2006;1758:2080–95.
 33. Khavkin J, Ellis DAF. Aging Skin: Histology, Physiology, and Pathology. *Facial*

- Plast Surg Clin NA. 2011;19(2):229–34.
34. Wickett RR, Visscher MO. Structure and function of the epidermal barrier. *Am J Infect Control*. 2006;34(10):98–110.
 35. Baroni A, Buommino E, Gregorio V De, Ruocco E, Ruocco V, Wolf R. Structure and function of the epidermis related to barrier properties. *Clin Dermatol*. 2012;30(3):257–62.
 36. Blanpain C, Fuchs E. Epidermal Stem Cells of the Skin. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 2008;22:339–73.
 37. Souto LRM, Rehder J, Vassallo J, Cintra ML, Kraemer MHS, Puzzi MB. Model for human skin reconstructed in vitro composed of associated dermis and epidermis. *Sao Paulo Med J*. 2006;124(2):71–6.
 38. Lai-cheong JE, McGrath JA. Structure and function of skin, hair and nails Key points. *Medicine (Baltimore)*. 2017;45(6):347–51.
 39. Kolarsick PAJ, Kolarsick MA, Goodwin C. Anatomy and Physiology of the Skin. *J Dermatol Nurses Assoc*. 2006;3(4):2011.
 40. Losquadro WD. Anatomy of the Skin and the Pathogenesis of Nonmelanoma Skin Cancer. *Facial Plast Surg Clin N Am*. 2017;25(3):283-289.
 41. Rivera-gonzalez G, Shook B, Horsley V. Adipocytes in Skin Health and Disease. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2014;4:a015271.
 42. Alexander A, Dwivedi S, Giri TK, Saraf S, Saraf S, Krishna D. Approaches for breaking the barriers of drug permeation through transdermal drug delivery. *J Control Release*. 2012;164(1):26–40.
 43. Hansen S, Lehr C-M, Schaefer UF. Improved input parameters for diffusion models of skin absorption. *Adv Drug Deliv Rev*. 2013;65:251–64.
 44. Ng KW, Lau WM. Development and characterization of polymeric nanoparticle-based formulation of adapalene. *Percutaneous Penetration Enhanc*. 2015;3–11.
 45. Luís A, Ruela M, Perissinato AG, Esselin M, Lino DS. Evaluation of skin absorption of drugs from topical and transdermal formulations. *Brazilian J Pharm Sci*. 2016;52(3):527–44.

46. Petrilli R, Lopez RFV. Physical methods for topical skin drug delivery: Concepts and applications. *Brazilian J Pharm Sci.* 2018;54(Special Issue):1–19.
47. Vogt A, Mandt N, Lademann J, Schaefer H, Blume-peytavi U. Follicular Targeting – A Promising Tool in Selective Dermatotherapy. *J Investig Dermatology Symp Proc.* 2005;10(3):252–5.
48. Liu X, Grice JE, Lademann J, Otberg N, Trauer S, Patzelt A, et al. Hair follicles contribute significantly to penetration through human skin only at times soon after application as a solvent deposited solid in man. *Br J Clin Pharmacol.* 2011;72(5):768–74.
49. Ramezanli T, Zhang Z, Michniak-Kohn BB. Development and characterization of polymeric nanoparticle-based formulation of adapalene for topical acne therapy. *Nanomedicine Nanotechnology, Biol Med.* 2017;13(1):143–52.
50. Lauterbach A, Mueller-goymann CC. Development, formulation, and characterization of an adapalene-loaded solid lipid microparticle dispersion for follicular penetration. *Int J Pharm.* 2014;466(1–2):122–32.
51. Uprit S, Kumar R, Roy A, Pare A. Preparation and characterization of minoxidil loaded nanostructured lipid carrier gel for effective treatment of alopecia. *Saudi Pharm J.* 2013;21(4):379–85.
52. Roque L V, Dias S, Cruz N, Roberto A. Design of Finasteride-Loaded Nanoparticles for Potential Treatment of Alopecia. *Ski Pharmacol Physiol.* 2017;30:197–204.
53. Yanga C-C, Cotsarelisa G. Review of hair follicle dermal cells. *J Dermatol Sci.* 2010;57(1):1–19.
54. Toyoshima K, Asakawa K, Ishibashi N, Toki H, Ogawa M, Hasegawa T, et al. Fully functional hair follicle regeneration through the rearrangement of stem cells and their niches. *Nat Commun.* 2012;3:784.
55. Martel J, Badri T. Anatomy, Head, Hair, Follicle. *StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2018. p. 470321.*
56. Stenn KS, Paus R. Controls of Hair Follicle Cycling. *Physiol Rev.* 2018;81(1):449–94.

57. Kumar S, Wahid A, Kv A. Physiology and Anatomy of Hair in Drug Abusing Cases. *Int J Med Toxicol Forensic Med.* 2012;2(4):153–9.
58. Welle MM, Wiener DJ. The Hair Follicle: A Comparative Review of Canine Hair Follicle Anatomy and Physiology. *Toxicol Pathol.* 2016;44(4):564–74.
59. Schneider MR, Schmidt-ullrich R. The Hair Follicle as a Dynamic Miniorgan. *Curr Biol.* 2009;19(3):R132–42.
60. Pereira MN, Ushirobira CY, Cunha Filho MSS, Gelfuso GM, Gratieri T. Nanotechnology advances for hair loss. *Ther Deliv.* 2018;9:593–603.
61. Wolfram LJ. Human hair: A unique physicochemical composite. *J Am Acad Dermatol.* 2003;48(6):106–14.
62. Boer M, Duchnik E, Maleszka R, Marchlewicz M. Structural and biophysical characteristics of human skin in maintaining proper epidermal barrier function. *Postep Dermatol Alergol.* 2016;33(1):1–5.
63. Schommer NN, Gallo RL. Structure and function of the human skin microbiome. *Trends Microbiol.* 2013;21(12):660–8.
64. Sardana K. Follicular disorders of the face. *Clin Dermatol.* 2014;32(6):839–72.
65. Fabris MR, Melo CP, Melo DF. Folliculitis decalvans: the use of dermatoscopy as an. *An Bras Dermatol.* 2013;88(5):814–6.
66. Demos M, Mcleod MP, Nouri K. Recurrent furunculosis: a review of the literature. *Br Assoc Dermatologists.* 167:725–32.
67. Napolitano M, Megna M, Timoshchuk EA, Balato N, Fabbrocini G, Monfrecola G. Hidradenitis suppurativa: from pathogenesis to diagnosis and treatment. *Clin Cosmet Investig Dermatol.* 2017;10:105–15.
68. Margesson LJ, Danby FW. Hidradenitis suppurativa. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol.* 2014;28(7):1013–27.
69. Revuz J. Hidradenitis suppurativa. *JEADV.* 2009;23:985–98.
70. Zouboulis CC, Marmola V del, Mrowietza U, Prensa EP, Tzellosa T, Jemec GBE. Hidradenitis Suppurativa/Acne Inversa: Criteria for Diagnosis, Severity Assessment, Classification and Disease Evaluation. *Dermatology.* 2015;231(2):184–90.

71. Kazemi A, Carnaggio K, Clark M, Shephard C, Okoye GA. Optimal Wound Care Management in Hidradenitis Suppurativa. *J Dermatolog Treat.* 2017;29(2):165–7.
72. Deckers IE, Zee HH Van Der, Errol P. Epidemiology of Hidradenitis Suppurativa: Prevalence, Pathogenesis, and Factors Associated with the Development of HS. *Curr Dermatol Rep.* 2014;3:54–60.
73. Dauden E, Lazaro P, Aguilar M, Blasco A, Suarez C, Marin I, et al. Recommendations for the management of comorbidity in hidradenitis suppurativa. *J Eur Acad Dermatol Venereol.* 2017;32(1):129–44.
74. Revuz J. Hidradenitis suppurativa. *Presse Med.* 2010;39(12):1254–64.
75. Kurzen H, Kurokawa I, Jemec GBE, Emtestam L, Sellheyer K, Giamarellos-Bourboulis EJ, et al. What causes hidradenitis suppurativa? *Exp Dermatol.* 2008;17:455–6.
76. Yazdanyar S, Jemec GBE. Hidradenitis suppurativa: a review of cause and treatment. *Curr Opin Infect Dis.* 2011;24(2):118–223.
77. Deckers IE, Zee HH Van Der, Boer J, Prens EP. Correlation of early-onset hidradenitis suppurativa with stronger genetic susceptibility and more widespread involvement. *J Am Dermatology.* 2015;72(3):485–8.
78. Vekic DA, Frew J, Cains GD. Hidradenitis suppurativa, a review of pathogenesis, associations and management. Part 1. *Australas J Dermatol.* 2018;59:267–77.
79. Ingram JR. Hidradenitis suppurativa: an update. *Clin Med (Northfield Il).* 2016;16(1):70–3.
80. Alikhan A, Lynch PJ, Eisen DB. Hidradenitis suppurativa: A comprehensive review. *J Am Acad Dermatol.* 2009;60(4):539–61.
81. Saunte DML, Jemec GBE. Hidradenitis Suppurativa Advances in Diagnosis and Treatment. *JAMA.* 2017;318(20):2019–32.
82. Sartorius K, Lapins J, Emtestam L, Jemec G. Suggestions for uniform outcome variables when reporting treatment effects in hidradenitis suppurativa. *Br J Dermatol.* 2003;149:211–1213.

83. Kimball A, Kerdel F, Adams D, Al E. Adalimumab for the treatment of moderate to severe hidradenitis suppurativa: a parallel randomized trial. *Ann Intern Med.* 2012;157:846–55.
84. Grant A, Gonzalez T, Montgomery M, Cardenas V, Kerdel F. Infliximab therapy for patients with moderate to severe hidradenitis suppurativa: A randomized, double-blind, placebo-controlled crossover trial. *J Am Acad Dermatol.* 2010;62:202–3.
85. Prens E, Deckers I. Pathophysiology of hidradenitis suppurativa: An update. *J Am Acad Dermatol.* 2015;73(5):8–11.
86. Laffert M Von, Helmbold P, Wohlrab J, Fiedler E, Stadie V, Marsch WC. Hidradenitis suppurativa (acne inversa): early inflammatory events at terminal follicles and at interfollicular epidermis. *Exp Dermatol.* 2009;19:533–7.
87. Wang B, Yang W, Wen W, Sun J, Su B, Liu B, et al. g-Secretase Gene Mutations in familial acne inversa. *Science (80-).* 2010;330:2010.
88. Liu Y, Gao M, Lv Y. Confirmation by Exome Sequencing of the Pathogenic Role of NCSTN Mutations in Acne Inversa (Hidradenitis Suppurativa). *J Invest Dermatol.* 2011;131:1–3.
89. Hannigan GD, Grice EA. Microbial Ecology of the Skin in the Era of Metagenomics and Molecular Microbiology. *Cold Spring Harb Perspect Med.* 2013;3(12):a015362.
90. Grice EA, Kong HH, Renaud G, Young AC, Program CS, Bouffard GG, et al. A diversity profile of the human skin microbiota. *Genome Res.* 2008;18(7):1043–50.
91. Consortium THMP. Structure, function and diversity of the healthy human microbiome. *Nature.* 2012;486:207.
92. Jahns AC, Killasli H, Nosek D, Lundskog B, Lenngren A, Muratova Z, et al. Microbiology of hidradenitis suppurativa (acne inversa): a histological study of 27 patients. *APMIS.* 2014;122(9):804–9.
93. Delage M, Guet-Revillet H, Duchatelet S, Hovnanian A, Nassif X, Nassif A, et al. Deciphering the microbiology of hidradenitis suppurativa: a step forward towards understanding an enigmatic inflammatory skin disease. *Exp Dermatol.*

- 2015;24:736–7.
94. Sartorius K, Killasli H, Oprica C, Sullivan A, Lapins J. Bacteriology of hidradenitis suppurativa exacerbations and deep tissue cultures obtained during carbon dioxide laser treatment. *Br J Dermatol*. 2012;166(4):879–83.
 95. Lapins J, Jarstrand C, Emtestam L. Coagulase-negative staphylococci are the most common bacteria found in cultures from the deep portions of hidradenitis suppurativa lesions , as obtained by carbon dioxide laser surgery. *Br J Dermatol*. 1999;140:90–5.
 96. Katoulis AC, Koumakia D, Liakoua AI, Vrionib G, Koumakib V, Kontogiorgia D, et al. Aerobic and Anaerobic Bacteriology of Hidradenitis Suppurativa: A Study of 22 Cases. *Ski Appendage Disord*. 2015;1:55–9.
 97. Hessam S, Georgas D. Microbial Profile and Antimicrobial Susceptibility of Bacteria Found in Inflammatory Hidradenitis Suppurativa Lesions. *Ski Pharmacol Physiol*. 2016;29:161–7.
 98. Guet-revillet H, Coignard-biehler H, Jais J, Quesne G, Frapy E, Poirée S, et al. Bacterial Pathogens Associated with Hidradenitis Suppurativa,. *Emerg Infect Dis*. 2014;20(12).
 99. Okoye GA, Vlassova N, Olowoyeye O, Agostinho A, James G, Stewart PS, et al. Bacterial Biofilm in Acute Lesions of Hidradenitis Suppurativa. *Br J Dermatol*. 2016;176(1):241–3.
 100. Ring HC, Bay L, Nilsson M, Kallenbach K, Miller IM, Saunte DM, et al. Bacterial biofilm in chronic lesions of hidradenitis suppurativa. *Br J Dermatol*. 2017;176:993–1000.
 101. Rambhatla P V., Lim HW, Hamzavi I. A Systematic Review of Treatments for Hidradenitis Suppurativa. *Arch Dermatol*. 2012;148(4):439–46.
 102. Andersen R, Jemec G. Treatments for Hidradenitis Suppurativa. *Clin Dermatol*. 2016;35:218–24.
 103. Mordon S. Treating hidradenitis suppurativa with photodynamic therapy. *J Cosmet Laser Ther*. 2017;4172:223–8.
 104. Ingram J, Woo P, Chua S, Ormerod A, Desai N, Kai A, et al. Interventions for

- hidradenitis suppurativa (Review). *Cochrane Database Syst Rev*. 2015;(10):CD010081.
105. Lapins J, Zouboulis CC, Desai N, Emtestam L, Hunger RE, Ioannides D, et al. European S1 guideline for the treatment of hidradenitis suppurativa/acne inversa. 2015;1–26.
 106. Dini V, Oranges T, Rotella L, Romanelli M. Hidradenitis Suppurativa and Wound Management. *Int J Low Extrem Wounds*. 2015;14(3):236–44.
 107. Wang S, A a A, Alhusayen R, Bashas M, Sibbald R. Hidradenitis Suppurativa: A Frequently Missed Diagnosis, Part 2: Treatment Options. *Adv Ski Wound Care*. 2015;28(8):372–80.
 108. Scuderia N, Monfrecolaa A, Dessya LA, Fabbrocinib G, Megnab M, Monfrecolab G. Medical and Surgical Treatment of Hidradenitis Suppurativa: A Review. *Ski Appendage Disord*. 2017;3:95–110.
 109. Dhawan VK, Thadepalli H. Clindamycin: A Review of Fifteen Years of Experience. *Rev Infect Dis*. 1982;4(6):1133–53.
 110. Gemmell CG, Peterson PK, Schmeling D, Kim Y, Mathews J, Wannamaker L, et al. Potentiation of Opsonization and Phagocytosis of *Streptococcus pyogenes* following Growth in the Presence of Clindamycin. *J Clin Invest*. 1981;67:1249–56.
 111. Hoogdalem EJ Van. Transdermal absorption of topical anti-acne agents in man; review of clinical pharmacokinetic data. *J Eur Acad Dermatol Venereol*. 1998;11:13–9.
 112. Amr S, Brown MB, Martin GP, Forbes B. Activation of clindamycin phosphate by human skin. *J Appl Microbiol*. 2001;90:550–4.
 113. Sp MJ. Lincomycin, clindamycin and their applications. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2004;64:455–64.
 114. Klainer AS. Clindamycin. *Med Clin North Am*. 1987;71(6):1169–75.
 115. Simonart T, Dramaix M. Treatment of acne with topical antibiotics: lessons from clinical studies. *Br J Dermatol*. 2005;153:395–403.
 116. Schonell M, Dorken E, Grzybowski S. Rifampin. *Can Med Assoc J*.

- 1972;106(7):783–6.
117. Lester W. Rifampin: a semisynthetic derivative of rifamycin--a prototype for the future. *Annu Rev Microbiol.* 1972;26:85–102.
 118. Tsankov N, Kamarashev JA. Rifampin in dermatology. *Int J Dermatol.* 1993;32(6):401–6.
 119. Hobby GL. Summation of experimental studies on the action of rifampin. *J Clin Invest.* 1972;61(6):550–4.
 120. Rifampicin: a new orally active rifamycin. *Chemotherapy.* 1966;11(5):285–92.
 121. Gallo GG, Radaelli P. Rifampicin. *Anal Profiles Drug Subst.* 1976;5:467–513.
 122. Howard P, Twycross R, Grove G, Charlesworth S, Mihalyo M, Wilcock A. Rifampin (INN Rifampicin). *J Pain Symptom Manag.* 2015;50(6):891–5.
 123. Tsankov N, Angelova I. Rifampin in Dermatology. *Dis Mon.* 2004;50(7):369–80.
 124. Ziglam HM, Daniels I, Finch RG. Immunomodulating Activity of Rifampicin. *J Chemother.* 2016;16(4):357–61.
 125. Powell JJ, Dawber RPR, Gatter K. Folliculitis decalvans including tufted folliculitis: clinical, histological and therapeutic findings. *Br J Dermatol.* 1999;140:328–33.
 126. Sartorius K, Killasli H, Oprica C, Sullivan A, Lapins J. Bacteriology of hidradenitis suppurativa exacerbations and deep tissue cultures obtained during carbon dioxide laser treatment. *Br J Dermatol.* 2011;166(4):879–83.
 127. Lamiaux M, Dabouz F, Wantz M, Lebas D. Successful combined antibiotic therapy with oral clindamycin and oral rifampicin for pyoderma gangrenosum in patient with PASH syndrome. *JAAD Case Reports.* 2018;4(1):17–21.
 128. Bettoli V, Zauli S, Borghi A, Toni G, Minghetti S, Ricci M, et al. Oral clindamycin and rifampicin in the treatment of hidradenitis suppurativa-acne inversa: a prospective study on 23 patients. *J Eur Acad Dermatology Venereol.* 2014;28(1):125–30.
 129. Dessinioti C, Zisimou C, Tzanetakou V, Stratigos A, Antoniou C. Oral clindamycin and rifampicin combination therapy for hidradenitis suppurativa: a prospective study and 1-year follow-up. *Clin Exp Dermatol.* 2016;41(8):852–7.

130. Martorell A, García FJ, Jiménez-gallo D, Pascual JC, Pereyra-rodríguez J. Actualización en hidradenitis supurativa (ii): aspectos terapéuticos. *Actas dermosifiliográficas*. 2015;106(9):716–24.
131. Bernard A, Kermsrrec G, Parize P, Caruba T, Bouvet A, Mainardi J, et al. Dramatic reduction of clindamycin serum concentration in staphylococcal osteoarticular infection patients treated with the oral clindamycin-rifampicin combination. *J Infect*. 2015;71(2).
132. Join-Lambert O, F FR-D, Jullien V, Kitzis M, Jais J, Coignard-Biehler H, et al. Dramatic reduction of clindamycin plasma concentration in hidradenitis suppurativa patients treated with the rifampin-clindamycin combination. *Eur J Dermatol*. 2014;24(1):94–5.
133. Alexis F, Pridgen E, Molnar LK, Farokhzad OC. Factors Affecting the Clearance and Biodistribution of Polymeric Nanoparticles. *Mol Pharm*. 2008;5(4):505–15.
134. Kim BYS, Rutka JT, Chan WCW. Nanomedicine. *N Engl J Med*. 2010;363(25):2434–43.
135. Hagen M, Baker M. Skin penetration and tissue permeation after topical administration of diclofenac. *Curr Med Res Opin*. 2017;33:1623–34.
136. Tran TT. Cutaneous Drug Delivery: An Update. *J Investig Dermatol Symp Proc*. 2013;16(1):67–9.
137. Singla V, Saini S, Joshi B, Rana AC. A new platform for topical drug delivery. *Int J Pharma Bio Sci*. 2012;3(1).
138. Matos BN, Reis TA, Gratieri T, Gelfuso GM. Chitosan nanoparticles for targeting and sustaining minoxidil sulphate delivery to hair follicles. *Int J Biol Macromol*. 2015;75:225–9.
139. Tosta FV, Andrade LM, Mendes LP, Anjos JL V., Alonso A, Marreto RN, et al. Paclitaxel-loaded lipid nanoparticles for topical application: the influence of oil content on lipid dynamic behavior, stability, and drug skin penetration. *J Nanoparticle Res*. 2014;16(12):1–12.
140. Soldati PP, Polonini HC, Paes CQ, Restrepob JAS, Creczynski-Pasa TB, Chaves MGAM, et al. Controlled release of resveratrol from lipid nanoparticles

- improves antioxidant effect. IFAC-PapersOnLine. 2018;51(27):16–21.
141. Fernandes MFM, Figueiras CAL. Um panorama da nanotecnologia no brasil (e seus macro-desafios). *Quim Nova*. 2008;31(8):2205–13.
 142. Jorge LL, Feres CC, Teles VEP, Paulo S, Paulo S. Topical preparations for pain relief : efficacy and patient adherence. *J Pain Res*. 2011;4:11–24.
 143. Mohamed A, Xing MM. Nanomaterials and nanotechnology for skin tissue engineering. *Int J Burn Trauma*. 2012;2(1):29–41.
 144. Farokhzad OC, Langer R, Excellence CN, Engineering C. Impact of Nanotechnology on Drug. *acsnano*. 3(1):16–20.
 145. Suri SS, Fenniri H, Singh B. Nanotechnology-based drug delivery systems. *J Occup Med*. 2007;6:1–6.
 146. Gupta S, Bansal R, Gupta S, Jindal N, Jindal A. Nanocarriers and nanoparticles for skin care and dermatological treatments. *Indian Dermatol Online J*. 2013;4(4):267–73.
 147. Chaudhari YS. Nanoparticles - A paradigm for topical drug delivery. *Chronicles Young Sci*. 2012;3(1):82.
 148. Jung S, Otberg N, Thiede G, Richter H, Sterry W, Panzner S. Innovative Liposomes as a Transfollicular Drug Delivery System: Penetration into Porcine Hair Follicles. *J Invest Dermatol*. 2006;126:2–6.
 149. Jaiswal M, Dudhe R, Sharma PK. Nanoemulsion: an advanced mode of drug delivery system. *3 Biotech*. 2015;5:123–7.
 150. Zhai Y, Zhai G. Advances in lipid-based colloid systems as drug carrier for topic delivery. *J Control Release*. 2014;193:90–9.
 151. Beloqui A, Solini MA, Rodríguez-Gascón A, Almeida AJ, Préat V. Nanostructured Lipid Carriers: promising drug delivery systems for future clinics. *Nanomedicine Nanotechnology, Biol Med*. 2015;12(1):143–61.
 152. Upreti T, Senthil V. Nanostructured Lipid Carrier System for the Treatment for Skin Disease-A Review. *JSM Nanotechnol Nanomed*. 2017;5(3):1059.
 153. Loo C, Basri M, Ismail1 R, HLN L, MS H, HA K, et al. Effect of compositions in nanostructured lipid carriers (NLC) on skin hydration and occlusion. *Int J*

- Nanomedicine. 2013;8:13–22.
154. Mishra S, Kesharwani R, Tiwari AK, Patel DK. Improvement of Drug Penetration through the Skin by Using Nanostructured Lipid Carriers (NLC). *IjpprHuman*. 2016;6(3):481–96.
 155. H. Muller R, Shegokar R, M. Keck C. 20 Years of Lipid Nanoparticles (SLN & NLC): Present State of Development & Industrial Applications. *Curr Drug Discov Technol*. 2011;8(3):207–27.
 156. Müller RH, Petersen RD, Hommoss A, Pardeike J. Nanostructured lipid carriers (NLC) in cosmetic dermal products. *Adv Drug Deliv Rev*. 2007;59(6):522–30.
 157. Jain P, Rahi P, Pandey V, Asati S, Soni V. Nanostructure lipid carriers: A modish contrivance to overcome the ultraviolet effects. *Egypt J Basic Appl Sci*. 2017;4(2):89–100.
 158. Mitri K, Shegokar R, Gohla S, Anselmi C, Müller RH. Lipid nanocarriers for dermal delivery of lutein: Preparation, characterization, stability and performance. *Int J Pharm*. 2011;414(1–2):267–75.
 159. Purohit DK, Nandgude TD, Poddar SS. Nano-lipid Carriers for Topical Application: Current Scenario. *Asian J Pharm*. 2016;2016(5):1–9.
 160. Ünler M. Preparation, characterization and physicochemical properties of Solid Lipid Nanoparticles (SLN) and Nanostructured Lipid Carriers (NLC): Their benefits as colloidal drug carrier systems. *Pharmazie*. 2006;61(5):375–86.
 161. Souto EB, Wissing SA, Barbosa CM, Müller RH. Development of a controlled release formulation based on SLN and NLC for topical clotrimazole delivery. *Int J Pharm*. 2004;278:71–7.
 162. Joshi M, Patravale V. Nanostructured lipid carrier (NLC) based gel of celecoxib. *Int J Pharm*. 2008;346:124–32.
 163. Gomes MJ, Martins S. Lipid nanoparticles for topical and transdermal application for alopecia treatment: development, physicochemical characterization, and in vitro release and penetration studies. *Int J Nanomedicine*. 2014;9:1231–42.
 164. Montenegro L, Lai F, Offerta A, Grazia M, Maria A, Valenti D, et al. *Journal of*

- Drug Delivery Science and Technology From nanoemulsions to nanostructured lipid carriers: A relevant development in dermal delivery of drugs and cosmetics. *J Drug Deliv Sci Technol.* 2016;32:100–12.
165. Teichmann A, Jacobi AU, Ossadnik AM, Richter H, Koch AS, Sterry W, et al. Differential Stripping: Determination of the Amount of Topically Applied Substances Penetrated into the Hair Follicles. *J Invest Dermatol.* 2005;125(2):264–9.
 166. Blume-Peytavi U, Vogt A. Human hair follicle reservoir function and selective targeting. *Br Assoc Dermatologists.* 2011;165:13–7.
 167. Desai PR, Shah PP, Hayden P, Singh M. Investigation of follicular and non-follicular pathways for polyarginine and oleic acid modified nanoparticles. *Pharm Res.* 2014;30(4):1037–49.
 168. Fang C, Li Y, Fang J. Delivery and targeting of nanoparticles into hair follicles. *Ther Deliv.* 2014;5:991–1006.
 169. Peng D, Huang K, Liu Y, Liu S. Preparation of novel polymeric microspheres for controlled release of finasteride. *Int J Pharm.* 2007;342:82–6.
 170. Senyigit T, Sonvico F, Barbieri S, Özer Ö, Santi P, Colombo P. Lecithin / chitosan nanoparticles of clobetasol-17-propionate capable of accumulation in pig skin. *J Control Release.* 2010;142:368–73.
 171. Caverzan J, de Jesus M, Durán N. Nanostructured Lipid Carriers Loaded with 17- α -Estradiol Accumulate into Hair Follicles. *J Braz Chem Soc.* 2020;1–7.
 172. Shamma RN, Aburahma MH. Follicular delivery of spironolactone via nanostructured lipid carriers for management of alopecia. *International J Nanomedicine.* 2014;9:5449–60.
 173. Reis TA, Jaculi AE, Alves CR, Gratieri T, Marreto R, Joanitti GA, et al. Simple and selective HPLC-UV/Vis bioanalytical method to determine aluminum phthalocyanine chloride in skin permeation studies. *J Anal Methods Chem.* 2018;2018:1–7.
 174. Angelo T, Pires FQ, Gelfuso GM, Silva JKR, Gratieri T, Cunha-Filho MSS. Development and validation of a selective HPLC-UV method for thymol determination in skin permeation experiments. *J Chromatogr B Anal Technol*

- Biomed Life Sci. 2016;1022:81–6.
175. ICH. Harmonised Tripartite Guideline - Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology - Q2 (R1). Geneva, Switzerland,. 2005;
 176. Ângelo T, Cunha-Filho MSS, Gelfuso GM, Gratieri T. Chromatographic method for clobetasol propionate determination in hair follicles and in different skin layers. *Biomed Chromatogr.* 2017;31(2).
 177. Fuster J, Negro S, Salama A, Fernández-Carballido A, Marcianes P, Boeva L BE. HPLC-UV method development and validation for the quantification of ropinirole in new PLGA multiparticulate systems: Microspheres and nanoparticles. *Int J Pharm.* 2015;491(1–2):310–7.
 178. Pinho LAG, Sá-barreto LCL, Infante CMC, Cunha-filho MSS. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy* Simultaneous determination of benznidazole and itraconazole using spectrophotometry applied to the analysis of mixture: A tool for quality control in the development of formulations. *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc.* 2016;159:48–52.
 179. Ferreira-nunes R, Angelo T, Márcia S, Oliveira P, Gratieri T, Sérgio M, et al. Versatile chromatographic method for catechin determination in development of topical formulations containing natural extracts. *Biomed Chromatogr.* 2018;32(2).
 180. Pires FQ, Angelo T, K.R.Silva J, Sá-barreto LCL, Lima EM, Gelfuso GM, et al. Use of mixture design in drug-excipient compatibility determinations: Thymol nanoparticles case study. *J Pharm Biomed Anal.* 2017;137:196–203.
 181. Silva LAD, Taveira SF, Lima EM, Marreto RN. In vitro skin penetration of clobetasol from lipid nanoparticles: drug extraction and quantitation in different skin layers. *Brazilian J Pharm Sci.* 2012;48(4):811–7.
 182. Souza LG, Silva EJ, Martins ALL, Mota MF, Braga RC, Lima EM, et al. Development of topotecan loaded lipid nanoparticles for chemical stabilization and prolonged release. *Eur J Pharm Biopharm.* 2011 Sep;79(1):189–96.
 183. da Rocha PBR, Souza B dos S, Andrade LM, dos Anjos JL V., Mendanha SA, Alonso A, et al. Enhanced asiaticoside skin permeation by Centella asiatica-loaded lipid nanoparticles: Effects of extract type and study of stratum corneum

- lipid dynamics. *J Drug Deliv Sci Technol.* 2019;50:305–12.
184. Andrade LM, De Fátima Reis C, Maione-Silva L, Anjos JL V., Alonso A, Serpa RC, et al. Impact of lipid dynamic behavior on physical stability, in vitro release and skin permeation of genistein-loaded lipid nanoparticles. *Eur J Pharm Biopharm.* 2014;88(1):40–7.
185. dos Anjos JLV, Alonso A. Terpenes increase the partitioning and molecular dynamics of an amphipathic spin label in stratum corneum membranes. *Int J Pharm.* 2008;350(1–2):103–12.
186. Luepke NP. Hen's egg chorioallantoic membrane test for irritation potential. *Fd Chem Toxic.* 1985;23(2):287–91.
187. Version CLPC. Guidance on the Application of the CLP Criteria. 2017. 1–647 p.
188. ANVISA. Guia para Avaliação de Segurança de Produtos Cosméticos. 2ª Edição. 2012. 74 p.
189. Wilson SL, Ahearne M, Hopkinson A. An overview of current techniques for ocular toxicity testing. *Toxicology.* 2015;327:32–46.
190. OCDE. Health effects OECD/OCDE 431 OECD GUIDELINE FOR TESTING OF CHEMICALS. In Vitro Skin Corrosion: Reconstructed Human Epidermis (RhE) Test Method [Internet]. 2019. 29 p. Available from: <http://www.oecd.org/termsandconditions/>.
191. Groeber F, Schober L, Schmid FF, Traube A, Kolbus-Hernandez S, Daton K, et al. Catch-up validation study of an in vitro skin irritation test method based on an open source reconstructed epidermis (phase II). *Toxicol Vitro.* 2016;36:254–61.
192. FDA, Reviewer Guidance - Validation of chromatographic methods, Rockville, United States of America,. 1994;(November).
193. Abdel-hafez SM, Hathout RM, Sasmour OA. Towards better modeling of chitosan nanoparticles production: Screening different factors and comparing two experimental designs. *Int J Biol Macromol.* 2014;64:334–40.
194. Safwat S, Hathout RM, Ishak RA, Mortada ND, Safwat S, Hathout RM, et al.

- Augmented simvastatin cytotoxicity using optimized lipid nanocapsules: a potential for breast cancer treatment. *J Liposome Res.* 2016;2104:1–10.
195. ScienceDirect. Rifampin. *Tuberculosis.* 2008;88:151–4.
 196. Ghaffari A, Manafi A, Reza H. Enhancement Effect of Trypsin on Permeation of Clindamycin Phosphate Through Third-degree Burn Eschar. *Iran J Pharm Res.* 2013;12(1):3–8.
 197. Campos PM, Praça FSG, Bentley MVLB. Quantification of lipoic acid from skin samples by HPLC using ultraviolet, electrochemical and evaporative light scattering detectors. *J Chromatogr B Anal Technol Biomed Life Sci.* 2015;1019:66–71.
 198. Vávrová K, Lorencová K, Klimentová J, Novotný J HA. HPLC method for determination of in vitro delivery through and into porcine skin of adefovir (PMEA). *J Chromatogr B Anal Technol Biomed Life Sci.* 2007;853(1–2):198–203.
 199. Imre S, Vlase L, Muntean DL. Bioanalytical method validation. 2008;10(1):13–21.
 200. Shah VP, Midha KK, Findlay JWA, Hill HM, Hulse JD, Mcgilveray IJ, et al. Bioanalytical Method Validation — A Revisit with a Decade of Progress. 2000;17(12).
 201. Pelizza G, Nebuloni M, Nebuloni M, Ferrari P, Gallo GG. Polymorphism of rifampicin. *Farmaco Sci.* 1977;32(7):471–81.
 202. Silva LAD, Andrade LM, de Sá FAP, Marreto RN, Lima EM, Gratieri T, et al. Clobetasol-loaded nanostructured lipid carriers for epidermal targeting. *J Pharm Pharmacol.* 2016;68:742–50.
 203. Alves R, Vitória T, Carlos L, Storpirtis S. Thermal behavior and decomposition kinetics of rifampicin polymorphs under isothermal and non-isothermal conditions. *Brazilian J Pharm Sci.* 2010;46(2).
 204. Corti G, Capasso G, Maestrelli F, Cirri M, Mura P. Physical-chemical Characterization of Binary Systems of Metformin Hydrochloride With Triacetyl-Beta-Cyclodextrin. *ournal Pharm Biomed Anal.* 2007;45:480–6.

205. Tamaddon L, Mostafavi SA, Karkhane R, Riazi-esfahani M. Thermoanalytical characterization of clindamycin-loaded intravitreal implants prepared by hot melt extrusion. *Adv Biomed Res.* 2015;4.
206. Kanagambikai R, Kumar JR, Mvra MS, Leng LA, Kanagambikai R. Preparation and characterization of natural polymers loaded clindamycin nanoparticles for topical delivery of acne treatment. *Rapp Pharm.* 2015;1(1):39–42.
207. Henwood SQ, Liebenberg W, Tiedt LR, Lo AP. Characterization of the Solubility and Dissolution Properties of Several New Rifampicin Polymorphs, Solvates, and Hydrates. *Drug Dev Ind Pharm.* 2001;27(10):1017–30.
208. Agrawal S, Ashokraj Y, Bharatam P V, Pillai O, Panchagnula R. Solid-state characterization of rifampicin samples and its biopharmaceutic relevance. *Eur J Pharm Sci.* 2004;22:127–44.
209. Costa WS, Raf FN, Ellena J, Pedro A. Crystalline structure of the marketed form of Rifampicin: a case of conformational and charge transfer polymorphism. *J Mol Struct.* 2018;1155:260–6.
210. Panchagnula R, Bhardwaj V. Effect of Amorphous Content on Dissolution Characteristics of Rifampicin. *Drug Dev Ind Pharm.* 2008;34:642–9.
211. Mecozzi M, Pietroletti M, Monakhova YB. FTIR spectroscopy supported by statistical techniques for the structural characterization of plastic debris in the marine environment: Application to monitoring studies. *MPB.* 2016;1–7.
212. Ran Y, Dong W, Wu S, Wang J, Gong J. Transformations among the New Solid-State Forms of Clindamycin Phosphate. *Org Process Res Dev.* 2013;17:1445–50.
213. Patzelt A, Richter H, Knorr F, Schäfer U, Lehr C-M, Dähne L, et al. Selective follicular targeting by modification of the particle sizes. *J Control Release.* 2011 Feb;150(1):45–8.
214. Bhattacharjee S. DLS and zeta potential – What they are and what they are not? *J Control Release.* 2016;235:337–51.
215. Honary S, Zahir F. Effect of Zeta Potential on the Properties of Nano-Drug Delivery Systems - A Review (Part 2). *Trop J Pharm Res.* 2013;12:265–73.

216. Wu L, Zhang J, Watanabe W. Physical and chemical stability of drug nanoparticles. *Adv Drug Deliv Rev.* 2011;63(6):456–69.
217. Almousallam M, Moia C, Zhu H. Development of nanostructured lipid carrier for dacarbazine delivery. *Int Nano Lett.* 2015;5(4):241–8.
218. Lee SG, Jeong JH, Lee KM, Jeong KH, Yang H, Kim M, et al. Nanostructured lipid carrier-loaded hyaluronic acid microneedles for controlled dermal delivery of a lipophilic molecule. *Int J Nanomedicine.* 2014;9:289–99.
219. Proksch E. pH in nature, humans and skin. *J Dermatol.* 2018;45(9):1044–52.
220. Gönüllü Ü, Üner M, Yener G, Karaman EF, Aydoğmuş Z. Formulation and characterization of solid lipid nanoparticles, nanostructured lipid carriers and nanoemulsion of lornoxicam for transdermal delivery. *Acta Pharm.* 2015;65(1):1–13.
221. Yazdani-Arazi SN, Ghanbarzadeh S, Adibkia K, Kouhsoltani M, Hamishehkar H. Histological evaluation of follicular delivery of arginine via nanostructured lipid carriers: a novel potential approach for the treatment of alopecia. *Artif Cells, Nanomedicine Biotechnol.* 2017;45(7):1379–87.
222. Higuchi T. Mechanism of sustained-action medication. theoretical analysis of rate of release of solid drugs dispersed in solid matrices. *J Pharm Sci.* 1963;52:1145–9.
223. Costa P, Lobo J Manuel S. Modeling and comparison of dissolution profiles. *Eur J Pharm Sci.* 2001;13:123–33.
224. Huang Z, Hua S, Yang Y, Fang J. Development and evaluation of lipid nanoparticles for camptothecin delivery: a comparison of solid lipid nanoparticles, nanostructured lipid carriers, and lipid emulsion. *Acta Pharmacol Sin.* 2008;29(9):1094–102.
225. Paluva V, Britoraj S. Design, optimization, formulation and in-vitro, pharmacokinetic evaluation of carvedilol nano structured lipid carriers in suspension form. *Int J Pharm thecnology.* 2015;7(3):9638–54.
226. Costa PJC. Avaliação in vitro da bioequivalência de formulações farmacêuticas. *Brazilian J Pharm Sci.* 2002;38(2):2002.

227. Mendanha SA, dos Anjos JLV, Maione-Silva L, Silva HCB, Lima EM, Alonso A. An EPR spin probe study of the interactions between PC liposomes and stratum corneum membranes. *Int J Pharm.* 2018;545(1–2):93–100.
228. Moraes C, L.V. Anjos J, Maruno M, Alonso A, Rocha-Filho P. Development of lamellar gel phase emulsion containing baru oil (*Dipteryx alata* Vog.) as a prospective delivery system for cutaneous application. *Asian J Pharm Sci.* 2018;13(2):183–90.
229. Dayan N. Pathways for Skin Penetration. *Cosmet Toilet Mag.* 2005;120(6).
230. Jaiswal P, Gidwani B, Vyas A. Nanostructured lipid carriers and their current application in targeted drug delivery. *Artif Cells, Nanomedicine, Biotechnol.* 2014;44:1–14.
231. Nagalakshmi S, Shanmuganathan S, Anbarasan B, Sandhya K. Nanostructured lipid carriers (NLCs): A Novel based nano carrier for drug delivery and drug targeting. *Adv J Pharm Life Sci Res.* 2016;4(1):17–24.
232. Maestrelli F, Lu M, Maria A, Mura P. Preparation and characterisation of liposomes encapsulating ketoprofen– cyclodextrin complexes for transdermal drug delivery. *Int J Pharm.* 2005;298:55–67.
233. Ushirobira CY, Afiune LAF, Pereira MN, Cunha-filho M, Gelfuso GM, Gratieri T. Dutasteride nanocapsules for hair follicle targeting: Effect of chitosan-coating and physical stimulus. *Int J Biol Macromol.* 2020;151:56–61.
234. 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. *J Biomed Opt.* 2009;14(2):021014.
235. Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Fifteenth Informational Supplement. Vol. 25. 2005. 177 p.
236. Gilhotra RM, Nagpal K, Mishra DN. Azithromycin novel drug delivery system for ocular application. *Int J Pharm Investig.* 2011;1(1).
237. Mckenzie B, Kay G, Matthews KH, Knott RM. The hen's egg chorioallantoic membrane (HET-CAM) test to predict the ophthalmic irritation potential of a

- cysteamine-containing gel: Quantification using Photoshop and Image. *Int J Pharm.* 2015;490(1–2):1–8.
238. Bernardi DS, Pereira TA, Maciel NR, Bortoloto J, Viera GS, Oliveira GC, et al. Formation and stability of oil-in-water nanoemulsions containing rice bran oil: in vitro and in vivo assessments. *J Nanobiotechnology.* 2011;9(1):44.
239. Eiras F, Amaral MH, Silva R, Martins E, Lobo JMS, Silva AC. Characterization and biocompatibility evaluation of cutaneous formulations containing lipid nanoparticles. *Int J Pharm.* 2017;519(1–2):373–80.
240. Rawat D, Tripathi CB, Parashar P, Singh M, Kaithwas G, Saraf SA. Development and Characterization of Nanostructured Lipid Carriers of *Vetiveria zizanoides* Oil for Therapeutic Potential in Prickly Heat Treatment. *J Pharm Sci Pharmacol.* 2015;2(2):162–71.
241. Singh S, Singh M, Tripathi CB, Arya M, Saraf SA. Development and evaluation of ultra-small nanostructured lipid carriers: novel topical delivery system for athlete's foot. *Drug Deliv Transl Res.* 2015;6(1):38–47.