

**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE CIÊNCIAS DA SAÚDE**

GIULIANO CAMPOS DA SILVA

**AVALIAÇÃO DA PENETRAÇÃO CUTÂNEA IN VITRO DE CLINDAMICINA A
PARTIR DE FORMULAÇÃO TÓPICA PARA ACNE**

BRASÍLIA

2021

GIULIANO CAMPOS DA SILVA

**AVALIAÇÃO DA PENETRAÇÃO CUTÂNEA IN VITRO DE CLINDAMICINA A
PARTIR DE FORMULAÇÃO TÓPICA PARA ACNE**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à
Universidade de Brasília como requisito parcial para
obtenção de grau Farmacêutico

Orientador: Prof. Dr. Guilherme M. Gelfuso

Coorientadora: MSc. Seila Tolentino

BRASÍLIA

2021

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

AGRADECIMENTOS

Eu agradeço primeiramente ao professor Dr. Guilherme Martins Gelfuso por ter se disponibilizado a me orientar no meu trabalho de conclusão de curso, à Seila, que me ajudou me coorientando e se disponibilizou a me passar orientações e a revisar este trabalho. Queria agradecer ao Laboratório de Medicamentos, Alimentos e Cosméticos da Universidade de Brasília, por ter me dado a oportunidade de realizar pesquisas dentro da Universidade e por ser o lugar onde executei o trabalho de conclusão de curso.

Agradeço à minha namorada, Kamyille, aos meus amigos e irmãos, Gabriel, Emerson, Pedro e Igor, à minha mãe e pai, Lene e Gilton por sempre estarem me dando forças e ajudando no meu crescimento profissional e pessoal.

RESUMO

A acne vulgaris é uma dermatose crônica que afeta a pele muito frequentemente, principalmente entre adolescentes. A doença ocorre quando o folículo pilosebáceo apresenta hiperprodução sebácea, hiperqueratinização folicular, aumento da colonização por *Propionibacterium acnes* e inflamação dérmica periglandular. O tratamento pode ser sistêmico, tópico ou cirúrgico dependendo do grau de acometimentos da pele, da tolerância e até mesmo do poder aquisitivo dos pacientes. Em relação aos tratamentos tópicos, observa-se um aumento no interesse dessa via por conta da aplicação direta no local de ação e conseqüente diminuição dos efeitos sistêmicos dos medicamentos envolvidos. Dessa forma, estudos recentes têm sido dedicados à avaliação da interação dessas formulações com as estruturas da pele, assim como o desenvolvimento de novas estratégias no desenvolvimento desses medicamentos. Nesse sentido, ensaios aplicados para avaliar o perfil de permeação desses fármacos têm sido desenvolvidos ao longo dos últimos anos. No presente estudo foi realizado um ensaio de validação parcial de um método analítico para avaliar a clindamicina em amostras de pele, objetivando determinar o perfil de permeação cutânea do fármaco, quando administrado por via tópica, e possibilitar a avaliação da sua distribuição nas camadas da pele. O ensaio de permeação cutânea demonstrou que o fosfato de clindamicina em sua forma comercial (Adacne Clin[®]) permeou significativamente mais as camadas da pele em comparação ao fármaco em solução. No folículo piloso, que é alvo da acne, ela chegou a aumentar em 34 vezes a penetração do fármaco comparado ao controle e na epiderme + derme o aumento foi de 5 vezes. Esses resultados ressaltam a importância dos adjuvantes farmacotécnicos no desenvolvimento de uma formulação tópica.

Palavras-chave: Acne vulgaris, tratamento tópico, permeação cutânea, fosfato de clindamicina.

ABSTRACT

Acne vulgaris is a chronic dermatosis that affects the skin very often, especially among teenagers. The disease occurs when the pilosebaceous follicle presents sebaceous overproduction, follicular hyperkeratinization, increased colonization by *Propionibacterium acnes* and periglandular dermal inflammation. Treatment can be systemic, topical, or surgical depending on the degree of skin involvement, tolerance and even the purchasing power of patients. Regarding topical treatments, there is an increased interest in this route due to the direct application at the site of action and the consequent decrease in the systemic effects of the drugs involved. Thus, recent studies have been dedicated to evaluating the interaction of these formulations with skin structures, as well as the development of new strategies in the development of these drugs. In this sense, tests applied to assess the permeation profile of these drugs have been developed over the last few years. In the present study, a partial validation trial of an analytical method to evaluate clindamycin in skin samples was carried out, aiming to determine the cutaneous permeation profile of the drug, when administered topically, and to enable the evaluation of its distribution in the skin layers. The skin permeation assay demonstrated that clindamycin phosphate in its commercial form (Adacne Clin®) significantly permeated the skin layers compared to the drug in solution. In the hair follicle, which is the target of acne, it increased 34 times the penetration of the drug compared to the control and in the epidermis + dermis the increase was 5 times. These results highlight the importance of pharmacotechnical adjuvants in the development of a topical formulation.

Keywords: Acne vulgaris, topical treatment, skin permeation.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Esquema mostrando a estrutura da pele e seus anexos. Fonte: TOLENTINO et al.,2019.	14
Figura 2: Fórmula estrutural do fosfato de clindamicina (CDM) (Massa molecular: 504,96 g mol ⁻¹ e Log P: 0,57).....	17
Figura 3: Representação esquemática das possíveis vias de penetração cutânea: (A) via de penetração intracelular através dos corneócitos, (B) via de penetração intercelular, em torno dos corneócitos, (C) via de penetração folicular. Fonte: autoria própria.	18
Figura 4. Representação do processo de remoção da pele da orelha de suínos. Fonte: (TOLENTINO et al, 2019).	22
Figura 5. Representação da técnica de tape-stripping diferencial e os métodos de extração testados para a recuperação de fosfato de clindamicina (CDM) das camadas da pele. Fonte: autoria própria.	23
Figura 6. Cromatogramas representativos de CLAE do fosfato de clindamicina (CDM), estrato córneo (EC), folículos pilosos (FP) e pele remanescente (PR) obtidos seguindo o método estabelecido com detecção UV (200 nm).	27
Figura 7. Curva analítica obtida pela análise de uma triplicata de fosfato de clindamicina por HPLC nas concentrações de 2,0; 5,0; 7,0; 10,0; 15,0 e 20,0 µg/mL, comprovando a linearidade do método. Equação da reta: $y = 5174x + 1354$, $r = 0,9985$	28
Figura 8. Quantidade permeada de fármaco na pele de suínos (**p>0,05).	30

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Avaliação do método de extração de fosfato de clindamicina das camadas de pele estudadas (EC, estrato córneo; FP, folículos pilosos; PR, pele remanescente). Ensaio de Permeação cutânea	29
--	----

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
ICH	Do inglês: <i>International Conference on Harmonization</i>
HPLC	Do inglês: <i>High Performance Liquid Chromatography</i>
RDC	Resolução da Diretoria Colegiada
IFA	Insumo farmacêutico ativo
ANVISA	Agencia Nacional de Vigilância Sanitária
CDER	Do inglês: <i>Center for Drug Evaluation and Research</i>
CV	Coefficiente de variação
UV	Ultravioleta
FP	Folículo piloso
PR	Pele remanescente
EC	Etrato Córneo
FDA	Do inglês: <i>Food and drug administration</i>

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	10
2	OBJETIVOS	12
2.1	Objetivo Geral.....	12
2.2	Objetivos específicos	12
3	REVISÃO DA LITERATURA.....	13
3.1	Pele.....	13
3.2	Acne Vulgaris	14
3.3	Tratamentos.....	15
3.4	Fosfato de clindamicina	16
3.5	Penetração e permeação cutânea.....	18
4	DESENVOLVIMENTO	20
4.1	Material	20
4.2	Métodos.....	21
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	26
6	CONCLUSÃO	32
	REFERÊNCIAS	33

1 INTRODUÇÃO

A acne é uma dermatose que acomete frequentemente a população como um todo, sendo prevalente em mais de 80% da população de adolescentes e adultos jovens (BISWAL et al., 2015). Essa doença pode ser caracterizada por lesões não-inflamatórias, que podem ser abertas ou não, e por lesões inflamatórias, como pápulas, cistos, nódulos ou pústulas. Essas lesões são comumente encontradas nas regiões do pescoço, face, tórax, dorso e braços (KERI, 2018).

A acne vulgar possui várias causas de aparecimento no organismo, como fatores genéticos (polimorfismos na IL-1 alfa e na CYP 1A1), hormonais (desregulação dos hormônios Di-hidrotestosterona, Desidroepiandrosterona, Fator de crescimento semelhante à insulina tipo 1 e uso de esteroides anabolizantes) e infecções causada por micro-organismos anaeróbios, como o *Propionibacterium acnes* e o parasita *Demodex folliculorum* (SIMONART, 2013; WEBSTER, 1995).

Quanto ao desenvolvimento e fisiopatologia da doença, ela pode ser desenvolvida por meio do bloqueio dos folículos pilosos, causado pela produção exacerbada de sebo, depósito de queratina, que em excesso pode gerar comedões ou “cravos”, e por conta da presença da *Propionibacterium acnes* ou do *Demodex folliculorum*, que promovem a geração de mediadores pro-inflamatórios na pele (VYAS et al., 2014; WEBSTER, 1995). A gravidade dessa doença pode ser classificada por meio das escalas de Leeds e de Pillsbury (COSTA, 2015; FILHO, 2010).

Existem vários protocolos de tratamento da acne. Tais protocolos baseiam-se em tratamentos por via oral que podem ser através da administração de fármacos como os retinoides e antibióticos, e o tratamento tópico. A primeira linha de tratamento da doença é o uso oral de antibióticos associados ao uso tópico de peróxido de benzoila ou retinoides (BARROS et al., 2020).

Em relação aos tratamentos tópicos, observa-se um aumento no interesse dessa via por conta da aplicação direta no local de ação e consequente diminuição dos efeitos sistêmicos dos medicamentos envolvidos. Dessa forma, estudos recentes têm sido dedicados à avaliação da interação dessas formulações com as estruturas da pele, assim como o desenvolvimento de novas estratégias no desenvolvimento desses medicamentos (COSTA; ALCHORNE; GOLDSCHMIDT, 2008).

Nesse sentido, ensaios aplicados para avaliar *in vitro* o perfil de permeação desses fármacos tem sido desenvolvido ao longo dos últimos anos. Esses ensaios objetivam

demonstrar características físico-químicas e farmacocinéticas dos medicamentos administrados por via tópica, de modo semelhante ao que se faz para medicamentos orais. Assim, esses ensaios possibilitam a quantificação do fármaco administrado a partir de certos medicamentos tópicos e sua distribuição nas camadas da pele. No caso de medicamentos para o tratamento da acne, esses ensaios permitem a avaliação do direcionamento do fármaco para o seu local de ação, que são as estruturas polissebáceas da pele. Algumas variações dessas metodologias ainda permitem a aplicação de condições que podem estar associadas a própria doença, como a produção exacerbada de sebo durante um quadro de acne vulgaris (TOLENTINO et. al, 2021).

Atualmente a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), lançou o “Guia sobre requisitos de qualidade para produtos tópicos e transdérmicos”, que estabelece requisitos mínimos para o desenvolvimento de produtos farmacêuticos que são administrados por via tópica e transdérmica. Um desses requisitos é o ensaio de permeação cutânea. Tal ensaio é necessário, pois as propriedades físico-químicas do fármaco, como o coeficiente de partição, massa molecular e solubilidade aquosa, e fatores relacionados à pele, como o grau de hidratação e a condição do estrato córneo, podem influenciar na liberação do fármaco *in vivo* e na sua permeação quando administrado por via tópica (ANVISA, 2019). Contudo, esses ensaios ainda não são um consenso nem demanda obrigatória para os medicamentos tópicos e, portanto, eles não foram realizados para algumas formulações comerciais contendo fármacos para a acne disponíveis no mercado (ANVISA, 2019).

No presente estudo foram empregados esses ensaios *in vitro* para determinar o perfil de penetração cutânea do fosfato de clindamicina incorporada em uma formulação comercial para a acne comparada uma simples solução do fármaco em sua forma livre, com o intuito de verificar a influência da formulação, contendo o fármaco, e sua biodisponibilidade tópica.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Este trabalho teve como objetivo principal avaliar, *in vitro*, o perfil de penetração cutânea de formulações contendo o fármaco fosfato de clindamicina por meio de ensaios laboratoriais, que avaliam a sua biodisponibilidade tópica. O trabalho realizado tem o intuito de estabelecer uma comparação que pode ser feita a partir de uma formulação comercial e uma solução aquosa contendo o fármaco livre.

2.2 Objetivos específicos

- Desenvolver e validar parcialmente um método analítico por meio da técnica de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) para quantificar de maneira seletiva o fosfato de clindamicina extraído de camadas da pele em experimento de permeação cutânea;
- Padronizar e validar um método de extração do fosfato de clindamicina que permeou a pele suína;
- Avaliar *in vitro* o perfil de penetração do fosfato de clindamicina a partir da formulação comercial em comparação a uma solução aquosa do fármaco.

3 REVISÃO DA LITERATURA

3.1 Pele

A pele é o maior órgão do corpo humano e é responsável por cerca de 16% do peso corporal. Possui a função principal de proteger o corpo contra influências do meio externo, evitar a perda de água, regular a temperatura do corpo, sintetizar vitamina D, além de possuir funções que auxiliam nos aspectos imunológicos e sensoriais (BARCAUI et al., 2015).

Esse órgão é constituído por diferentes tecidos e camadas, sendo a epiderme a sua camada mais externa. Grande parte dessa camada (cerca de 95%) é composta por células que sintetizam a proteína queratina, os queratinócitos, que sofrem grande diferenciação celular e são distribuídos em quatro camadas. Da base à superfície, tem-se camada basal, espinhosa, granulosa e córnea. A parte menor da epiderme (cerca de 5%) é constituída pelas células de Langerhans e de Merkel (BARCAUI et al., 2015). A epiderme é um tecido altamente dinâmico e permanece em constante renovação devido a descamação da pele (perda de células da superfície do estrato córneo). Dessa forma, essa perda é equilibrada pelo crescimento celular provindo da parte inferior (BOUWSTRA e PONEC, 2006).

Em relação às células mais imaturas estão os denominados queratinócitos basais, que começam a se diferenciar durante a migração através do estrato granuloso e espinhoso, passando por uma série de modificações e mudanças na estrutura e composição. Essa camada é constituída por células cuboidais tendendo a formas retangulares, ligados à derme por hemidesmossomas (BERNARDO, 2019; BOUWSTRA e PONEC, 2006).

Os queratinócitos desfazem sua conexão com o hemidesmossoma na junção dérmico-epidérmica, saindo da camada basal e movendo-se em direção à superfície mais externa (superfície epidérmica). No decorrer deste processo de diferenciação celular, as células tornam-se mais achatadas no plano da epiderme, onde se ligam firmemente umas às outras por desmossomas (BOUWSTRA e PONEC, 2006).

A camada próxima à externa é denominada estrato granuloso, cujas células mais externas secretam corpos lamelares, formando o complexo lipídico de barreira, que retém a umidade do corpo e protege contra micro-organismos patógenos. Na etapa final de diferenciação, as células da camada mais externa se combinam com complexos lipídicos para formar o estrato córneo (BOUWSTRA e PONEC, 2006).

Entre a epiderme e a derme, encontra-se a zona da membrana basal, que liga os queratinócitos da camada basal as fibras de colágeno da derme papilar, e possui como principal função dar suporte, elasticidade e flexibilidade aos tecidos (BARCAUI et al., 2015; LOURENÇO, 2013).

A derme é considerada a principal massa da pele, caracterizada por um tecido flexível, forte e com grande viscoelasticidade. É um tecido conjuntivo frouxo, constituído por colágeno e elastina. Ela é ligada às fáscias dos músculos subjacentes por uma camada chamada de hipoderme (MENDONÇA, 2011). Nesta camada encontram-se alguns componentes celulares como os mastócitos, plasmócitos, fibroblastos, linfócitos e células dendríticas dérmicas. Possui denso colágeno e fibras elásticas que são sintetizadas por fibroblastos cutâneos. A função principal da derme é conectar os tecidos e fornecer proteção estrutural para órgãos esqueléticos subjacentes e músculos. Ainda nesta camada existem estruturas denominadas anexos epidérmicos ou anexos cutâneos, como ilustra a Figura 1 (BARCAUI et al., 2015; BERNARDO, 2019).

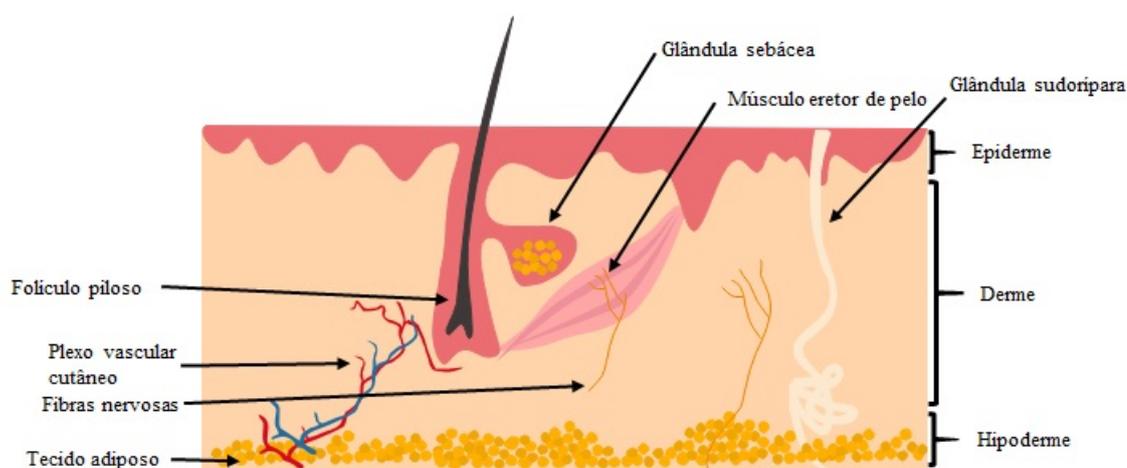


Figura 1: Esquema mostrando a estrutura da pele e seus anexos. Fonte: TOLENTINO et al.,2021.

3.2 Acne Vulgaris

A acne é uma doença que pode ser considerada uma das dermatoses mais frequentes na população em geral, bastante comum em adolescentes. Está associada a distúrbios no folículo pilossebáceo, que tem como fatores fundamentais a hiperprodução sebácea, hiperqueratinização folicular, aumento da colonização por *Propionibacterium acnes* e inflamação dérmica periglandular. Tem ocorrência em todas as raças e é menos intensa em negros e orientais, manifestando-se mais agressivamente em indivíduos do sexo masculino. (COSTA; ALCHORNE; GOLDSCHMIDT, 2008).

A acne constitui-se por um conjunto de lesões, que isoladas ou em conjunto podem definir o tipo e gravidade da patologia. Entre essas lesões destacam-se os comedões, que surgem em consequência da hiperqueratose de retenção no folículo pilossebáceo; as pápulas, que surgem como área de eritema e edema ao redor de um comedão, com pequenas dimensões que variam em até 3 mm; as pústulas, que se sobrepõem às pápulas, por conta de inflamação e conteúdo purulento; os nódulos, que possuem a estrutura idêntica às pápulas, porém com

maiores dimensões; os quistos, que se caracterizam como um grande comedão que sofre várias rupturas e recapsulações e a cicatriz, que se caracteriza por uma depressão de forma irregular coberta por pele atrófica, resultante da destruição do folículo pilossebáceo por reação inflamatória (FIGUEIREDO; MASSA; PICOTO, 2011).

3.3 Tratamentos

Atualmente ainda não há consenso para o tratamento da acne - podem ser sistêmicos, tópicos ou cirúrgicos (no caso de predominância de comedões, cicatrizes ou cistos). São escolhidos dependendo do grau de acometimentos da pele, da tolerância e até mesmo do poder aquisitivo dos pacientes (BRENNER, 2006). O tratamento com a isotretinoína por via oral, por exemplo, é a terapia mais eficaz em quadros mais graves, mesmo que possua uma série de efeitos adversos, como teratogenicidade. Outra opção bastante indicada e que pode gerar bons resultados é o tratamento com contraceptivos, para as mulheres, pelo fato de a pele ser alvo de hormônios androgênicos (RIBEIRO et al., 2015).

Cuidados diários também podem auxiliar no tratamento da acne. Entre eles estão, a lavagem das áreas afetadas com produtos específicos e destinados aos tratamentos de peles acneicas (sabonetes específicos para peles oleosas, compressa de água quente para remoção de comedões e o uso de produtos pouco oleosos com base em gel ou alcóolicas) (BRENNER, 2006).

O tratamento sistêmico deve ser considerado nas formas inflamatórias da acne e nas de difícil controle. Neles, podem ser usados antiandrógenos, antibióticos e retinóides sistêmicos (BRENNER, 2006). Os retinóides são bastante utilizados, eles normalizam a descamação do epitélio infundibular impossibilitando a formação de comedões. Entre esses, a isotretinoína (ácido 13-cisretinóico) é um dos mais utilizados (GOLLNICK, 2015; RODRIGUES et al., 2019).

O tratamento com antibióticos é recomendado em casos moderados e graves ou em casos que a lesão acneica recubra uma grande área. Antibióticos usados no tratamento da acne atuam na supressão do *P. Acnes*, reduzindo a inflamação causada por bactérias e na redução dos ácidos graxos livres. São utilizados no tratamento da acne inflamatória moderada e grave, pápulo-pustulosa e conglobata. Na atualidade são administrados principalmente as tetraciclinas e os macrolídeos (BARROS et al., 2020; MEYNADIER e ALIREZAI, 1998;).

Sobre o tratamento tópico, ele ocorre na administração de fármacos diretamente na área afetada. Normalmente são prescritos antibióticos associados a alguns outros agentes, como é o

caso do fosfato de clindamicina que pode ser associado ao peróxido de benzoíla, ácido salicílico, ácido retinóico ou ácido azelaico (BRENNER, 2006).

3.4 Fosfato de clindamicina

O 7(S)-cloro-7-desoxilincomicina, ou fosfato de clindamicina, derivado da lincomicina, é classificado como um antibiótico sistêmico, produzido a primeira vez em 1966. O fármaco é sintetizado por meio de modificações químicas na lincomicina quando ocorre uma substituição química do 7R-grupo hidroxila por um 7-cloro. Essas modificações proporcionam vantagens em relação ao composto original, como uma melhor absorção do fármaco no trato gastrointestinal, maior eficácia, até oito vezes mais, contra cocos gram-positivos aeróbios e ampliação do espectro de ação, incluindo muitas outras bactérias gram-positivas e gram-negativas anaeróbicas e protozoários (*Toxoplasma sp.* e espécies de *Plasmodium sp.*) (DHAWAN e THADEPALLI, 1982; KASTEN, 1999).

O fosfato de clindamicina liga-se à subunidade 50S ribossômica da bactéria inibindo a sua síntese proteica. A partir dessa inibição ocorre a alteração da superfície bacteriana com o objetivo de facilitar a fagocitose e a morte intracelular. Além disso, em concentrações sub-inibitórias, a clindamicina pode potencializar a marcação celular e a fagocitose (DHAWAN e THADEPALLI, 1982; GEMMELL et al., 1981).

Esse fármaco encontra-se disponível nas formas de sais, cloridrato, palmitato e fosfato. Em relação a esses sais, para a acne, o éster fosfato é o mais indicado, pelo fato de provocar a diminuição da absorção sistêmica e a redução dos efeitos colaterais, já que a forma cloridrato pode afetar a extensão da absorção, que pode chegar a níveis sistêmicos (HOOGDALEM, 1998).

A aplicação tópica possibilita a administração desse fármaco diretamente ao seu local de ação. Contudo, é possível verificar que o éster fosfato é um pró-fármaco que não possui atividade antibacteriana *in vitro*, precisando ser hidrolisado na forma ativa. Essa ativação ocorre no organismo e é realizada pela ação de fosfatases existentes na pele (KLAINER, 1987).

O fosfato de clindamicina é descrito como um pó branco ou quase branco, inodoro ou praticamente inodoro e com sabor amargo. Em relação às características físico-químicas, o fármaco é livremente solúvel em água, ligeiramente solúvel em álcool desidratado, muito ligeiramente solúvel em acetona e praticamente insolúvel em clorofórmio, éter e benzeno. Apresenta massa molecular de 504,96 g mol⁻¹, fórmula molecular C₁₈H₃₄ClN₂O₈PS, LogP 0,57, pKa de 6,9 e pH entre 3,5 e 4,5 em solução aquosa a 1% (USP,2018).

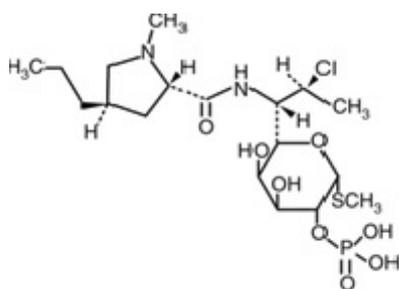


Figura 2: Fórmula estrutural do fosfato de clindamicina (CDM) (Massa molecular: 504,96 g mol⁻¹ e Log P: 0,57).

Em relação aos principais efeitos adversos da clindamicina de uso sistêmico estão, diarreia, hepatotoxicidade, disfunções gastrointestinais, reações de hipersensibilidade, flebite, ocasionalmente neutropenia e trombocitopenia, prolongamento do bloqueio neuromuscular, eritema, ardor, prurido e principalmente colite pseudomembranosa (DHAWAN e THADEPALLI, 1982; KLAINER, 1987).

Dessa forma, a clindamicina tópica tem obtido sucesso no tratamento da acne não complicada, pois diminui substancialmente a ocorrência dos efeitos adversos que existem em relação à administração oral do fármaco por proporcionar menor ação sistêmica, pelo fato da exposição do fármaco se limitar à área aplicada, além de permitir a administração de doses menores do fármaco (KLAINER, 1987).

3.5 Penetração e permeação cutânea

A maioria dos fármacos aplicados pela via tópica são fármacos usados para o tratamento de doenças dermatológicas e, portanto, essas formulações são desenvolvidas para que o fármaco atravesse efetivamente o estrato córneo e atinja o local de ação, estabelecendo uma resposta local, que conseqüentemente poderá vir a ser sistêmica ou não, dependendo do tipo de tratamento e fármaco utilizado. (MARTINS, VEIGA, 2002).

Os fármacos podem permear a pele de diferentes formas, ocorrendo por até três vias diferentes: a via intercelular, na qual a substância se difunde contornando os corneócitos; a via transcelular, na qual o fármaco atravessa diretamente os corneócitos e a matriz intercelular intermediária; ou por rotas alternativas em que eles podem ser absorvidos pelas estruturas capilares, glândulas sebáceas ou sudoríparas, conforme apresentado na Figura 3 (GRATIERI, GELFUSO, LOPEZ, 2008).

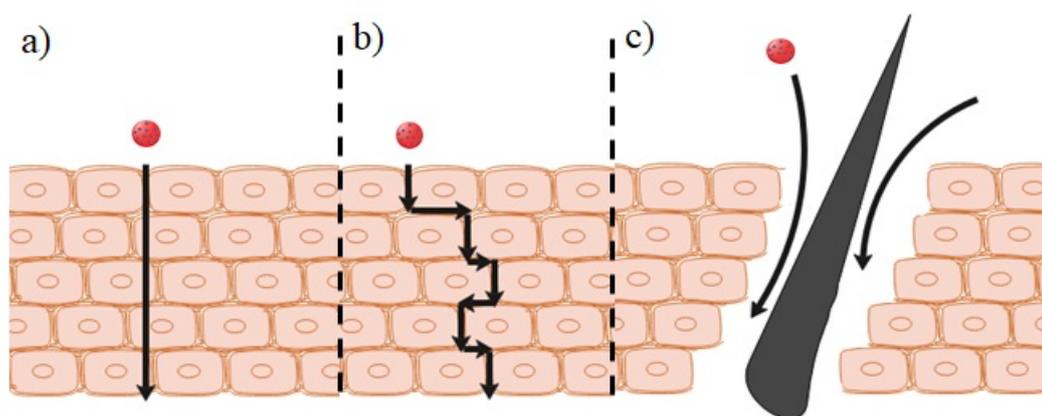


Figura 3: Representação esquemática das possíveis vias de penetração cutânea: (A) via de penetração intracelular através dos corneócitos, (B) via de penetração intercelular, em torno dos corneócitos, (C) via de penetração folicular. Fonte: autoria própria.

A avaliação da permeação cutânea possibilita a verificação da biodisponibilidade tópica do princípio ativo de um medicamento aplicado topicamente na pele (SILVA; APOLINÁRIO JUNIOR, 2010). Características como baixa massa molecular, alta lipofilicidade, mas também hidrofiliicidade favorecem para que o fármaco não fique completamente retido no estrato córneo e garantem uma atividade termodinâmica que favorecerá a sua difusão para o interior da pele (TOLENTINO et.al, 2021).

O ensaio de permeação cutânea, utilizando célula de difusão de *Franz*, permite a aplicabilidade da primeira lei de *Fick*, que indica que a taxa de difusão é proporcional ao gradiente de concentração, em sua forma mais simplificada. As células aplicadas nesse ensaio estruturalmente apresentam um compartimento doador, onde é aplicada a amostra a ser testada

e um compartimento receptor que é preenchido com meio sob condição de não saturação do sistema dinâmico, denominada de condição *sink*. (SILVA; APOLINÁRIO JUNIOR, 2010)

Entre os meios receptor e doador dessa célula é colocado uma membrana para simular a pele, podem ser de origem artificial (membrana de celulose, membrana pararela, entre outras) ou biológica (peles de porco, coelho, humana) (SATO et al., 2007).

É exigido atualmente para estudos de ensaios de permeação cutânea, o cumprimento efetivo das legislações que dispõem e possuem descrições sobre o tema, um exemplo, no Brasil, é o órgão regulador ANVISA, no qual é possível se ter informações sobre como o fármaco se comporta *in vivo* quando administrado por via tópica (ANVISA, 2019; CDER, 2019).

4 DESENVOLVIMENTO

4.1 Material

O fosfato de clindamicina ($\geq 99,0\%$) foi obtido da Sigma-Aldrich (Steinheim, Alemanha). Os solventes utilizados nas análises cromatográficas, acetonitrila e ácido fosfórico, foram obtidos da J. T. Baker (Phillipsburg, EUA) e Sigma-Aldrich (Steinheim, Alemanha), respectivamente. Para a preparação do tampão utilizado na permeação foram utilizados fosfato de sódio nas formas monobásica e dibásica, cloreto de sódio e hidróxido de sódio, todos da Dinâmica Química Contemporânea Ltda. (São Paulo, Brasil). A técnica de *tape stripping* diferencial, aplicada nos estudos de permeação, foi executada com o uso da fita Scotch nº. 845 Book Tape da 3M (St. Paul, MN, USA), cola de cianoacrilato da Henkel Loctite (Dublin, Irlanda) e metanol da marca J. T. Baker (Phillipsburg, EUA) para extração do fármaco retido nas camadas da pele. O ensaio de permeação/penetração cutânea foi realizado com o produto comercial o Adacne Clin, gel dermatológico, produzido pela Glenmark Farmacêutica Ltda, (Nasik, Índia) com registro sanitário vigente no País. Filtros pré-limpos, de diâmetro 25 mm e poro 0,45 μm , hidrofóbicos e hidrofílicos foram adquiridos da Analítica (São Paulo, Brasil). As peles utilizadas nos estudos de permeação cutânea, obtidas a partir das orelhas de suínos, foram gentilmente cedidas pelo Frigorífico Nippobras (Formosa, Goiás, Brasil). Todas as análises foram realizadas utilizando água ultrapurificada (Millipore, Illkirch-Graffenstaden, França).

4.2 Métodos

a) Desenvolvimento e validação da metodologia analítica

O método analítico utilizado para a quantificação do fosfato de clindamicina na presença de interferentes da pele foi baseado na metodologia já existente na monografia da Farmacopeia Brasileira 6ª edição (ANVISA, 2010). As alterações ocorreram no tampão que foi caracterizado como fase móvel. Foi utilizado o ácido fosfórico 0,01 M ao invés de fosfato de potássio monobásico a 1,36%, e temperatura da coluna fixada em 40°C, levando em consideração os fatores climáticos do Distrito Federal. Portanto, considerando a existência de método analítico farmacopeico, foi realizada validação parcial dessa metodologia por meio de análise dos parâmetros de seletividade, linearidade, precisão e exatidão.

i. Condições cromatográficas

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

ii. Obtenção das peles de suínos

As peles foram obtidas a partir de orelhas de suínos, retiradas logo após o abate do animal, e antes do processo de escalda, tudo isso para que o estrato córneo e as estruturas da pele da orelha suína fossem preservadas. Posteriormente, as orelhas foram mantidas sob refrigeração até seu processamento, que ocorreu no mesmo dia do abate.

Para se obter os fragmentos de pele, a orelha foi fixada com o auxílio de alfinetes em um suporte de isopor, recoberto com papel alumínio. Com o auxílio de um bisturi, a pele da região externa da orelha foi removida e os resquícios de tecido adiposo, tecido muscular e vasos sanguíneos são removidos com o auxílio de uma tesoura cirúrgica, conforme mostrado na Figura 4.



Figura 4. Representação do processo de remoção da pele da orelha de suínos. Fonte: (TOLENTINO et al, 2019).

iii. Extração dos fármacos das camadas da pele de suínos

A extração do fármaco retido nas camadas da pele (estrato córneo, folículos pilosos e pele remanescente) foi testada em diferentes condições. Para separação das camadas da pele utilizou-se a técnica *tape-stripping* diferencial (TEICHMANN et al., 2005). As peles de orelha de suínos foram recortadas em círculos de aproximadamente 1 cm² e foram fixadas por meio de um suporte recoberto com alumínio e com a parte do estrato córneo voltada para cima. Para retirada do estrato córneo foi aplicado e retirado 15 pedaços de fitas adesivas e logo depois aplicado uma gota de cola de cianoacrilato à superfície externa da pele, seguida por um pedaço de fita adesiva, após 1 min, a fita foi removida com um único movimento. Por fim a pele restante foi cortada em pequenos pedaços com o auxílio de uma tesoura.

As camadas de pele foram colocadas separadamente em frascos de vidro âmbar e contaminadas com 350 µL da solução estoque (equivalente a 35 µg de clindamicina, em metanol). Quando o solvente evaporou por completo, foram aplicados diferentes protocolos de extração (adição de 5 mL de água ou metanol à preparação e tempo de repouso de 12 ou 24 h), conforme ilustrado na Figura 5. Por fim as amostras foram filtradas em membranas de 0,45 µm, e depois analisadas seguindo o método por CLAE, com o intuito de verificar a capacidade de recuperação do fármaco na pele.

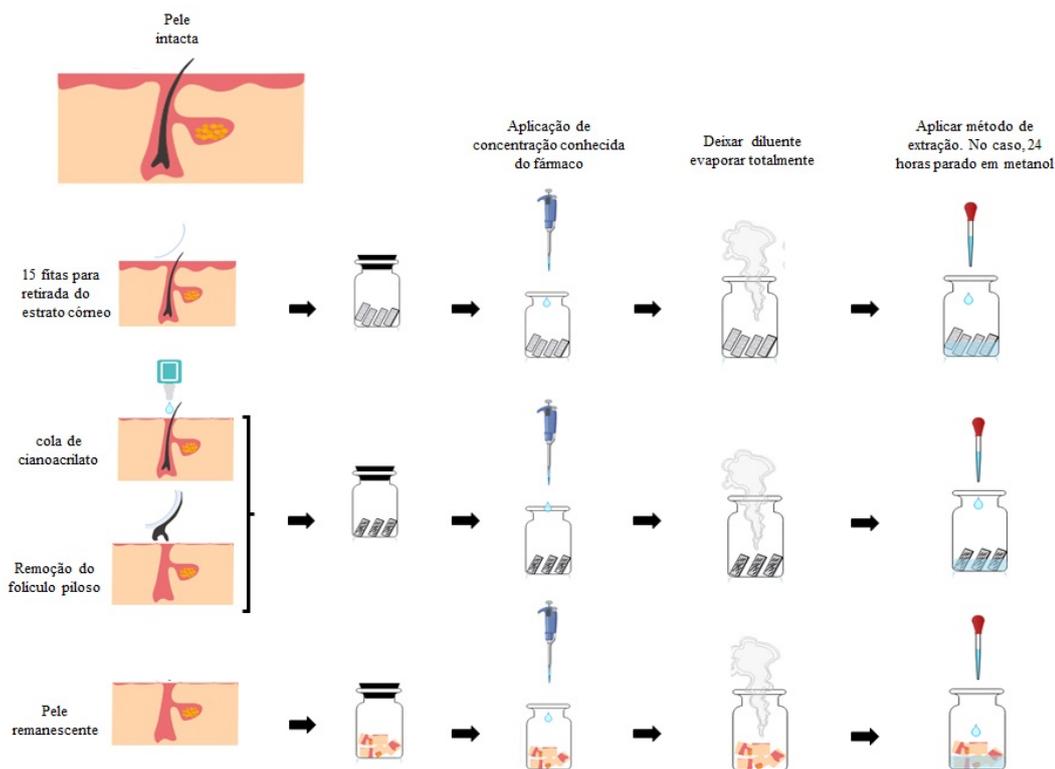


Figura 5. Representação da técnica de *tape-stripping* diferencial e os métodos de extração testados para a recuperação de fosfato de clindamicina (CDM) das camadas da pele. Fonte: autoria própria.

iv. Validação de Método Analítico

O desempenho e a confiabilidade do método cromatográfico proposto foram comprovados por meio de validação parcial da metodologia, considerando seletividade, linearidade, precisão e exatidão de acordo com as diretrizes da RDC nº 166 de 24/07/2017 da ANVISA, que estabelece critérios para a validação de métodos analíticos empregados em insumos farmacêuticos, medicamentos e produtos biológicos em todas as suas fases de produção, do *International Conference on Harmonization (ICH)* e da Farmacopeia Brasileira (FARMACOPÉIA BRASILEIRA 6ª ed, 2019; ICH, 2015)

Seletividade: uma solução contendo os contaminantes da pele suínos, obtidos a partir da técnica de *tape-stripping* diferencial, foi inicialmente preparada. Uma alíquota de cada uma das três soluções (estrato córneo, folículo piloso e pele remanescente) foi adicionada a uma solução de fosfato de clindamicina diluído em água na concentração de $7,0 \mu\text{g mL}^{-1}$. Posteriormente, as amostras foram filtradas em membranas de $0,45 \mu\text{m}$ e levadas para a análise seguindo o método por CLAE para a quantificação e diferenciação do fármaco em relação aos interferentes da pele.

Linearidade: soluções contendo fosfato de clindamicina foram preparadas a partir de três outras soluções estoques preparados de maneira independente. Alíquotas dessas soluções foram diluídas em água para obter uma curva de calibração na faixa de concentração que foi

de $2 \mu\text{g mL}^{-1}$ a $20 \mu\text{g mL}^{-1}$ (2,0; 5,0; 7,0; 15,0 e $20,0 \mu\text{g mL}^{-1}$). Posteriormente foram plotadas as curvas de calibração, que relacionam a concentração do fármaco e a área do pico observado. Os fatores de resposta foram calculados considerando a razão entre a área do pico e a concentração dos analitos.

Precisão: a precisão do método foi determinada pela repetibilidade instrumental, precisão intra-dia do método (repetibilidade) para o fármaco. A repetibilidade instrumental foi determinada utilizando uma amostra de independente. $7,0 \mu\text{g mL}^{-1}$ para o fármaco, feitas seis análises em um tempo curto. Os coeficientes de variação (CV) foram calculados e as concentrações de fosfato de clindamicina foram determinadas.

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

Previamente os fragmentos das camadas da pele foram separados seguindo a técnica de *tape-stripping* diferencial. Amostras de uma solução do fármaco foram aplicadas sobre as superfícies de cada camada de pele. O solvente foi completamente evaporado e 5 mL de cada diluente foram adicionados a cada fragmento de pele e deixados em repouso por 12 ou 24 h. Ao passar este período, as amostras foram filtradas através de uma membrana de $0,45 \mu\text{m}$. Por fim, as amostras foram analisadas em CLAE-UV. A exatidão foi relatada como uma porcentagem de fosfato de clindamicina recuperados das camadas da pele.

b) Ensaio *in vitro* de penetração cutânea

As peles limpas foram colocadas na célula de difusão tipo *Franz* modificadas (área de difusão = $1,3 \text{ cm}^2$) separando o compartimento doador do compartimento receptor. Este compartimento foi preenchido com 15 mL de um tampão fosfato pH 7,4 e ao compartimento doador foi aplicada quantidade equivalente a 1mg de formulação comercial ou a mesma quantidade de fármaco dissolvido em água. As células foram mantidas a uma temperatura de 32°C , com sob agitação magnética (300 rpm) por um período de 24 h. Os ensaios foram conduzidos em quintuplicata para a formulação comercial e para a solução do fármaco.

Após 24 h, a pele foi removida da célula de difusão e o excesso da formulação foi retirado colocando a pele na posição vertical e aplicando água ultrapurificada por um período de 10 segundos. Em seguida a pele foi colocada em superfície plana com o estrato córneo voltado para cima. A remoção do estrato córneo da pele ocorreu por meio da aplicação de 15 fitas adesivas. Posteriormente, uma gota de supercola de cianoacrilato foi aplicada na mesma

área da pele e coberta com uma outra fita adesiva. Após 1 min, a fita foi removida. Por fim, com o auxílio de uma tesoura a pele remanescente foi picotada.

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

c) Análise Estatística dos Dados

Para a análise estatística dos dados, o programa GradPad Prism 8 foi utilizado. As diferenças significativas foram definidas através da análise de variância (ANOVA) seguindo o teste t student. O nível de significância estatística dos dados foi fixado em $p < 0,05$. Os dados, de pelo menos uma triplicata, foram definidos como a média \pm desvio padrão. As equações de reta obtidas por regressão linear foram obtidas através do programa Microsoft Excel 2013.

5 RESULTADOS DISCUSSÃO

a) Metodologia analítica

O método analítico avaliado originou-se da monografia descrita na 6ª Edição da Farmacopeia Brasileira para o fosfato de clindamicina e teve como objetivo a quantificação desse fármaco na presença de contaminantes da pele, para posterior quantificação no experimento de permeação cutânea. Foi realizada a validação parcial dessa metodologia em termos de seletividade, linearidade, precisão e exatidão.

i. Seletividade

A seletividade é definida pela capacidade de identificar ou quantificar o analito de interesse, inequivocamente, na presença de componentes que podem estar presentes na amostra, como impurezas e componentes da matriz (BRASIL, 2002, p. 1). Segundo o artigo 19 da RDC Nº 166, é definida como o grau em que um método pode quantificar uma substância com precisão na presença de interferências nas condições indicadas do ensaio para a amostra matriz em estudo. Portanto, a corrida cromatográfica que contém o fosfato de clindamicina foi confrontada com as corridas cromatográficas de seus possíveis interferentes, provenientes das camadas da pele (estrato córneo, folículos pilosos e pele remanescente), conforme cromatogramas apresentados na Figura 6.

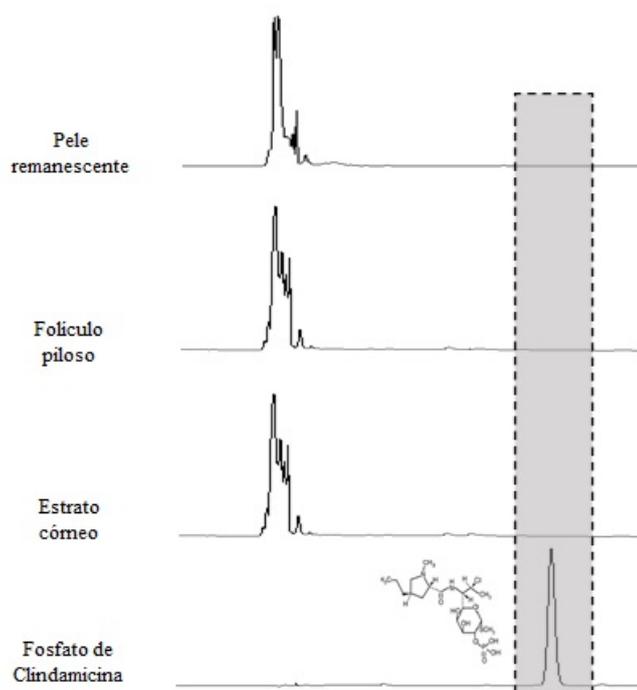


Figura 6. Cromatogramas representativos de CLAE do fosfato de clindamicina (CDM), estrato córneo (EC), folículos pilosos (FP) e pele remanescente (PR) obtidos seguindo o método estabelecido com detecção UV (200 nm).

Verificou-se que em uma corrida fixada em 15 minutos, a clindamicina eluiu em 10,5 minutos. Observou-se também que os cromatogramas referentes às camadas da pele, mostraram que todos os contaminantes provindos da matriz biológica eluíram em tempo de retenção diferentes do fosfato de clindamicina. Portanto, o método avaliado é seletivo em relação aos interferentes presentes na pele.

ii. Linearidade

A linearidade refere-se à capacidade que um método pode gerar resultados considerados linearmente proporcionais às concentrações do analito encontrado em uma determinada faixa analítica específica e é determinada a partir da curva da faixa de trabalho e calculada a partir da equação da regressão linear. A plotagem da área do pico de cada amostra em relação à respectiva concentração de fosfato de clindamicina foi considerada linear na faixa de $2,0 \mu\text{g.mL}^{-1}$ a $20 \mu\text{g.mL}^{-1}$.

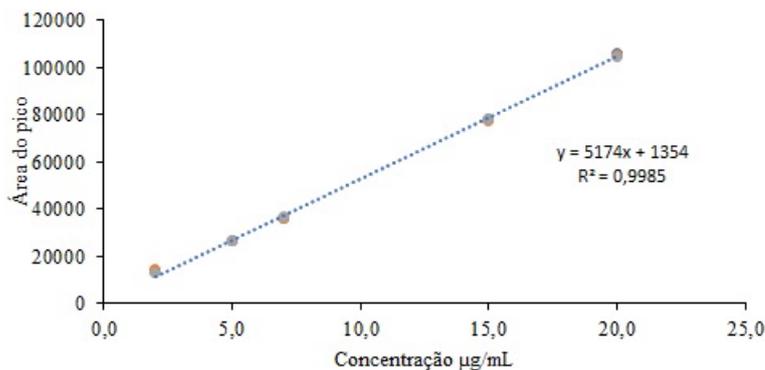


Figura 7. Curva analítica obtida pela análise de uma triplicata de fosfato de clindamicina por CLAE nas concentrações de 2,0; 5,0; 7,0; 10,0; 15,0 e 20,0 µg/mL, Equação da reta: $y = 5174x + 1354$, $r = 0,9985$.

A equações de regressão foi $y = 5174x + 1354$ e o coeficiente de correlação da curva padrão foi 0,9985, mostrando alta probabilidade de correlação. Observou-se que o coeficiente de correlação e a análise de regressão estão dentro dos limites estabelecidos (FDA, 2004) e, portanto, que o método é linear na faixa de concentração analisada.

iii. Precisão

A precisão avalia a proximidade dos resultados obtidos com as amostras preparadas conforme descrito no método analítico testado. O coeficiente de variação (CV) utilizando seis replicatas de uma solução de clindamicina a $7,0 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$. foi de 1,43%. Este valor encontra-se dentro dos critérios de aceitação (não maior que 5 %) do ICH (International Conference on Harmonization) e, portanto, o método foi considerado preciso (FDA, 2004).

iv. Exatidão/Recuperação

A exatidão de um método analítico é obtida através da concordância entre os resultados individuais do método em estudo a um valor que é aceito como verdadeiro. O método do estudo é considerado um método bioanalítico e a recuperação foi avaliada com base na porcentagem do fármaco fosfato de clindamicina que foi recuperada do estrato córneo, folículo piloso e pele remanescente. A extração do fármaco das três camadas da pele foi padronizada, variando-se o tempo de extração e a composição do solvente de extração, conforme é apresentado na Tabela

1. Tabela 1: Avaliação do método de extração de fosfato de clindamicina das camadas de pele estudadas (EC, estrato córneo; FP, folículos pilosos; PR, pele remanescente).

Solvente	Tempo de repouso (h)	Recuperação CDM (%)		
		EC	FP	PR
água	12	31,5	50,5	44,6
metanol	12	57,6	56,2	42,3
metanol	24	103,8	93,6	62,0

De acordo com a Tabela apresentada verificou-se que o metanol foi o solvente que melhor extraiu o fosfato de clindamicina das camadas da pele. O tempo de extração também foi determinante para a eficiência de extração, sendo 24 h o melhor tempo para extração. Nessas condições 103,8% do fármaco foi recuperado do estrato córneo. 93,6% dos folículos pilosos e 61% da pele remanescente. Vale ressaltar que este procedimento está de acordo com a orientação da FDA em casos de resultados de recuperação consistentes, precisos e reprodutíveis (FDA, 2004).

b) Ensaios *in vitro* de penetração cutânea

Atualmente. Os ensaios *in vitro* de permeação e penetração cutânea estão sendo constantemente utilizados e aplicados em estudos científicos com a finalidade de viabilizar a administração tópica de novas formulações farmacêuticas (MARTINS VEIGA, 2002). Esse estudo foi conduzido para a verificação do perfil de penetração cutânea do fosfato de clindamicina a partir de uma formulação comercial em relação ao fármaco solubilizado em veículo aquoso para avaliar a capacidade da formulação atingir as estruturas pilosebáceas da pele, que é o local de ação do fármaco em questão, e outras camadas da pele. Os resultados estão demonstrados na Figura 8.

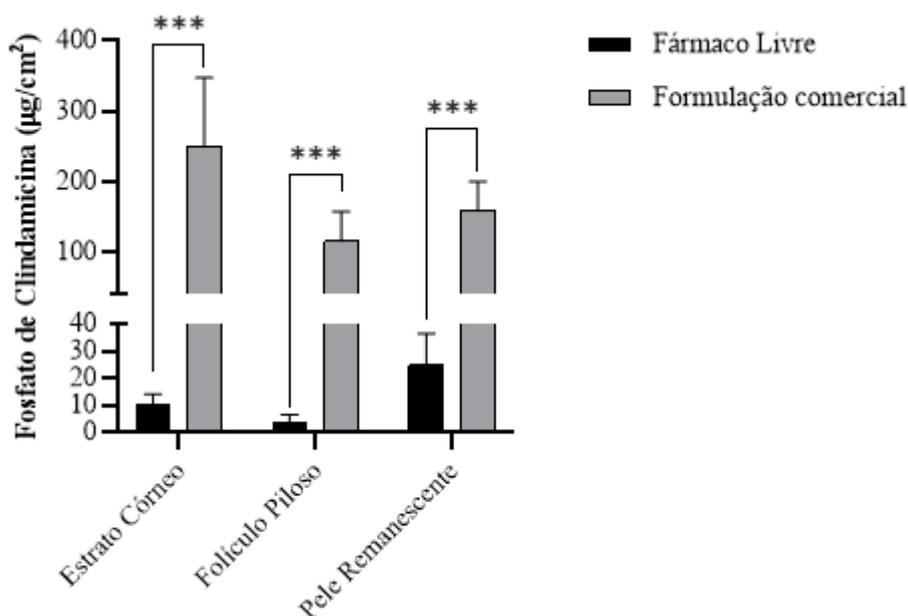


Figura 8. Quantidade permeada de fosfato de clindamicina na pele da orelha de suínos (***) $p > 0,05$).

Verificou-se que fosfato de clindamicina presente na formulação comercial (Adacne Clin[®]) penetrou a pele em quantidades significativamente maiores em comparação ao fármaco dissolvido em água. No estrato córneo a formulação comercial chegou a promover a penetração 25 vezes maior com relação ao controle. No foliculo piloso, o aumento foi de 34 vezes e, por fim, na pele remanescente esse aumento foi de 5 vezes.

Esse comportamento pode ser explicado pela presença de promotores de absorção na formulação comercial, como o propilenoglicol, que é um excipiente hidrocópico (MARTINS, VEIGA, 2002). Promotores de permeação são compostos químicos que interagem com constituintes da pele, mais especificamente o estrato córneo, diminuindo a resistência da pele à difusão do fármaco, promovendo uma melhor liberação do fármaco a partir de formulações, aumentam o fluxo de fármaco e a retenção da substancia ativa na pele, e aumentam a liberação tópica localizada do fármaco administrado por esta via (BARNES, 1989; BARRY, 1987). Exemplos de principais promotores de permeação são álcoois, como o propilenoglicol, e os ácidos graxos (MARTINS, VEIGA, 2002).

Um promotor de permeação ideal precisa ser, farmacologicamente inerte, não-tóxico, de ação imediata, não irritante, não-alérgico, química e fisicamente compatível com o fármaco e excipientes, inodoro, insípido, incolor, acessível e com boas propriedades solventes (HADGRAFT, 1999; SINHA, KAUR, 2000).

O método de penetração cutânea usado no estudo permitiu diferenciar tanto as quantidades de fármaco retidas em cada camada específica da pele (estrato córneo, folículo piloso e pele remanescente), quanto o efeito de diferentes formulações nessa penetração, por isso sendo considerado uma boa ferramenta para desenvolvimento e registro de formulações tópicas.

6 CONCLUSÃO

A metodologia analítica utilizando a técnica de CLAE para quantificar de maneira seletiva o fosfato de clindamicina extraído de camadas da pele demonstrou-se satisfatória, bem como o método de extração do fosfato de clindamicina que permeou na pele suína.

Já o estudo de penetração cutânea demonstrou que o fosfato de clindamicina em sua forma comercial (Adacne Clin[®]) permeou mais todas as camadas da pele quando comparados ao fármaco livre dissolvido em água. Essa é uma característica que ressalta a importância dos adjuvantes farmacotécnicos no desenvolvimento de uma formulação. Ressalta ainda a importância de se realizar esses tipos de ensaios que demonstram a ação do fármaco de maneira diferente dependendo da formulação utilizada, o que terá efeitos terapêuticos bastante diferentes.

REFERÊNCIAS

ANVISA. **Guia sobre requisitos de qualidade para produtos tópicos e transdérmicos**. Guia nº 20/2019, versão 2, 2019.

ARRUDA, Lúcia H. F. de; KODANI, Vanessa; BASTOS FILHO, Antonio; MAZZARO, Carla Bassanezi. Estudo clínico, prospectivo, aberto, randomizado e comparativo para avaliar a segurança e a eficácia da luz azul versus peróxido de benzoíla 5% no tratamento da acne inflamatória graus II e III. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 84, n. 5, p. 463-468, 2009. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1590/s0365-05962009000500003>>

BALBANI, Aracy Pereira Silveira; STELZER, Lucilena Bardella; MONTOVANI, Jair Cortez. Excipientes de medicamentos e as informações da bula. **Revista Brasileira de Otorrinolaringologia**, v. 72, n. 3, p. 400-406, 2006. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1590/s0034-72992006000300018>>

BARCAUI, Elisa de Oliveira; CARVALHO, Antonio Carlos Pires; PIÑEIRO-MACEIRA, Juan; BARCAUI, Carlos Baptista; MORAES, Heleno. Study of the skin anatomy with high-frequency (22 MHz) ultrasonography and histological correlation. **Radiologia Brasileira**, v. 48, n. 5, p. 324-329, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1590/0100-3984.2014.0028>>

BARNES, Howard A. **An Introduction to Rheology**: rheology series. Vol, 3. Amsterdã: Elsevier Science, 1989.

BARROS, Amanda Beatriz de; SARRUF, Fernanda Daud; FILETO, Marjory Bernardes; VELASCO, Maria Valéria Robles. Acne vulgar: aspectos gerais e atualizações no protocolo de tratamento. **BWS Journal**, p. 1-14, 2020.

BARRY, B.W. Mode of action of penetration enhancers in human skin. **Journal Of Controlled Release**, Elsevier BV, v. 6, n. 1, p. 85-97, 1987. Disponível em: <[http://dx.doi.org/10.1016/0168-3659\(87\)90066-6](http://dx.doi.org/10.1016/0168-3659(87)90066-6)>

BENNER, Nicholas; SAMMONS, Dawn. Overview of the treatment of acne vulgaris. *Osteopathic Family Physician*, v. 5, n. 5, p.185-190, set. 2013. **The American College of Osteopathic Family Physicians - ACOFP**. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.osfp.2013.03.003>>

BLANPAIN, Cédric; FUCHS, Elaine. Epidermal Stem Cells of the Skin. *Annual Review Of Cell And Developmental Biology*, v. 22, n. 1, p. 339-373, 2006. **Annual Reviews**. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1146/annurev.cellbio.22.010305.104357>>

BERNARDO, Ana Flávia Cunha. PELE: ALTERAÇÕES ANATÔMICAS E FISIOLÓGICAS DO NASCIMENTO À MATURIDADE. **Revista Saúde em Foco**, Minas Gerais, p. 1-13, 2019.

BRENNER, Fabiane Mulinari. **ACNE**: Um tratamento para cada paciente. *Rev. Ciênc. Méd.*, Campinas, vol 15(3):257-266, 2006.

BOUWSTRA, Joke A.; PONEC, Maria. The skin barrier in healthy and diseased state. **Biochimica Et Biophysica Acta (Bba) - Biomembranes**, v. 1758, n. 12, p. 2080-2095, 2006. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.bbamem.2006.06.021>>

BURIN, Rafael. Determinação de cálcio em produtos cárneos: validação de uma metodologia analítica para. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, p. 1-6, 2008.

BRASIL. RDC nº 166, de 24 de julho de 2017. **Institui o Código Civil**. Diário Oficial da União: seção 1, Brasília, DF, ano 139, n. 8, p. 1-74, 11 jan. 2002. Disponível em: <<http://www.portaaction.com.br/validacao-de-metodologia-analitica/11-rdc-16617-anvisa-resolucao-da-diretoria-colegiada>>

COSTA, Mardoqueu. **Estudo de viabilidade de um protótipo integrado para o diagnóstico e tratamento da acne por técnicas ópticas**. Tese (Doutorado em Ciências) - Escola de engenharia de São Carlos da Universidade de São Paulo. São Paulo, 2015.

COSTA, Adilson; ALCHORNE, Maurício Motta de Avelar; GOLDSCHMIDT, Maria Cristina Bezzan. Fatores etiopatogênicos da acne vulgar. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 83, n. 5, p. 451-459, out. 2008. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1590/s0365-05962008000500010>>

DHAWAN, V. K.; THADEPALLI, H. Clindamycin: a review of fifteen years of experience. *Clinical Infectious Diseases*, v. 4, n. 6, p. 1133-1153, 1982. Oxford University Press (OUP). Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1093/clinids/4.6.1133>>

FARMACOPEIA BRASILEIRA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária, Anvisa, 6ª Ed, 2019.

FDA. Validation of chromatographic methods. **Anal Instrum Handbook**, 3º Ed, p. 1015-33, 2004.

FIGUEIREDO, Américo; MASSA, António; PICOTO, António. Avaliação e tratamento do doente com acne - Parte I. **Revista Portuguesa de Clínica Geral**, v. 27, n. 1, p. 59-65, 1 jan. 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.32385/rpmgf.v27i1.10821>>

FILHO, JADER. **Ensaio farmacológico clínico de fases I e II com o Hidrogel Obtido a partir do extrato etanolólico bruto da casca de anacardium occidentale linn. o tratamento da Acne Vulgar**. Tese (Doutorado em Produtos naturais e Sintéticos Bioativos) - Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal da Paraíba: Paraíba, 2010.

GOLLNICK, H. P. M.. From new findings in acne pathogenesis to new approaches in treatment. **Journal Of The European Academy Of Dermatology And Venereology**, Wiley, v. 29, p. 1-7, jun. 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1111/jdv.13186>>

GRATIERI, Taís; GELFUSO, Guilherme Martins; LOPEZ, Renata Fonseca Vianna. Princípios básicos e aplicação da iontoforese na penetração cutânea de fármacos. **Química Nova**, v. 31, n. 6, p. 1490-1498, 2008. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1590/s0100-40422008000600040>>

GEMMELL, Curtis G.; PETERSON, Phillip K.; SCHMELING, David; KIM, Youngki; MATHEWS, John; WANNAMAKER, Lewis; QUIE, Paul G.. Potentiation of Opsonization and Phagocytosis of Streptococcus pyogenes following Growth in the Presence of Clindamycin. **Journal Of Clinical Investigation**, v. 67, n. 5, p. 1249-1256, 1981. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1172/jci110152>>

HADGRAFT, Jonathan. Passive enhancement strategies in topical and transdermal drug delivery. **International Journal Of Pharmaceutics**, Elsevier BV, v. 184, n. 1, p. 1-6, jul. 1999. [http://dx.doi.org/10.1016/s0378-5173\(99\)00095-2](http://dx.doi.org/10.1016/s0378-5173(99)00095-2).

HOOGDALAM, E.J.. Transdermal absorption of topical anti-acne agents in man; review of clinical pharmacokinetic data. **Journal Of The European Academy Of Dermatology And**

Venereology, v. 11, p. 13-19, 1998. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1111/j.1468-3083.1998.tb00902.x>>

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

KASTEN, Mary Jo. Clindamycin, Metronidazole, and Chloramphenicol. **Mayo Clinic Proceedings**, Elsevier BV, v. 74, n. 8, p. 825-833, ago. 1999. <http://dx.doi.org/10.4065/74.8.825>.

KERI, Jonette E. **Acne vulgar**. MANUAL MSD Versão para Profissionais de Saúde, University of Miami, Miller School of Medicine. Última modificação do conteúdo dez 2018. Disponível em: <<https://www.msmanuals.com/pt-br/profissional/dist%C3%BARbios-dermatol%C3%B3gicos/acne-e-doen%C3%A7as-relacionadas/acne-vulgar>>. Acesso em: 08 de mar. de 2021.

KLAINER, Albert S. Clindamycin. Medical Clinics Of North America, Elsevier BV, v. 71, n. 6, p. 1169-1175, 1987. Disponível em: <[http://dx.doi.org/10.1016/s0025-7125\(16\)30804-5](http://dx.doi.org/10.1016/s0025-7125(16)30804-5)>

KONG, Y. L.; TEY, H. L.. Treatment of Acne Vulgaris During Pregnancy and Lactation. *Drugs*, [s.l.], v. 73, n. 8, p.779-787, 2013. **Springer Science and Business Media LLC**. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1007/s40265-013-0060-0>>

LIMA, K. M. R.; DELAY, C. E. **Utilização do ácido salicílico no tratamento da acne.Tecnologia em Estética e Imagem Pessoal**. Universidade Tuiuti do Paraná CuritibaPR, 2015.

LOURENÇO, Ana Rita Nunes. **ADMINISTRAÇÃO TÓPICA DE FÁRMACOS**: das restrições aos desafios. 2013. 51 f. Monografia (Especialização) - Curso de Ciências Farmacêuticas, Escola de Ciências e Tecnologias da Saúde, Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias, Lisboa, 2013.

MADAN, Raman K.; LEVITT, Jacob. A review of toxicity from topical salicylic acid preparations. **Journal Of The American Academy Of Dermatology**, Elsevier BV, v. 70, n. 4, p.788-792, abr. 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jaad.2013.12.005>>

MARTINS, Maria Rita Fernandes Moraes; VEIGA, Francisco. Promotores de permeação para a liberação transdérmica de fármacos: uma nova aplicação para as ciclodextrinas. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, [S.L.], v. 38, n. 1, p. 33-54, mar. 2002. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1590/s1516-93322002000100004>>

MENDONÇA, R. da S. C., & Rodrigues, G. B. de O. **As principais alterações dermatológicas em pacientes obesos**. ABCD. Arquivos Brasileiros de Cirurgia Digestiva (São Paulo), 24(1), 68-73, 2001. Disponível em: <[doi:10.1590/s0102-67202011000100015](http://dx.doi.org/10.1590/s0102-67202011000100015)>

MEYNADIER, J.; ALIREZAI, M.. Systemic Antibiotics for Acne. *Dermatology*, [S.L.], v. 196, n. 1, p. 135-139, 1998. S. Karger AG. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1159/000017847>>

O'BRIEN, Sc O'brien; LEWIS Jb Lewis; CUNLIFFE. Wj Cunliffe. The Leeds revised acne grading system. **Journal of Dermatological Treatment**. 9 (4): 215-220, 1998.

PEREIRA, Maira N. et al. Development and validation of a simple chromatographic method for simultaneous determination of clindamycin phosphate and rifampicin in skin permeation studies. **Journal Of Pharmaceutical And Biomedical Analysis**, Elsevier BV, v. 159, p.331-340, set. 2018. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jpba.2018.07.007>>

PEREIRA, Maira N. ; MATOS, Breno N. ; GRATIERI, Tais ; CUNHA-FILHO, Marcilio; GELFUSO, Guilherme M. Development and validation of a simple chromatographic method for simultaneous determination of clindamycin phosphate and rifampicin in skin permeation studies. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 159, p. 331-340, 2018.

RIBEIRO, Beatriz de Medeiros; FOLLADOR, Ivonise; COSTA, Adilson; FRANCESCONI, Fábio; NEVES, Juliane Rocio; ALMEIDA, Luiz Maurício Costa. Acne in adult women: a review for the daily clinical practice. **Surgical & Cosmetic Dermatology**, Genesis Network, v. 7, n. 3, p. 1-10, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.5935/scd1984-8773.2015731680>>

RODRIGUES, Fabiana Marques; LEITE, Ricardo Silveira; YOSHIDA, Edson Hideaki; CARNEIRO, Heverson Felipe Pranches, SANTOS, Nathalia Serafim dos. Tratamento Dermatológico da Acne Vulgar. **Revista Saúde em Foco**, Edição nº 11, 2019.

SATO, Mayumi Eliza Otsuka; GOMARA, Fernanda; PONTAROLO, Roberto; ANDREAZZA, Itamar Francisco; ZARONI, Mariella. Permeação cutânea in vitro do ácido kójico. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 43, n. 2, p. 195-203, jun. 2007. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1590/s1516-93322007000200005>>

SILVA, James Almada da; APOLINÁRIO JUNIOR, Antonio Lopes; SOUZA; DAMASCENO, Bolívar; MEDEIROS, Ana Claudia Dantas de. Administração cutânea de fármacos: desafios e estratégias para o desenvolvimento de formulações transdérmicas. **Rev. Ciênc. Farm. Básica Apl**, Paraíba, p. 1-8, 2010.

SIMONART, Thierry. Immunotherapy for Acne Vulgaris: Current Status and Future Directions. **American Journal Of Clinical Dermatology**, v. 14, n. 6, p.429-435, 2013. **Springer Science and Business Media LLC**. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1007/s40257-013-0042-8>>

SINHA, V. R.; KAUR, Maninder Pal. Permeation Enhancers for Transdermal Drug Delivery. **Drug Development And Industrial Pharmacy**, v. 26, n. 11, p. 1131-1140, jan. 2000. Informa UK Limited. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1081/ddc-100100984>>

STENN, K. S.; PAUS, R.. Controls of Hair Follicle Cycling. **Physiological Reviews**, [S.L.], v. 81, n. 1, p. 449-494, 1 jan. 2001. **American Physiological Society**. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1152/physrev.2001.81.1.449>>

SUNDBERG, John P.; NANNEY, Lillian B.; FLECKMAN, Philip; KING, Lloyd E.. Skin and Adnexa. **Comparative Anatomy And Histology**, Elsevier BV, p. 433-455, 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/b978-0-12-381361-9.00023-8>>

TEICHMANN, Alexa; JACOBI, Ute; OSSADNIK, Michael; RICHTER, Heike; KOCH, Stefan; STERRY, Wolfram; LADEMANN, Jürgen. Differential Stripping: determination of the amount of topically applied substances penetrated into the hair follicles. **Journal Of Investigative Dermatology**, Wiley, v. 125, n. 2, p. 264-269, ago. 2005. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1111/j.0022-202x.2005.23779.x>>

TOLENTINO, Seila; PEREIRA, Maira N.; CUNHA-FILHO, Marcilio; GRATIERI, Tais; GELFUSO, Guilherme M.. Targeted clindamycin delivery to pilosebaceous units by chitosan or hyaluronic acid nanoparticles for improved topical treatment of acne vulgaris. **Carbohydrate Polymers**, Elsevier BV, v. 253, 2021. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.carbpol.2020.117295>>

U.S. DEPARTMENT OF HEALTH AND HUMAN SERVICES FOOD AND DRUG ADMINISTRATION CENTER FOR DRUG EVALUATION AND RESEARCH (CDER). **Maximal Usage Trials for Topically Applied Active Ingredients Being Considered for Inclusion in an Over-The-Counter Monograph: Study Elements and Considerations: Guidance for Industry. Clinical Pharmacology/Over-the-Counter (OTC)**, 2019.

USP. Clindamycin Phosphate. Official monographs USP 40. United States Pharmacop, 2018.

VYAS, A.; SONKER, A. K.; GIDWANI, B. Carrier-Based drug delivery system for treatment of acne. **The Scientific World Journal**. p.1-14, 2014.

WEBSTER, G. F. Inflammation in acne vulgaris. **Journal of the American Academy of Dermatology**, 33(2), 247–253, 1995. Disponível em: <doi:10.1016/0190-9622(95)902>