



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA

Faculdade de Ciências da Saúde

PAULA MARTINS DE OLIVEIRA

NANOCARREADORES LIPÍDICOS CONTENDO
MINOXIDIL E LATANOPROSTA PARA O TRATAMENTO TÓPICO DA
ALOPECIA ANDROGÊNICA

Brasília

2020

Paula Martins de Oliveira

Nanocarreadores lipídicos contendo minoxidil e latanoprostá para o tratamento tópicó da alopecia androgênica

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

Orientador: Prof. Dr. Guilherme Martins Gelfuso

Co-orientadora: Prof. Dr^a. Taís Gratieri

Brasília

2020

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.

Ficha catalográfica elaborada automaticamente,
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

OM386n Oliveira, Paula Martins
Nanocarreadores lipídicos contendo minoxidil e
latanoprostá para o tratamento tópico da alopecia
androgênica / Paula Martins Oliveira; orientador Guilherme
Martins Gelfuso; co-orientador Tais Gratieri. -- Brasília,
2020.
112 p.

Tese (Doutorado - Doutorado em Ciências Farmacêuticas) -
Universidade de Brasília, 2020.

1. Minoxidil e Latanoprostá. 2. Alopecia. 3.
Nanocarreadores lipídicos. 4. Método bioanalítico LC-MS. 5.
Penetração cutânea. I. Gelfuso, Guilherme Martins, orient.
II. Gratieri, Tais, co-orient. III. Título.

Paula Martins de Oliveira

Título: Nanocarreadores lipídicos contendo minoxidil e latanoprosta para o tratamento tópico da alopecia androgênica

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

Aprovada em 22 de dezembro de 2020.

Banca examinadora

Prof. Dr. Guilherme Martins Gelfuso
Faculdade de Ciências da Saúde – Universidade de Brasília

Prof^a. Dr^a. Maria de Fátima Borin
Faculdade de Ciências da Saúde – Universidade de Brasília

Prof^a. Dr^a. Márcia Renata Mortari
Instituto de Biologia – Universidade de Brasília

Dr. Samuel Vidal Mussi
Laboratório NILE – Aché Laboratórios Farmacêuticos

AGRADECIMENTOS

Antes e primeiro de tudo agradeço a **Deus** pelas incontáveis bênçãos em minha vida. Por tudo o que sou, por tudo o que tenho e por todos que me cercam, eu dou graças! O poder do amor, a força e a energia que Ele nos dá, é, sem dúvidas, o meu maior combustível para contribuir com um mundo melhor.

Aos meus pais, **Paulo César** e **Regina**, que são meu suporte, meu amparo e meu porto mais do que seguro. A minha irmã, **Juliana**, obrigada por me escutar, por se orgulhar da minha caminhada e por me motivar a seguir em frente. Ao meu parceiro de todas as horas, **Rafael**, obrigada por tanto amor, cuidado e carinho, por me ouvir, me dar colo e me incentivar a ser melhor. Obrigada por aguentarem minhas oscilações de humor, principalmente, na reta final do doutorado.

A toda **minha família** – **cunhado, vô e vó, tias e tios, primas e primos, afilhadas, e cães** – sou muito grata por pertencer a eles que sempre me acolhem e me proporcionam momentos revigorantes. As minhas **amigas** e aos meus **amigos**, obrigada por exaltarem meu esforço e por se orgulharem tanto desta amiga doutoranda. Obrigada por fazerem minha vida mais leve e feliz!

Ao meu “pai científico”, meu orientador **Guilherme Martins Gelfuso**, obrigada pela oportunidade. Obrigada por acreditar na minha capacidade mesmo quando eu não acreditava ser capaz. Obrigada por todos os conhecimentos compartilhados, por tanto aprendizado e por todos os momentos divididos: desde as reuniões profissionais até as conversas sobre seriados que acompanharam nossos açaís.

A todos meus colegas de laboratório o meu muitíssimo obrigada. Cada um teve seu papel fundamental nesse trabalho, com certeza ele não estaria completo se não fosse a ajuda de vocês. Depois de seis anos no LTMAC, muitos dos colegas de bancada se tornaram amigos e, mesmo aqueles que não estão no meu dia a dia, se fazem presente de alguma forma e me ajudaram sempre que precisei. Obrigada: ao **Breno Noronha** pela amizade e companheirismo em todos os momentos da vida; ao **Thiago Rosa** por sua valiosíssima contribuição com o LC-MS; ao **Felipe Queiroz** por seu fundamental auxílio com a análise térmica e com toda parte gráfica; a **Giselly Almeida** por me ensinar a arte dos nanocarreadores e dividir vários momentos inesquecíveis comigo; ao **Fernando Sá** por me salvar e ajudar a resolver todos os perrengues possíveis; ao **Ricardo Ferreira** e a

Wanessa Quintão porque juntos pensamos muitíssimo melhor; a **Ana Clara Brathwaite** por dividir a responsabilidade do LC-MS comigo; a **Letícia Castro** pela oportunidade que eu tive de aprender a ensinar; a **Tamara Ângelo, Lorena Malaquias, Thaiene Reis** e **Maíra Teixeira** pelas conversas reconfortantes e pelos incontáveis momentos juntas; a **Ludmila Alvim** por sua disponibilidade e pela nossa incrível viagem ao congresso; a **Ana Luíza Lima** e **Jéssika Rocha** pelo lindo gesto de fé e carinho; a **Geisa Barbalho, Camila Oliveira, Maíra Nunes, Seila Tolentino, Ana Christina Oliveira, Luma de Lira, Stephania Graziani** e **Natane Duarte**. Agradeço especialmente ao professor **Marcílio Cunha** e a professora **Taís Gratieri** pelas valiosas contribuições e por sempre estarem dispostos a nos ajudar da melhor maneira que podem.

A **Universidade de Brasília**, minha segunda casa nos últimos 11 anos, pela oportunidade de aperfeiçoamento e crescimento pessoal e profissional. A **Capes**, pela concessão da bolsa de estudos e ao **CNPq** pelo suporte financeiro ao projeto. A professora **Juliana Lott** e a **Thuany Alencar** pelos estudos de atividade biológica. Ao **João Victor** e as professoras **Yris Bazzo** e **Pérola Magalhães** do Laboratório Controle de Qualidade e Produtos Naturais – FS/UnB. A professora **Sônia Bão**, a **Ingrid**, ao **Matheus** e todo pessoal do Laboratório de Microscopia e Microanálise – IB/UnB.

Ao laboratório **Aché** pela doação do fármaco que foi de fundamental importância para o estudo, ao frigorífico **Sabugy** pelo fornecimento das orelhas de porco e a granja **Avifran** pelos ovos de galinha embrionados.

Aos membros da banca, **Fátima Borin, Márcia Mortari** e **Samuel Mussi**, por aceitarem o convite para participar da defesa e contribuírem com meu trabalho.

RESUMO

OLIVEIRA, Paula Martins. Nanocarreadores lipídicos contendo minoxidil e latanoprostá para o tratamento tóxico da alopecia androgênica. Brasília, 2020. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas) – Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade de Brasília, Brasília, 2020.

A alopecia androgênica é uma doença decorrente de alterações no ciclo de crescimento capilar que afeta a ambos os sexos. Atualmente, os fármacos aprovados para o tratamento necessitam de administrações frequentes e ininterruptas. A toxicidade de formulações tóxicas de uso contínuo e alguns efeitos adversos sistêmicos importantes levam a uma redução na adesão dos pacientes a essas terapias, justificando a busca por novas alternativas terapêuticas mais seguras e efetivas. O trabalho objetivou o desenvolvimento e caracterização de uma formulação baseada em nanocarreadores lipídicos encapsulando uma associação de latanoprostá e minoxidil como uma alternativa efetiva para o tratamento tóxico da alopecia. Um método bioanalítico para quantificação concomitante dos fármacos na presença de interferentes de pele utilizando cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas (LC-MS) foi desenvolvido e validado mostrando-se seletivo, sensível, linear, preciso e exato, sendo capaz de analisar os fármacos recuperados das camadas da pele com efetividade e apresentando taxas de recuperação dos fármacos superiores a 70%. As amostras demonstram estabilidade analítica por pelo menos 30 dias em geladeira mesmo na presença dos interferentes. Após ensaios de análise térmica por DTA (análise térmica diferencial) e TGA (análise termogravimétrica) e avaliação de FTIR (espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier) os fármacos demonstraram compatibilidade química entre si. Os nanocarreadores lipídicos desenvolvidos encapsularam de forma eficiente ambos os fármacos (86,9% para o MXS e de 99,9% para a LAT) e apresentaram características de diâmetro de partículas ($393,5 \pm 36,0$ nm), potencial zeta ($+22,5 \pm 0,2$ mV) e morfologia apropriadas para uma aplicação tóxico visando ao seu acúmulo nos folículos pilosos. A nanoformulação apresentou pH compatível com a pele ($6,4 \pm 0,2$), demonstrou estabilidade sob refrigeração por pelo menos 90 dias e não se mostrou irritante nos ensaios de HET-CAM e de epiderme humana reconstruída. O perfil de liberação *in vitro* dos fármacos mostrou um retardo da liberação de ambos os fármacos pelos nanocarreadores, comparado ao controle, sendo que a latanoprostá levou mais tempo que o minoxidil para deixar a nanoestrutura. A avaliação *in vitro* da penetração cutânea dos fármacos mostrou que os nanocarreadores foram capazes de direcionar a liberação de ambos os fármacos para folículos pilosos, aumentando de 2 a 3 vezes o acúmulo dos fármacos na matriz folicular após 24 h de tratamento, e reduzindo a quantidade dos fármacos retidos nas outras camadas da pele. Os resultados indicam, portanto, que os nanocarreadores lipídicos são uma alternativa promissora para melhorar o tratamento tóxico da alopecia androgênica.

Palavras-chave: Minoxidil, Latanoprostá, Método bioanalítico, LC-MS, Nanocarreadores lipídicos, Penetração cutânea, Folículos pilosos, Alopecia.

ABSTRACT

OLIVEIRA, Paula Martins. Nanocarreadores lipídicos contendo minoxidil e latanoprost para o tratamento tópico da alopecia androgênica. Brasília, 2020. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas) – Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade de Brasília, Brasília, 2020.

Androgenic alopecia is a disease that occurs due to changes in the hair growth cycle and affects both sexes. Drugs currently approved for treatment require frequent and uninterrupted administration. Toxicity of topical formulations for continuous use and some important systemic adverse effects lead to a reduction in patient's adherence to therapies, justifying the search for new safer and more effective therapeutic alternatives. The work aimed the development and characterization of a formulation based on lipid nanocarriers encapsulating latanoprost and minoxidil in association as an effective alternative for topical treatment of alopecia. A bioanalytical method for simultaneous quantification of drugs in the presence of skin interferences using liquid chromatography coupled with mass spectrometry (LC-MS) has been developed and validated showing selective, sensitive, linear, precise and accurate, being able to analyze the drugs recovered from the skin layers effectively (drug recovery rates above 70%). The samples demonstrate analytical stability for at least 30 days in refrigerator, even in the interferences presence. After thermal analysis using DTA (differential thermal analysis) and TGA (thermogravimetric analysis) and FTIR (Fourier transform infrared spectroscopy) evaluation, drugs demonstrated chemical compatibility. Lipid nanocarriers efficiently encapsulated both drugs (86.9% for MXS and 99.9% for LAT) and had characteristics of particle diameter (393.5 ± 36.0 nm), zeta potential ($+22.5 \pm 0.2$ mV) and appropriate morphology for topical application aiming their accumulation in hair follicles. The nanoformulation showed a pH compatible with skin (6.4 ± 0.2), demonstrated stability under refrigeration for at least 90 days, and was not irritating in the HET-CAM and reconstructed human epidermis assays. The in vitro release profile of the drugs showed a delay in the release of both drugs by the nanocarriers, compared to the control, with latanoprost taking longer than minoxidil to leave the nanostructure. The in vitro evaluation of the cutaneous penetration of the drugs showed that the nanocarriers were able to direct the release of both drugs to hair follicles, increasing the drug accumulation in the follicular matrix by 2 to 3 times after 24 hours of treatment, and reducing the quantity of drugs retained in the other layers of the skin. The results therefore indicate that lipid nanocarriers are a promising alternative to improve the topical treatment of androgenic alopecia.

Keywords: Minoxidil, Latanoprost, Bioanalytical method, LC-MS, Lipid nanocarriers, Skin penetration, Hair follicles, Alopecia.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1:** Esquema mostrando as camadas da pele - epiderme, derme e hipoderme e as outras estruturas que a compõe. Fonte: adaptado de <https://afh.bio.br/sistemas/tegumentar/1.php>..... 3
- Figura 2:** Estrutura básica da pele com as camadas da epiderme: estrato córneo, camada lúcida, camada granulosa, camada espinhosa, camada basal. Fonte: adaptado de (SHARMA et al., 2017)..... 4
- Figura 3:** Vias de penetração através do estrato córneo: (A) via transcelular, (B) via intercelular, e as vias anexos cutâneos: (C) folículo piloso e glândula sebácea, (D) glândula sudorípara. Fonte: adaptado de (SHAKER et al., 2019)..... 5
- Figura 4:** (A) estrutura histológica da unidade pilossebácea e do folículo piloso e (B) estrutura da haste capilar e suas principais camadas: cutícula, córtex e medula. Fonte: adaptado de <https://www.markbirchhair.com/about-hair/>..... 6
- Figura 5:** Fases de crescimento dos cabelos. Fonte: adaptado de <https://www.markbirchhair.com/about-hair/>..... 7
- Figura 6:** Estrutura química do minoxidil sulfato; $pK_a = 4,6$ (MATOS et al., 2017); $\log P = 0,44$ (PADOIS et al., 2011)..... 12
- Figura 7:** Estrutura química da latanoprosta; $pK_a = 4,88$ (DIGIUNI; FOGAGNOLO; ROSSETTI, 2012); $\log P = 4,28$ (RODRIGUEZ-ALLER et al., 2015)..... 13
- Figura 8:** Estrutura dos (A) nanocarreadores lipídicos e das (B) nanopartículas lipídicas sólidas. 18
- Figura 9:** Retirada da pele da orelha suína para ser usada em ensaios de permeação. Fonte: adaptado ÂNGELO, 2018. 23
- Figura 10:** Esquema representativo da técnica de tape stripping diferencial (A) e fotografias (B) da técnica de tape stripping. Dez fitas adesivas foram utilizadas para remover o estrato córneo (1). O conteúdo do folículo piloso foi removido com o auxílio de cola de cianoacrilato e fita adesiva (2-4). A pele remanescente foi obtida após as bordas da área delimitada serem cortadas. Fonte: ÂNGELO, 2018. 24
- Figura 11:** Esquema representativo do processo de preparação dos extratos de pele. Depois da limpeza da pele de porco, a técnica de tape stripping diferencial foi empregada, resultando na separação das três camadas da pele: estrato córneo (EC), folículo piloso (FP) e pele remanescente (PR). Após o processo de separação cada matriz foi

| | |
|---|----|
| acondicionada em um frasco contendo metanol para que fosse feita a extração. Ao final, os extratos obtidos foram armazenados em geladeira. | 24 |
| Figura 12: Ovo de galinha embrionado no décimo dia de incubação depois da remoção da casca para visualização da membrana corioalantoide. Fonte: https://grupoinvestiga.com/ | 25 |
| Figura 13: Gráfico demonstrando a variação de concentração de água com 0,1% de ácido fórmico (linha tracejada) e de acetonitrila com 0,1% de ácido fórmico (linha contínua) ao longo do tempo de eluição dos fármacos minoxidil e latanoprostá por gradiente em LC-MS. | 27 |
| Figura 14: Ovo de galinha embrionado no décimo dia de incubação depois da remoção da casca para visualização da membrana corioalantoide. Fonte: (QUINTÃO, 2018). .. | 35 |
| Figura 15: Célula de difusão modificada do tipo Franz montada com membrana sintética separando o compartimento doador do receptor para realização dos ensaios in vitro de liberação em banho aquecido com termostato..... | 38 |
| Figura 16: Células de difusão modificada do tipo Franz a pele de orelha de porco separando o compartimento doador do receptor para realização do ensaio in vitro de penetração cutânea em banho aquecido com termostato..... | 39 |
| Figura 17: (A) Cromatogramas obtidos após análise do minoxidil em modo SIM para seu íon principal (m/z 210,10) e (B) seu fragmento (m/z 193,1), com tempo de retenção de 6,4 minutos. (C) Cromatogramas obtidos após análise da latanoprostá em modo SIM para seu íon principal (m/z 433,3) e (D) para seu fragmento (m/z 397,3), respectivamente, com tempo de retenção de 11,8 minutos. (E) Cromatograma total obtido em modo TIC para os dois fármacos eluídos em uma mesma corrida. SIM – selected ion mode; TIC – total ion chromatogram..... | 44 |
| Figura 18: (A) Espectro de massas do minoxidil sulfato e (B) da latanoprostá. Os espectros de massas foram obtidos após ionização das amostras em modo positivo por eletrospray. Nas figuras estão representados os principais picos em obtidos após a análise dos fármacos em modo de varredura para verificação dos principais sinais..... | 45 |
| Figura 19: Esquema representando a sobreposição dos cromatogramas da injeção das amostras contendo os interferentes isolados (brancos) e dos fármacos em solvente: (A) minoxidil (m/z 210,1) e (B) latanoprostá (m/z 433,3). MXS – minoxidil; LAT – latanoprostá; EC – estrato córneo; FP – folículo piloso; PR – pele remanescente..... | 46 |
| Figura 20: Curvas analíticas em metanol obtidas pela análise de uma triplicata. (A) Minoxidil sulfato na faixa de concentração de 0,05 a 1,0 µg/mL; equação da reta: y = | |

| | |
|--|----|
| 3.032.329,17x + 76.612,68; $r^2 = 0,9990$. (B) Latanoprosta na faixa de concentração de 0,1 a 5,0 $\mu\text{g/mL}$; equação da reta: $y = 172370x + 6637,1$; $r^2 = 0,9994$ | 47 |
| Figura 21: Correspondência entre as curvas em metanol (solvente) e as curvas em solução metanólica contaminadas com as camadas da pele para ambos os fármacos, realizadas em triplicata. (A) Minoxidil sulfato - Equação da reta: $y = 3.091.586,83x + 84.843,82$; $r^2 0,995$ para EC; Equação da reta: $y = 3.163.276,40x + 60.063,3$; $r^2 0,9975$ para FP; Equação da reta: $y = 2.971.917,34x + 168.122,51$; $r^2 0,9930$ para PR. (B) Latanoprosta - Equação da reta: $y = 190358x + 6940,3$; $r^2 0,9978$ para EC; Equação da reta: $y = 208000x + 15736$; $r^2 0,9993$ para FP; Equação da reta: $y = 181124x + 16128$; $r^2 0,9969$ para PR. EC: estrato córneo; FP: folículo piloso; PR: pele remanescente..... | 48 |
| Figura 22: Correspondência entre as curvas analíticas no solvente e na solução tampão (pH 7,4 com 2,5% de Tween 80), realizadas em triplicata, para ambos os fármacos. (A) Minoxidil sulfato - Equação da reta: $y = 1.004.515,08x + 118.041,56$; $r^2 0,9995$. (B) Latanoprosta - Equação da reta: $y = 70229x + 20925$; $r^2 0,9971$ | 50 |
| Figura 23: Termogramas de DTA (análise térmica diferencial) obtidos durante a análise dos fármacos minoxidil (MXS) e latanoprosta (LAT) sozinhos ou em mistura física (MXS + LAT) com destaque para os eventos térmicos que ocorreram. | 57 |
| Figura 24: Primeira derivada das análises termogravimétricas (TGA) dos fármacos minoxidil (MXS) e latanoprosta (LAT) isoladamente ou em mistura física (MXS + LAT) com destaque para os eventos térmicos que ocorreram durante as análises..... | 59 |
| Figura 25: Espectros de FTIR (espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier) e estruturas químicas dos fármacos minoxidil (MXS) e latanoprosta (LAT) sozinhos ou em mistura física (MXS+LAT). | 60 |
| Figura 26: Formulação contendo nanocarreadores lipídicos com minoxidil e latanoprosta..... | 63 |
| Figura 27: Imagens obtidas por microscopia eletrônica de varredura (MEV) dos nanocarreadores lipídicos vazios (A e B) e com minoxidil e latanoprosta (C e D). Aumento de 4.000 a 20.000 vezes. | 66 |
| Figura 28: Imagens obtidas por microscopia eletrônica de transmissão (MET) dos nanocarreadores lipídicos vazios (A) e com minoxidil e latanoprosta (B). Aumento de 6.000 vezes. | 66 |
| Figura 30: Imagem com fotos que mostram os efeitos observados para estabelecer o índice de irritabilidade dos nanocarreadores lipídicos contendo minoxidil e latanoprosta | |

| | |
|---|----|
| (CLN) e dos controles negativo (NaCl 0,9%) e positivo (NaOH 1M) após 30 segundos, 2 minutos e 5 minutos de ensaio HET-CAM. | 70 |
| Figura 31: Viabilidade celular (%) obtida a partir de testes de potencial irritativo em epiderme humana reconstruída após tratamento com SDS 5% (controle positivo), solução salina 0,9% (controle negativo) e nanocarreadores lipídicos contendo minoxidil e latanoprosta (CLN). Resultados apresentados como médias \pm desvio padrão; n = 3..... | 72 |
| Figura 32: Perfis de liberação do minoxidil (A) e da latanoprosta (B) a partir dos nanocarreadores lipídicos (CLN) em comparação ao controle com a mesma concentração dos fármacos livres em solução; n = 4. Resultados apresentados como média \pm desvio padrão. | 75 |
| Figura 33: Quantificação de (A) minoxidil e de (B) latanoprosta após ensaios in vitro de penetração cutânea de 24h em células de Franz. Resultados apresentados como média \pm desvio padrão; n = 5. CLN: nanocarreadores lipídicos; Controle: solução aquosa com 2% de minoxidil e 0,05% de latanoprosta; (#) não foi detectada latanoprosta na pele remanescente. | 77 |
| Figura 34: Resultados da quantificação de (A) minoxidil e de (B) latanoprosta recuperados após 24h de ensaios in vitro de permeação cutânea (com e sem massagem prévia) a partir da formulação contendo os nanocarreadores lipídicos. Resultados apresentados como média \pm desvio padrão; n = 5. (#) não foi detectada latanoprosta na pele remanescente..... | 81 |

LISTA DE TABELAS

| | |
|--|----|
| Tabela 1: Parâmetros obtidos para a eluição dos fármacos minoxidil e latanoprostá por gradiente em LC-MS. Fase móvel A = água ultrapura com 0,1% de ácido fórmico; Fase móvel B = acetonitrila com 0,1% de ácido fórmico..... | 26 |
| Tabela 2: Escala para teste de HET-CAM conforme efeitos observados ao longo de 5 minutos (LUEPKE, 1985)..... | 35 |
| Tabela 3: Classificação final das formulações quanto ao seu potencial de irritabilidade HET-CAM (LUEPKE, 1985)..... | 36 |
| Tabela 4: Valores obtidos após cálculo para verificação do efeito matriz (Ef) em presença dos contaminantes (EC, FP, PR e solução tampão) para os fármacos de interesse minoxidil (MXS) e latanoprostá (LAT) nas diferentes matrizes. EC: estrato córneo; FP: folículo piloso; PR: pele remanescente..... | 49 |
| Tabela 5: Valores obtidos dos limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) para o minoxidil e latanoprostá nos diferentes meios. EC: estrato córneo; FP: folículo piloso; PR: pele remanescente..... | 51 |
| Tabela 6: Valores de precisão obtidos após análise da repetibilidade e da precisão intermediária do método bioanalítico. DP: desvio padrão; CV: coeficiente de variação; DP: desvio padrão; EC: estrato córneo; FP: folículo piloso; PR: pele remanescente..... | 53 |
| Tabela 7: Valores de recuperação de minoxidil sulfato (MXS) e latanoprostá (LAT) quantificadas nas diferentes camadas da pele (EC, FP e PR) por extração overnight com metanol..... | 54 |
| Tabela 8: Estabilidade do minoxidil e da latanoprostá em amostras armazenadas em geladeira ($\pm 4^{\circ}$ C) por até 30 dias após o preparo em diferentes meios para avaliar a estabilidade analítica. Meios: solvente metanol; EC – estrato córneo, FP – folículo piloso; PR – pele remanescente; solução tampão fosfato..... | 55 |
| Tabela 9: Caracterização dos nanocarreadores lipídicos contendo minoxidil (MXS) e latanoprostá (LAT) durante 90 dias para determinar a estabilidade. PdI: índice de polidispersividade..... | 68 |
| Tabela 10: Solubilidade do minoxidil (MXS) e da latanoprostá (LAT) em solução tampão fosfato 0,1M (pH 7.4) com diferentes quantidades de Tween 80 [®] (m/v) – massa/volume..... | 74 |
| Tabela 11: Valores do fator de direcionamento dos fármacos para os folículos pilosos após 24 h de ensaio in vitro de penetração cutânea da formulação contendo os nanocarreadores lipídicos (CLN) e do controle solução aquosa com 2% de minoxidil e 0,05% de latanoprostá..... | 79 |
| Tabela 12: Valores do fator de direcionamento dos fármacos para os folículos pilosos após 24 h de ensaio in vitro de penetração cutânea (sem e com massagem) da formulação contendo os nanocarreadores lipídicos (CLN) e do controle com solução aquosa com 2% de minoxidil e 0,05% de latanoprostá..... | 82 |

LISTA DE ABREVIações

(m/v) – massa/volume

(m/z) – razão massa-carga

(v/v) – volume/volume

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária

CLN – nanocarreadores lipídicos

CPC – cloreto de cetilpiridínio

DTA – análise térmica diferencial

EC – estrato córneo

EE – eficiência de encapsulação

FDA – *Food and Drug Administration*

FP – folículo piloso

FTIR – espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (do inglês, *Fourier transform infrared spectroscopy*)

HET-CAM – ensaio teste da membrana corioalantoide de ovos de galinha (do inglês, *hen's egg-chorioallantoic membrane test*)

HPLC – cromatografia líquida de alta eficiência (do inglês: *High Performance Liquid Chromatography*)

ICH – *International Conference of Harmonization*

LAT – latanoprostá

LC-MS – cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas (do inglês, *liquid chromatography mass spectrometry*)

LD – limite de detecção

LQ – limite de quantificação

MET – microscopia eletrônica de transmissão

MTT – brometo de 3-[4,5-dimetil-tiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio

MXS – minoxidil sulfato

OECD – *Organisation for Economic Cooperation and Development*

PdI – índice de polidispersividade (do inglês, *Polydispersity Index*)

PR – pele remanescente

SDS – dodecil sulfato de sódio

SIM – modo de íon selecionado (do inglês, *selected ion mode*)

TGA – análise termogravimétrica

TIC – cromatograma de íon total (do inglês, *total ion chromatogram*)

SUMÁRIO

| | |
|---|-----------|
| 1. INTRODUÇÃO | 1 |
| 2. REVISÃO DA LITERATURA | 3 |
| 2.1. A PELE E OS CABELOS | 3 |
| 2.2. ALOPECIA | 7 |
| 2.3. TRATAMENTOS | 9 |
| 2.3.1. Minoxidil | 10 |
| 2.3.2. Latanoprostá | 12 |
| 2.4. NANOTECNOLOGIA NO TRATAMENTO TÓPICO DA ALOPECIA | 16 |
| 2.4.1. Nanocarreadores lipídicos | 17 |
| 3. OBJETIVOS | 21 |
| 3.1. OBJETIVO GERAL | 21 |
| 3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS | 21 |
| 4. MATERIAL | 22 |
| 4.1. Fármacos e padrões analíticos | 22 |
| 4.2. Solventes..... | 22 |
| 4.3. Outros insumos | 22 |
| 4.4. Pele | 23 |
| 4.4.1. Orelha de porco | 23 |
| 4.4.2. Separação das camadas da pele | 23 |
| 4.4.3. Preparo dos extratos das camadas da pele | 24 |
| 4.5. Ovos de galinha embrionados..... | 24 |
| 5. METODOLOGIA..... | 26 |
| 5.1. MÉTODO ANALÍTICO | 26 |
| 5.1.1. Parâmetros cromatográficos | 26 |
| 5.1.2. Preparo das soluções estoque | 27 |
| 5.2. VALIDAÇÃO DO MÉTODO BIOANALÍTICO | 27 |
| 5.2.2. Linearidade | 28 |
| 5.2.3. Limites de detecção e de quantificação | 29 |
| 5.2.4. Precisão..... | 29 |
| 5.2.5. Exatidão | 30 |
| 5.2.6. Estabilidade analítica | 31 |
| 5.3. ESTUDO DE COMPATIBILIDADE ENTRE OS FÁRMACOS | 31 |
| 5.3.1. Análise térmica | 31 |
| 5.3.2. Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR).. | 31 |
| 5.4. OBTENÇÃO DOS NANOCARREADORES LIPÍDICOS | 32 |
| 5.5. CARACTERIZAÇÃO DOS NANOCARREADORES LIPÍDICOS..... | 32 |

| | | |
|-----------|--|-----------|
| 5.5.1. | Distribuição de tamanho de partícula | 32 |
| 5.5.2. | Potencial zeta | 32 |
| 5.5.3. | Eficiência de encapsulação | 33 |
| 5.5.4. | Morfologia | 33 |
| 5.5.5. | Análise de pH | 34 |
| 5.6. | ESTUDOS DE ESTABILIDADE | 34 |
| 5.7. | ESTUDO DO POTENCIAL IRRITATIVO DA NANOFORMULAÇÃO | 34 |
| 5.7.1. | Ensaio HET-CAM | 34 |
| 5.7.2. | Ensaio com epiderme humana reconstruída | 36 |
| 5.8. | ESTUDOS <i>IN VITRO</i> DE LIBERAÇÃO | 37 |
| 5.8.1. | Seleção do meio receptor | 37 |
| 5.8.2. | Ensaio <i>in vitro</i> de liberação dos fármacos | 37 |
| 5.9. | ESTUDOS <i>IN VITRO</i> DE PENETRAÇÃO CUTÂNEA | 38 |
| 5.10. | ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS DADOS | 40 |
| 6. | RESULTADOS E DISCUSSÃO | 41 |
| 6.1. | DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DO MÉTODO ANALÍTICO | 41 |
| 6.1.1. | Seletividade | 43 |
| 6.1.2. | Linearidade | 46 |
| 6.1.3. | Limites de detecção e quantificação | 50 |
| 6.1.4. | Precisão | 51 |
| 6.1.5. | Exatidão | 54 |
| 6.1.6. | Estabilidade analítica | 55 |
| 6.2. | AVALIAÇÃO DA COMPATIBILIDADE ENTRE OS FÁRMACOS | 56 |
| 6.2.1. | Análise térmica | 56 |
| 6.2.2. | FTIR | 59 |
| 6.3. | OBTENÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DA FORMULAÇÃO CONTENDO OS NANOCARREADORES LIPÍDICOS | 61 |
| 6.3.1. | Distribuição de tamanho de partícula | 63 |
| 6.3.2. | Potencial zeta | 64 |
| 6.3.3. | Eficiência de encapsulação | 64 |
| 6.3.4. | Morfologia | 65 |
| 6.3.5. | pH | 67 |
| 6.4. | AVALIAÇÃO DA ESTABILIDADE | 67 |
| 6.5. | AVALIAÇÃO <i>IN VITRO</i> DO POTENCIAL IRRITATIVO DA NANOFORUMULAÇÃO | 69 |
| 6.5.1. | Ensaio HET-CAM | 69 |
| 6.5.2. | Ensaio com epiderme humana reconstruída | 71 |
| 6.6. | AVALIAÇÃO <i>IN VITRO</i> DA LIBERAÇÃO | 73 |

| | | |
|-----------|---|-----------|
| 6.6.1. | Avaliação da solubilidade dos fármacos no meio receptor | 73 |
| 6.6.2. | Avaliação <i>in vitro</i> da liberação dos fármacos..... | 74 |
| 6.7. | AVALIAÇÃO <i>IN VITRO</i> DA PENETRAÇÃO CUTÂNEA..... | 77 |
| 7. | CONCLUSÕES..... | 83 |
| 8. | PERSPECTIVAS FUTURAS..... | 84 |
| 9. | REFERÊNCIAS | 85 |

1. INTRODUÇÃO

A alopecia androgênica, também conhecida como calvície masculina, é uma doença decorrente de uma alteração do ciclo capilar que afeta ambos os sexos, sendo mais prevalente nos homens (MARTINEZ-JACOBO et al., 2018). Os primeiros sinais clínicos deste tipo de alopecia são percebidos devido a uma diminuição na densidade capilar causada principalmente por redução da espessura e da coloração dos fios de cabelo (KATZER et al., 2019).

Atualmente, apenas dois fármacos são aprovados pela *Food and Drug Administration* (FDA) por possuírem eficácia comprovada para o tratamento da alopecia: minoxidil para uso tópico e finasterida para uso oral (ADIL; GODWIN, 2017). O minoxidil age promovendo uma vasodilatação no couro cabeludo e isso favorece a circulação de sangue e de fatores de crescimento capilar (MESSENGER; RUNDEGREN, 2004; ROSSI et al., 2016; WESTER et al., 1984). Porém os produtos comerciais contendo minoxidil para uso tópico têm o incômodo da necessidade de administrações frequentes e ininterruptas para garantir a manutenção de concentrações efetivas do fármaco no seu alvo de ação durante todo o tratamento. Além disso, as formulações tópicas comerciais contêm alta quantidade de solvente orgânico em sua composição, o que tende a causar irritações cutânea com o passar do tempo de uso. Já os medicamentos orais contendo finasterida apresentam uma série de efeitos adversos sistêmicos. Por atuarem reduzindo a conversão da testosterona em di-hidrotestosterona, o uso oral deste fármaco causa efeitos hormonais, como disfunção erétil, diminuição da libido e até infertilidade (SAID; MEHTA, 2018). Assim, a busca por novas alternativas mais seguras e efetivas, seja pela investigação de novos fármacos, seja pela proposta de formulações com melhores desempenho no tratamento da alopecia é altamente demandada.

A latanoprostá é um análogo da prostaglandina $F_{2\alpha}$ usada como tratamento de primeira linha para pacientes com glaucoma de ângulo aberto. Vários estudos, no entanto, descrevem um aumento do tamanho dos cílios como efeito secundário durante o uso tópico de latanoprostá. Como consequência, alguns autores já sugerem o seu uso para crescimento capilar com base em estudos de eficácia em camundongos, primatas e também ensaios clínicos em humanos (BLOCH et al., 2018; BLUME-PEYTAVI et al., 2012; JOHNSTONE; ALBERT, 2002; SASAKI; HOZUMI; KONDO, 2005; UNO et al.,

2002). Contudo, ainda não há formulação comercial com este fármaco para o tratamento tópico da alopecia. Considerando que o minoxidil tem ação tópica comprovada no tratamento da calvície, que a latanoprosta tem se destacado como uma nova alternativa para tratar alopecia, e que os fármacos possuem mecanismos de ação distintos e complementares, este trabalho parte da hipótese de que a associação das duas substâncias em uma única formulação seria uma estratégia promissora para o tratamento tópico da alopecia. No entanto, as dificuldades relacionadas à necessidade de várias aplicações ao longo do dia e ao potencial irritante de formulações convencionais com o passar do tempo permanecem, somado ainda à dificuldade de incorporação de um fármaco extremamente lipofílico, como é o caso da latanoprosta ($\log P = 4,28$), a uma mesma formulação que um fármaco mais hidrofílico como é a forma sulfatada do minoxidil ($\log P = 0,44$).

Nanocarreadores lipídicos se destacam como sistemas de liberação de fármacos por serem biocompatíveis, atóxicos, melhorarem a estabilidade de fármacos e controlarem sua liberação, o que reduziria número de aplicações do produto, trazendo mais comodidade e segurança ao paciente (KATZER et al., 2019; PEREIRA et al., 2018). Alguns estudos têm apontado também que quando aplicadas topicamente, essas nanopartículas tendem a acomodarem-se preferencialmente nas cavidades foliculares da pele, o que as tornam promissoras para o tratamento tópico da alopecia uma vez que favoreceriam o acúmulo de fármacos próximo ao seu local de ação (FANG et al., 2014; GELFUSO et al., 2013; MATOS et al., 2015a). Além disso, espera-se que o conteúdo graxo desse tipo de nanopartícula tenha especial afinidade pelo conteúdo sebáceo dos folículos pilosos, de modo a favorecer o acúmulo dos fármacos encapsulados bem próximo ao bulbo, onde os fármacos que estimulam o crescimento capilar devem atuar. Tudo isso contribuiria muito para melhorar a eficácia dos fármacos e, conseqüentemente, ofereceria vantagens terapêuticas quando comparados aos produtos usados nos tratamentos atualmente disponíveis.

O presente trabalho, portanto, propõe o desenvolvimento e caracterização de uma formulação aquosa coloidal baseada em nanocarreadores lipídicos encapsulando uma associação de latanoprosta e minoxidil e a avaliação *in vitro* tanto do direcionamento dos fármacos para os folículos pilosos a partir dessa nanoformulação, quanto do seu potencial irritativo para aplicação cutânea, na tentativa de se obter uma alternativa promissora para o tratamento tópico da alopecia androgênica.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1. A PELE E OS CABELOS

O tratamento tópico dermatológico pressupõe a aplicação de um medicamento diretamente sob a pele para se obter um efeito localizado, restrito à uma determinada área de interesse. Esse tipo de tratamento oferece diversas vantagens quando comparado aos tratamentos orais e parenterais, como por exemplo o uso de doses menores e a redução de efeitos adversos sistêmicos. A via tópica dermatológica, porém, apresenta desafios para a penetração de fármacos, uma vez que a pele de maneira geral possui características restritivas à entrada de qualquer substância química para o interior do corpo.

A pele é o maior órgão humano, que recobre praticamente toda extensão do nosso corpo. Ela é formada pela associação de diferentes tipos histológicos e tem importante papel em funções vitais como a regulação da temperatura corporal, proteção contra a contaminação microbiana e de substâncias químicas, proteção contra choques externos e agressões físicas, além de ser importante na imunidade e no metabolismo. As três principais camadas da pele são: hipoderme, derme e epiderme (Figura 1).

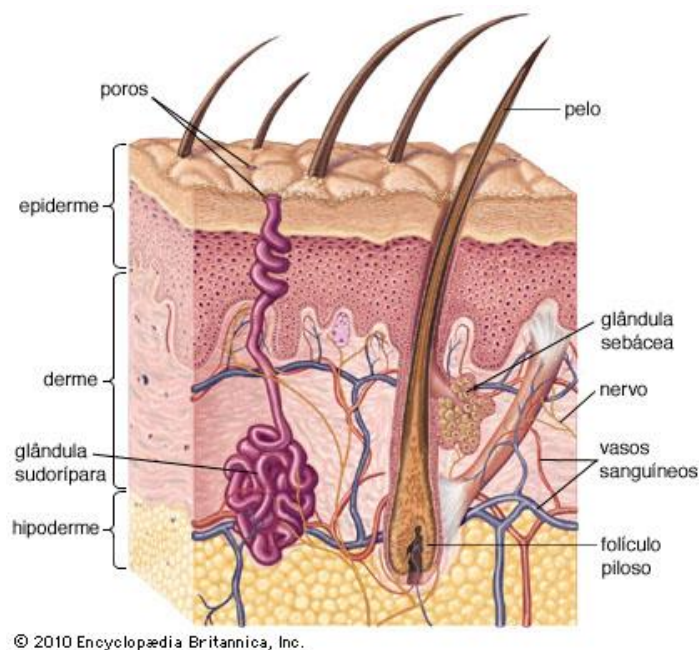


Figura 1: Esquema mostrando as camadas da pele - epiderme, derme e hipoderme e as outras estruturas que a compõe. Fonte: adaptado de <https://afh.bio.br/sistemas/tegumentar/1.php>.

A hipoderme é a camada mais interna da pele. Ela é formada basicamente de adipócitos, células que armazenam gordura e têm como principal função proteger a pele de impactos e atuar como reserva energética. A derme está acima da hipoderme e oferece suporte estrutural e nutricional para a epiderme. Na derme estão os vasos sanguíneos, nervos, glândulas sebáceas e sudoríparas e os folículos pilosos (HARRIS, 2009).

A porção mais externa da pele é a epiderme (Figura 2). Ela é formada por um conjunto de cinco camadas. A camada basal, também chamada germinativa, é a mais profunda onde se encontram os queratinócitos e os melanócitos. A camada espinhosa é formada por queratinócitos mais globulares. A camada granulosa é formada por queratinócitos mais achatados que estão prestes a perder suas características fisiológicas. A camada lúcida é uma camada fina e translúcida encontrada apenas nas regiões das mãos e dos pés. E a camada mais superficial é o estrato córneo, formado por corneócitos que são células queratinizadas anucleadas e planas (CORRÊA, 2012).

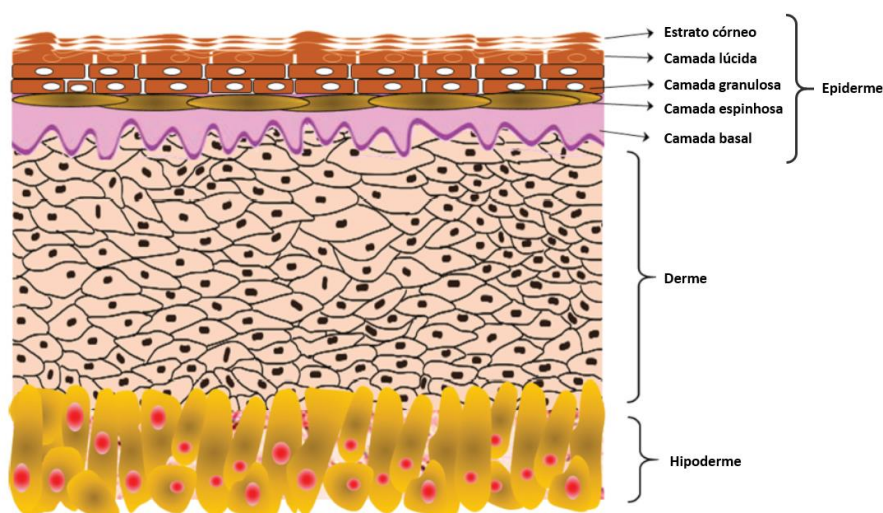


Figura 2: Estrutura básica da pele com as camadas da epiderme: estrato córneo, camada lúcida, camada granulosa, camada espinhosa, camada basal. Fonte: adaptado de (SHARMA et al., 2017).

Além das células que o compõe, o estrato córneo possui uma matriz lipídica que confere resistência e impermeabilidade para a pele. As formulações administradas na pele têm o estrato córneo como primeira barreira para permeação de substâncias (FANG et al., 2014). A depender das características físico-químicas, as substâncias podem permanecer sob a pele ou se difundir pelas camadas da epiderme através de três vias de penetração (Figura 3).

Pela via intercelular a substância se difunde através da matriz lipídica que cerca as células. Pela via transcelular as substâncias atravessam as células e também se

difundem através da matriz lipídica. Na penetração via anexos cutâneos, as substâncias podem ser absorvidas através dos folículos pilosos, das glândulas sebáceas e das glândulas sudoríparas (PATZELT; LADEMANN, 2013).

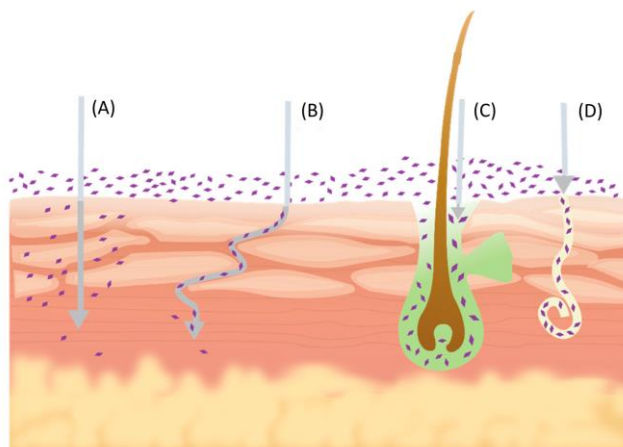


Figura 3: Vias de penetração através do estrato córneo: (A) via transcelular, (B) via intercelular, e as vias anexos cutâneos: (C) folículo piloso e glândula sebácea, (D) glândula sudorípara. Fonte: adaptado de (SHAKER et al., 2019).

Os cabelos e pelos são filamentos queratinizados que estão distribuídos por toda extensão do corpo humano. Os pelos influenciam diretamente na aparência das pessoas, possuindo função social importante, além de sua função excretora e de contribuírem para a sensibilidade e proteção dérmica.

Os cabelos e pelos do corpo estão inseridos na derme dentro de estruturas conhecidas como folículos pilosos (HARRIS, 2009). Os folículos pilosos são invaginações da epiderme que estão divididos em porções (infundíbulo, istmo e bulbo) e estão sempre associados a uma glândula sebácea e a um músculo eretor do pelo, formando uma unidade pilossebácea (Figura 4). Na porção terminal do folículo piloso (Figura 4), está o bulbo piloso que tem no seu centro uma estrutura chamada papila dérmica. É na base dos folículos que estão localizadas as estruturas vasculares e nervosas, e também as células que regulam o crescimento e são responsáveis pela manutenção dos pelos e cabelos (CORRÊA, 2012).

O infundíbulo é a parte superior do folículo piloso e funciona como uma área de absorção, aumentando muito a área de superfície da pele. Essa estrutura é revestida pelo estrato córneo e compõe a via folicular de permeação de substâncias (PATZELT; LADEMANN, 2013).

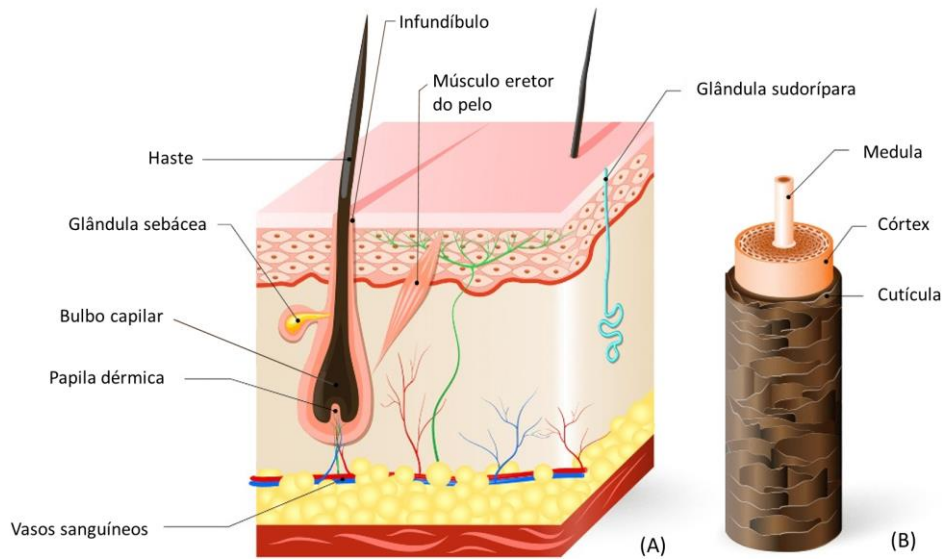


Figura 4: (A) estrutura histológica da unidade pilossebácea e do folículo piloso e (B) estrutura da haste capilar e suas principais camadas: cutícula, córtex e medula. Fonte: adaptado de <https://www.markbirchhair.com/about-hair/>.

Três camadas básicas compõem a haste, que é a parte visível do fio de cabelo. A cutícula é a camada mais externa e muito resistente. O córtex é o principal componente do cabelo, formado por células queratinizadas. A medula é a camada mais interna e central do fio. Na medula e no córtex se encontram os melanócitos que são responsáveis pela pigmentação dos fios. A cutícula dos cabelos é revestida por uma bainha que é um prolongamento da epiderme com um tipo de queratina mais dura e resistente (CORRÊA, 2012).

Os pelos podem ser classificados em lanugo, velus e terminais, diferindo principalmente quanto ao diâmetro, comprimento e pigmentação (BLUME-PEYTAVI; VOGT, 2011). Os pelos lanugo são estruturas características do período fetal, com a aparência de penugem. Os pelos velus são estruturas menores e mais finas, sendo caracterizadas por pelos de aparência clara e rala. Já os pelos terminais são os maiores em comprimento e em espessura, além de serem os mais escuros, aparência típica dos cabelos encontrados no couro cabeludo.

Os pelos e cabelos do corpo crescem através de processos cíclicos que são divididos em três principais fases (Figura 5): anágena, catágena e telógena. A fase anágena é a fase de crescimento ativo, a mais longa e pode durar de dois a sete anos. Em condições normais, a grande maioria dos fios, aproximadamente 90%, se encontram em fase de crescimento ativo, e uma pequena minoria estão nas outras fases (PARK; KHAN; RAWNSLEY, 2018). A fase catágena é a fase de regressão das dimensões do folículo e

dura aproximadamente duas semanas. Já a fase telógena é o período de repouso, o qual não há crescimento, e o posterior desprendimento do fio acontece durante 12 semanas. Alguns autores citam também a existência de uma fase latente, em que o folículo pode ficar vazio por alguns meses após a queda do fio, chamada fase quenógena (GUARRERA; REBORA, 2005; KATZER et al., 2019).

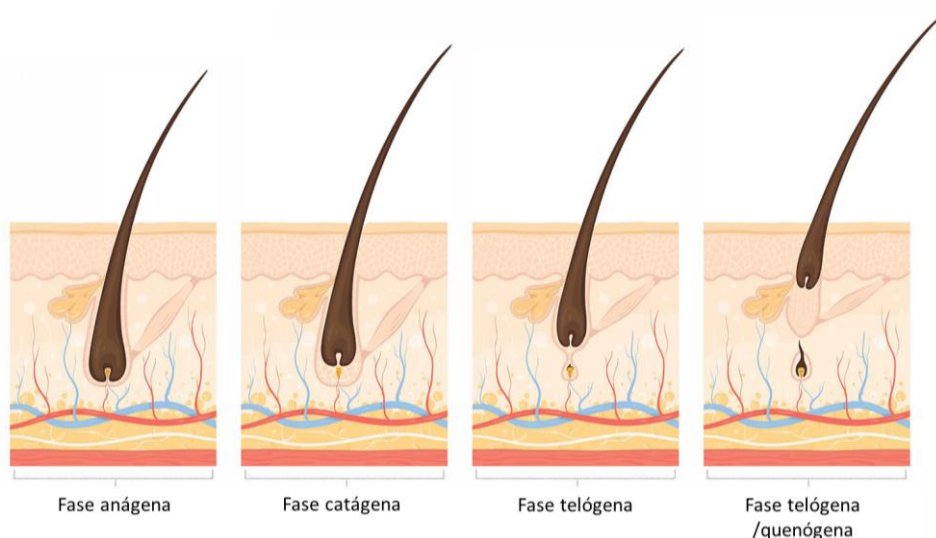


Figura 5: Fases de crescimento dos cabelos. Fonte: adaptado de <https://www.markbirchhair.com/about-hair/>.

O mecanismo fisiológico pelo qual o ciclo de crescimento capilar é regulado ocorre através uma rede complexa de ativação e inibição sequencial de vias de sinalização celular. Diversos fatores de crescimento, citocinas e hormônios são responsáveis por controlar a atividade do folículo piloso, afetando diretamente o ciclo de crescimento capilar (WHITTING, 2008).

2.2. ALOPECIA

Alopecia é uma condição caracterizada clinicamente pela perda cabelos. Essa perda pode ocorrer por causas externas e também por razões fisiológicas, podendo ser sinal de doenças sistêmicas. A alopecia pode ser classificada de acordo com o seu padrão de ocorrência (focal ou difusa), bem como pela presença ou ausência de cicatrizes.

A alopecia cicatricial acontece quando há a destruição ativa do folículo piloso e o tecido fibroso ocupa o lugar do tecido funcional. Essa perda de cabelo é irreversível como ocorre nos casos de alopecia frontal fibrosante (ALMOHANNA; PERPER; TOSTI, 2018). Felizmente os casos de alopecia reversível são os mais comuns e os tipos mais

conhecidos são: eflúvio telógeno, alopecia areata, alopecia quimioterápica e alopecia androgênica, que é sem dúvidas a mais prevalente de todas.

Alopecia androgênica, também conhecida como alopecia hereditária ou calvície masculina, é uma doença decorrente de uma alteração do ciclo capilar que afeta ambos os sexos, sendo mais prevalente nos homens, principalmente nos homens caucasianos (KATZER et al., 2019; ROSSI et al., 2016). É estimado que pelo menos 50% dos homens adultos até os cinquenta anos são afetados e que cerca de 30% das mulheres com mais de trinta anos desenvolvem a disfunção (FABBROCINI et al., 2018; MARTINEZ-JACOBO et al., 2018; ROGERS; AVRAM, 2008).

Os primeiros sinais clínicos da alopecia androgênica são percebidos devido a uma diminuição na densidade capilar causada principalmente por redução da espessura e da coloração dos fios (KATZER et al., 2019). Por ser uma doença que causa mudanças físicas significativas e aparentes, a alopecia possui implicação social direta, podendo causar problemas de autoestima nas pessoas acometidas.

A alopecia é caracterizada pela progressiva miniaturização dos folículos pilosos que gera diversas alterações no ciclo capilar (ROSSI et al., 2016). Visualmente, isso quer dizer que os fios de cabelo se tornam progressivamente menores, reduzidos em diâmetro e comprimento e a pigmentação também é alterada, pois os fios vão ficando mais claros, os pelos terminais vão adquirindo um novo padrão de pelos velus. Fisiologicamente essa miniaturização é explicada por uma redução da fase anágena dos folículos e pelo aumento da duração da fase telógena, fazendo com que eles permaneçam por muito mais tempo em repouso do que em processo de crescimento ativo. Outra explicação fisiológica é o prolongamento da fase latente do ciclo capilar, a fase quenógena.

A miniaturização dos folículos ocorre como resposta das células do folículo piloso aos andrógenos nos indivíduos com predisposição genética para o desenvolvimento de alopecia androgênica (KATZER et al., 2019). Tanto homens quanto mulheres acometidas pela calvície apresentam elevados níveis da enzima 5α -redutase, que, conseqüentemente, aumenta a expressão de receptores de andrógenos nos folículos pilosos das áreas calvas (MARTINEZ-JACOBO et al., 2018). A enzima 5α -redutase é responsável pela conversão da testosterona em di-hidrotestosterona, um metabólito muito mais ativo e potente por ter uma afinidade muito maior com os receptores androgênicos (BIENOVÁ et al., 2005).

A ativação dos receptores androgênicos pela di-hidrotestosterona leva à secreção de diversos fatores pelas células da papila dérmica que causam a redução ou interrupção da fase anágena do ciclo capilar e indução da fase catágena (ROSSI et al., 2016). Todos esses fatores levam a uma diminuição da expressão de fatores de crescimento e um aumento na expressão de citocinas que induzem apoptose das células no bulbo capilar.

A alopecia androgênica tem como principal causa o fator hormonal, porém os fatores genéticos são determinantes e impactam diretamente na magnitude da resposta dos folículos pilosos ao andrógenos. A influência genética é determinada de forma poligênica, pois vários genes já foram estudados e estão associados ao desenvolvimento da alopecia androgênica (MARTINEZ-JACOBO et al., 2018; ROSSI et al., 2016).

Outro fator que influencia na progressão da alopecia androgênica é o fator inflamatório. Devido as alterações no ciclo capilar causadas pelos hormônios andrógenos, uma espécie de microinflamação nos folículos é frequentemente descrita. Essa inflamação é desencadeada pela desregulação na expressão de citocinas inflamatórias e também por um desequilíbrio de micro-organismos que estão localizados no couro cabeludo (ROSSI et al., 2016). Esse microambiente inflamatório é diretamente influenciado por fatores ambientais (externos) como limpeza, produtos irritantes, radiação UV, poluentes e até mesmo o uso de cigarro, podendo resultar em atrofia dos folículos pilosos (KATZER et al., 2019; TRÜEB, 2003).

2.3. TRATAMENTOS

O objetivo do tratamento de alopecia androgênica é reduzir a perda de cabelo e ao mesmo tempo induzir um aumento do crescimento capilar (ALMOHANNA; PERPER; TOSTI, 2018). Existem diversas abordagens que podem ser utilizadas para terapia e manejo dos sintomas da alopecia androgênica, podendo ser utilizadas como monoterapias ou em combinação. Entre as principais abordagens estão os tratamentos farmacológicos de uso tópico e oral. Entretanto também existem novos tratamentos que utilizam tecnologias para o desenvolvimento de sistemas de liberação, aqueles que usam métodos físicos como laser ou ainda métodos minimamente invasivos como microagulhamento (KATZER et al., 2019).

Atualmente, apenas os fármacos minoxidil e finasterida são aprovados pela *Food and Drug Administration* (FDA) para o tratamento da alopecia. Apesar de efetivos, os

efeitos indesejados associados ao uso desses fármacos diminuem muito a adesão dos pacientes aos tratamentos. A necessidade de aplicações frequentes e os efeitos adversos dos associados ao uso dos produtos são os principais dificultadores.

A finasterida é o principal fármaco de uso sistêmico para o tratamento de alopecia androgênica em homens. Ela é um inibidor seletivo da 5- α -redutase, enzima que converte testosterona em di-hidrotestosterona, forma mais ativa que é majoritariamente responsável pela queda de cabelo (ROGERS; AVRAM, 2008). A dose usual é de 1 mg de finasterida por dia e possui eficácia bem estabelecida por diversos estudos (ADIL; GODWIN, 2017). São altas as evidências de que o fármaco possui efeito significativo sobre o crescimento capilar após seis meses de uso quando comparado ao placebo, sendo então fortemente recomendada para o tratamento de alopecia androgênica em homens (MANABE et al., 2018).

Entretanto diversos estudos descrevem problemas sexuais associados ao uso de finasterida, tais como: disfunção erétil, diminuição do volume ejaculado, diminuição da libido e infertilidade (SAID; MEHTA, 2018). Outro problema é que a administração oral de finasterida não é recomendada para o tratamento da condição em mulheres, pois a eficácia não é comprovada além de ser contraindicada para gestantes ou com suspeita de gravidez devido ao risco de má formação fetal (MANABE et al., 2018).

Além dos efeitos adversos causados pelo próprio fármaco, a via oral requer a utilização de doses maiores dos medicamentos e maior tempo para que eles produzam efeito, pois as moléculas precisam ser distribuídas por todo corpo para então alcançar seu alvo terapêutico. Nesse sentido, a aplicação tópica de fármacos no manejo da alopecia apresenta diversas vantagens para o tratamento, pois a aplicação do produto é feita diretamente no local de ação. Isso leva a utilização de doses menores, redução de efeitos adversos sistêmicos e diminuição do tempo necessário para que o fármaco comece a fazer efeito (PEREIRA et al., 2018).

2.3.1. Minoxidil

O minoxidil é o principal fármaco usado para o tratamento tópico da alopecia sendo fortemente recomendado como terapia de primeira escolha, tanto para homens quanto para mulheres (GOREN; NACCARATO, 2018; STOEHR et al., 2019). Os produtos comerciais, em geral, são em forma de soluções hidroalcoólicas a 2% ou 5%

para aplicação tópica sobre o couro cabeludo. O uso de álcoois na composição está relacionado à solubilidade limitada deste fármaco em veículos aquosos.

Originalmente, o minoxidil era usado via oral para o tratamento de pacientes com hipertensão, atuando como vasodilatador periférico. No entanto, foi observado que o principal efeito adverso da administração sistêmica do minoxidil era a hipertricose auricular, ou seja, o crescimento de pelos nas orelhas dos pacientes (MESSENGER; RUNDEGREN, 2004). A partir daí, um novo uso para o fármaco foi proposto: tratamento de perda de cabelo.

O efeito pelo qual o minoxidil promove o crescimento capilar não está completamente elucidado (STOEHR et al., 2019) e os estudos mostram que o fármaco age de várias formas (KATZER et al., 2019). Um dos principais mecanismos relatados é sua ação vasodilatadora no couro cabeludo (WESTER et al., 1984) mediada pela abertura de canais de potássio, o que leva a um aumento do fluxo de sangue e de fatores que promovem o crescimento capilar (MESSENGER; RUNDEGREN, 2004; ROSSI et al., 2016). Esses fatores de crescimento induzem a transição dos folículos capilares da fase telógena (em repouso) para a fase de crescimento ativo, a fase anágena (MESSENGER; RUNDEGREN, 2004; SHORTER et al., 2008). O minoxidil atua também estimulando a proliferação e diferenciação dos queratinócitos foliculares, prolongando a anáfase folicular (BIENOVÁ et al., 2005) e além disso, aumenta a proliferação das células da papila dérmica, que são fibroblastos especializados no controle do ciclo de crescimento capilar (HAN et al., 2004).

A forma mais ativa do minoxidil nos folículos pilosos é o metabólito sulfatado do fármaco: o minoxidil sulfato (MXS) sendo este mais potente para estímulo do crescimento capilar (BUHL et al., 1990). O minoxidil sulfato (Figura 6) vem sendo muito utilizado (principalmente em produtos magistrais) por ser uma forma mais hidrossolúvel ($\log P = 0,44$) que o minoxidil base, que normalmente é usado em produtos industrializados. O minoxidil sulfato, portanto, facilita a manipulação farmacotécnica, contribui para promover a permeação do ativo, além de ser reconhecido como uma forma mais potente do fármaco.

Embora o uso tópico do minoxidil tenha um excelente registro de segurança, a eficácia do medicamento permanece baixa. Após 16 semanas de aplicação duas vezes ao

dia, menos de 40% dos pacientes respondem ao tratamento (GOREN; NACCARATO, 2018).

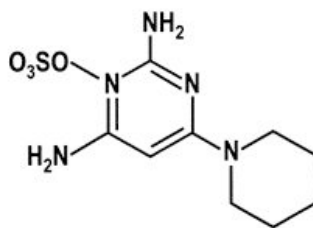


Figura 6: Estrutura química do minoxidil sulfato; pKa = 4,6 (MATOS et al., 2017); log P = 0,44 (PADOIS et al., 2011).

Atualmente os produtos à base de minoxidil são de fácil acesso pois estão disponíveis para compra sem receita em farmácia. Os resultados do uso podem ser percebidos após alguns meses aplicando o medicamento uma ou duas vezes ao dia e o tratamento deve ser feito de forma contínua e se estender indefinidamente (STOEHR et al., 2019). Isso ocorre porque a descontinuação no uso pode induzir a queda capilar em aproximadamente seis meses (BANKA; BUNAGAN; SHAPIRO, 2013).

O minoxidil em soluções tópicas pode causar prurido e descamação do couro cabeludo ocasionando uma dermatite de contato devido a um ressecamento na pele associado a presença de propilenoglicol e álcool nas formulações. Além disso, nessa forma o fármaco pode ser absorvido sistemicamente, podendo causar problemas ainda maiores como a hipertricose em outras regiões do corpo (ROSSI et al., 2016). Logo, as formulações de minoxidil devem ser as mais confortáveis possíveis a fim de evitar o surgimento de efeitos adversos, visto que o tratamento é extremamente longo e a adesão dos pacientes é fator chave para o sucesso da terapia.

2.3.2. Latanoprosta

A latanoprosta (Figura 7) é um análogo da prostaglandina F2 α que atua reduzindo a pressão intraocular através do aumento da drenagem (escoamento) do humor aquoso, que é o líquido que preenche o globo ocular. A latanoprosta é um fármaco lipofílico (log P = 4,28) administrado via ocular na forma de colírio sendo usado como tratamento de primeira linha para pacientes com glaucoma (DIGIUNI; FOGAGNOLO; ROSSETTI, 2012; NATARAJAN et al., 2012).

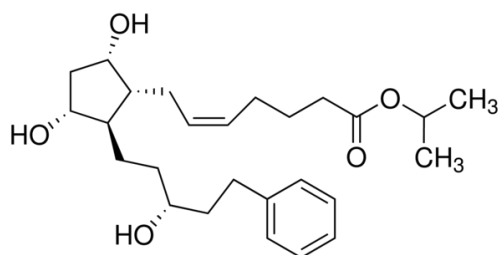


Figura 7: Estrutura química da latanoprost; pKa = 4,88 (DIGIUNI; FOGAGNOLO; ROSSETTI, 2012); log P = 4,28 (RODRIGUEZ-ALLER et al., 2015).

A latanoprost é eficaz para a finalidade proposta e, em geral, não apresenta efeitos sistêmicos relevantes, é administrada apenas uma vez ao dia e apresenta boa aceitação e tolerabilidade pelos pacientes (STOLZ; ALM, 2014). Os efeitos adversos mais comuns observados durante seu uso são: hiperemia conjuntival, pigmentação da íris, pele periocular ou cílios e hipertricose (DIGIUNI; FOGAGNOLO; ROSSETTI, 2012).

Estudos têm mostrado que colírios contendo latanoprost ou outros análogos de prostaglandina F2 α são responsáveis por induzir o crescimento dos cílios dos pacientes, que é percebido através do aumento da espessura e do comprimento dos fios (DIGIUNI; FOGAGNOLO; ROSSETTI, 2012; JOHNSTONE; ALBERT, 2002; STOLZ; ALM, 2014). Esse é um efeito colateral comumente observado durante seu uso que pode regredir após aproximadamente oito meses de descontinuação do tratamento (O'TOOLE; CAHILL; O'BRIEN, 2001).

O mecanismo pelo o qual a latanoprost promove o crescimento capilar ainda não é bem compreendido; porém, sugere-se que a latanoprost induza os folículos pilosos que estavam em repouso (telógenos) a entrarem na fase de crescimento ativo (anágenese), convertendo os pelos velus em pelos terminais (JOHNSTONE; ALBERT, 2002). Há indícios de que as prostaglandinas F2 α endógenas possuam uma ação vasodilatadora na derme (aumenta o fluxo de sangue nos vasos que nutrem os folículos pilosos) e atuem como um dos mediadores na regulação do ciclo de crescimento capilar (SASAKI; HOZUMI; KONDO, 2005). Estudos *in vitro* mostram que os análogos de prostaglandina F2 α são capazes de induzir a replicação de DNA e de estimular a divisão celular (DUTKIEWICZ; ALBERT; LEVIN, 2000).

A hipertricose normalmente ocorre associada ao escurecimento dos pelos e essa ação provavelmente se deve à ação estimuladora das prostaglandinas na melanogênese (GUPTA et al., 2019; JOHNSTONE; ALBERT, 2002; ZALFA et al., 1987). Os

receptores aos quais as prostaglandinas se ligam também estão localizados nos folículos pilosos, assim como por todo tecido ocular, e a ativação desses parece regular a proliferação dos queratinócitos (DIGIUNI; FOGAGNOLO; ROSSETTI, 2012; STJERNSCHANTZ, 2001).

O crescimento ciliar chama atenção por ser um efeito desejável do ponto de vista cosmético, por aumentar o comprimento, pigmentação, espessura e o número de cílios. Em 2008, uma formulação específica para esse uso (Latisse[®]) foi aprovada pelo FDA. Esse produto contém o ativo bimatoprost, também um análogo de prostaglandina F2 α , que induz e prolonga a fase anágena dos folículos pilosos, aumentando o número, a espessura e o comprimento dos fios dos cílios (BARRÓN-HERNÁNDEZ; TOSTI, 2017; CHOI; DIEHL; LEVINS, 2015).

Apesar de não existirem produtos industrializados registrados, vários estudos evidenciam a latanoprost como uma molécula promissora para ser utilizada com a finalidade de crescimento capilar. O ativo já é usado em formulações magistrais (de administração tópica) produzidas em farmácias de manipulação, tendo seu uso *off label* estabelecido por proporcionar benefícios aos pacientes (GUPTA et al., 2019). Estudos clínicos relatam aumento significativo da densidade capilar de pacientes calvos se comparado ao placebo (BLOCH et al., 2018; BLUME-PEYTAVI et al., 2012; CHOI; DIEHL; LEVINS, 2015) mostrando a latanoprost como um ótimo candidato para o tratamento da alopecia.

Os relatos de casos de hipertricose com o uso de latanoprost começaram em meados de 1997, e chamaram ainda mais atenção devido ao crescimento dos cílios em um paciente que não os tinha (MANSBERGER; CIOFFI, 2000; WAND, 1997). A partir de então diversos trabalhos na literatura relatam o efeito da latanoprost no crescimento capilar em humanos e em modelos animais.

Através de avaliações macroscópicas e histológicas que mostraram pigmentação e aumento da espessura da pele, estudos com ratos indicam que o uso tópico da latanoprost é capaz de estimular o crescimento capilar através da indução de anagênese em folículos que já estavam em repouso (JOHNSTONE; ALBERT, 2002; SASAKI; HOZUMI; KONDO, 2005). O efeito no couro cabeludo de primatas também foi avaliado

mostrando que a latanoprosta foi capaz de induzir um crescimento moderado de cabelos nos macacos que apresentavam alopecia androgênica (UNO et al., 2002).

Um estudo piloto randomizado, duplo-cego, controlado por placebo, avaliou o efeito de um tratamento com 0,1% de latanoprosta por 24 semanas em 16 homens com alopecia androgênica (BLUME-PEYTAVI et al., 2012). Os resultados mostram que 50% dos participantes apresentaram uma resposta clínica boa. Houve um aumento significativo na densidade capilar de pelo menos 8 dos homens quando comparado ao estágio inicial e ao placebo.

Os achados na literatura evidenciam a capacidade da latanoprosta em estimular a atividade folicular através da indução e do prolongamento da fase de crescimento ativo (anágenese) dos folículos pilosos, aumentando a espessura, o comprimento e a pigmentação dos pelos (FABBROCINI et al., 2018; JOHNSTONE; ALBERT, 2002; VALENTE DUARTE DE SOUSA; TOSTI, 2013).

Recentemente, outro estudo em humanos avaliou a efetividade do uso tópico de latanoprosta isoladamente ou em associação com minoxidil para reduzir a perda de cabelos e/ou estimular o crescimento capilar em pacientes com alopecia androgênica (BLOCH et al., 2018). Os fármacos foram testados em diferentes concentrações e o tratamento que utilizou a combinação de minoxidil 5% com latanoprosta 0,005% se mostrou eficaz aumentando o número total de pelos.

Apesar de a associação de minoxidil e latanoprosta já ter sido relatada, os desafios tecnológicos de fazer uma formulação que associe os dois fármacos ainda permanecem visto que não há nenhum produto comercialmente disponível com essa composição. Associar fármacos com polaridades diferentes numa mesma formulação é um trabalho desafiador. Além disso, é necessário garantir a segurança da formulação e certificar que quantidades efetivas dos fármacos alcançarão os folículos pilosos.

Logo, considerando que o minoxidil tem ação comprovada no tratamento tópico da calvície, e que a latanoprosta tem se destacado como uma nova alternativa para tratar alopecia, a associação dos dois fármacos seria uma estratégia promissora a ser usada no tratamento da alopecia androgênica.

2.4. NANOTECNOLOGIA NO TRATAMENTO TÓPICO DA ALOPECIA

Muitas pesquisas vêm sendo realizadas buscando o desenvolvimento de novas formulações que possam contribuir para aprimorar o tratamento da calvície. Isso inclui a descoberta de novas substâncias, a associação de fármacos já utilizados (*off label*) e, principalmente, a melhora de desempenhos de substâncias já utilizadas na terapêutica, principalmente com o uso da nanotecnologia.

Os sistemas nanoestruturados encapsulando substâncias farmacologicamente ativas já têm mostrado que oferecem vantagens para aplicação tópica, como o aumento de estabilidade desses fármacos, a possibilidade de controlar a liberação dos fármacos de modo a reduzir efeitos adversos e reduzir dose e frequência do uso de medicamentos pelo paciente (BORGHETTI-CARDOSO et al., 2016; VOGT; BLUME-PEYTAVI, 2014). Alguns tipos de nanopartículas também são capazes de reduzir a toxicidade de substâncias potencialmente irritantes para a pele e tudo isso contribui para melhorar a eficácia terapêutica em comparação aos produtos usados nos tratamentos atualmente disponíveis.

No caso da alopecia, em que o alvo de ação são os folículos capilares, a maior vantagem de aplicação de sistemas nanoestruturados é o acúmulo dessas nanoestruturas dentro dos folículos pilosos, possibilitando uma liberação mais direcionada do fármaco no interior deste compartimento da pele. De fato os nanossistemas têm demonstrado uma tendência natural de se acumularem na matriz folicular capilar aumentando a concentração de fármaco no local de ação e diminuindo os efeitos adversos, por exemplo, que uma alta exposição sistêmica poderia causar (FANG et al., 2014; LADEMANN et al., 2007; PATZELT; LADEMANN, 2013; PEREIRA et al., 2018; USHIROBIRA et al., 2020).

Muitos trabalhos já utilizaram sistemas nanoestruturados para o direcionamento de fármacos para os folículos pilosos visando o tratamento tópico da alopecia. Nanossistemas feitos à base de polímeros biodegradáveis como a policaprolactona, por exemplo, foram capazes de aumentar a penetração de clobetamol, dudasterida e latanoprostina nas cavidades foliculares em até 5 vezes quando comparado as soluções controle com o fármaco livre (MATHES et al., 2016; OLIVEIRA et al., 2020a; USHIROBIRA et al., 2020).

Estudos que investigaram a encapsulação de minoxidil em nanopartículas de quitosana e em nanopartículas lipídicas mostraram que o uso da nanotecnologia possibilitou o acúmulo do fármaco nos folículos pilosos (MATOS et al., 2015a; PADOIS et al., 2011). Isso evidencia que independente da matriz usada na produção das nanopartículas, poliméricas ou lipídicas, os sistemas nanométricos são eficazes em direcionar a liberação do minoxidil para o seu alvo, melhorando o tratamento tópico da alopecia.

Um aspecto comum observado nos trabalhos já publicados é o tamanho médio das nanopartículas. Os diâmetros foram em torno de 200 nm, mostrando que provavelmente essa é uma importante característica que deve ser levada em conta para o desenvolvimento de nanossistemas que visam uma administração folicular (PEREIRA et al., 2018).

2.4.1. Nanocarreadores lipídicos

O uso de uma matriz lipídica para a produção de nanopartículas que promovam um direcionamento folicular de fármacos tem se destacado como ferramenta promissora para o tratamento tópico da alopecia. Isso porque esses sistemas nanoestruturados possuem características físico-químicas que possibilitam o direcionamento, o acúmulo e o controle da liberação dos fármacos nos folículos capilares.

Além disso, as nanoformulações lipídicas não são irritantes para a pele e apresentam maior biocompatibilidade do que algumas formulações convencionais ou sistemas poliméricos (KATZER et al., 2019; PEREIRA et al., 2018; VOGT; BLUME-PEYTAVI, 2014). Os lipídios são materiais biodegradáveis de origem natural que são facilmente decompostos através de processos fisiológicos (metabolismo enzimático), gerando produtos de degradação como os ácidos graxos que naturalmente ocorrem no corpo humano (SHARMA et al., 2017).

Os nanocarreadores lipídicos (CLN) apresentam-se como um tipo de sistema nanoparticulado constituído por uma mistura de lipídios sólidos e líquidos, e uma fase aquosa contendo agentes tensoativos (Figura 8) (BELOQUI et al., 2016; CZAJKOWSKA-KOŚNIK; SZEKALSKA; WINNICKA, 2019). Diferente de outros tipos de nanopartículas, a produção é realizada sem a presença de solventes orgânicos e

o processo de obtenção laboratorial é robusto e não é muito complexo, podendo ser adaptado para produção industrial em grande escala (SHARMA et al., 2017).

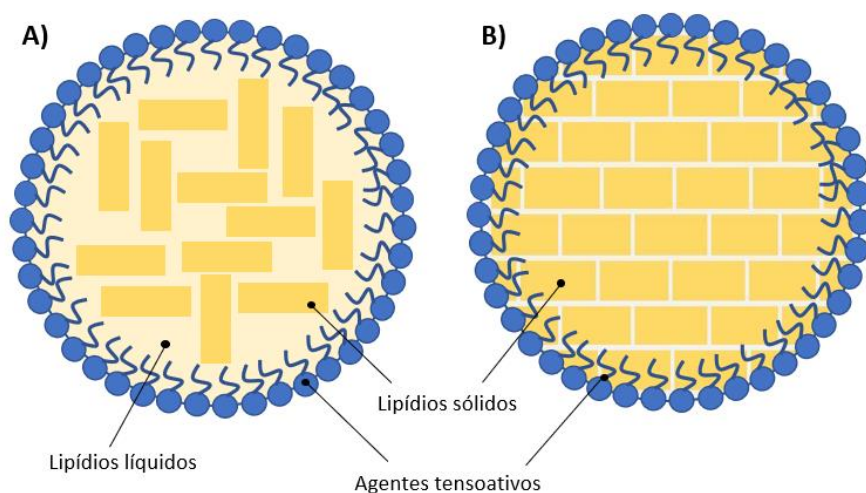


Figura 8: Estrutura dos (A) nanocarreadores lipídicos e das (B) nanopartículas lipídicas sólidas.

As primeiras nanopartículas feitas a base de lipídios, chamadas nanopartículas lipídicas sólidas, foram produzidas nos anos 90 apenas com lipídios sólidos (PURI et al., 2009; SHARMA et al., 2017). A composição dessas nanopartículas limitava a encapsulação de ativos e fazia com que esses fossem expulsos dos nanossistemas durante o período de armazenamento. Devido a esses inconvenientes, os estudos avançaram e assim surgiu uma nova geração de nanopartículas lipídicas: os nanocarreadores lipídicos. Devido à sua composição e processo de obtenção o lipídios adquirem uma conformação que favorece a encapsulação de fármacos quando comparado a primeira geração de nanopartículas lipídicas (SELVAMUTHUKUMAR; VELMURUGAN, 2012).

A nanoencapsulação favorece a permeação dos ativos através do estrato córneo, reduz a absorção sistêmica e ainda proporciona maior estabilidade química às moléculas que são fotossensíveis e suscetíveis a degradação (GARCÊS et al., 2018). O tamanho nanométrico dos carreadores aumenta a superfície de contato do fármaco encapsulado com o estrato córneo da pele. Por causa de sua composição lipídica, esses nanossistemas garantem um efeito oclusivo que conduz a um aumento da hidratação e consequentemente melhora a penetração do fármaco encapsulado na pele (FIREMAN et al., 2011; VYAS; KUMAR SONKER; GIDWANI, 2014).

Um maior direcionamento e uma alta absorção dos nanocarreadores lipídicos pelos folículos pilosos tem sido relatada, uma vez que os lipídios que os compõem

possuem alta afinidade pelo sebo secretado pelas glândulas sebáceas que estão associadas aos folículos pilosos (BLUME-PEYTAVI; VOGT, 2011). Por isso, esses nanossistemas têm sido muito estudados para o tratamento de doenças que afetam os folículos pilosos (acne, alopecia, hidradenite supurativa) visto que funcionariam como uma espécie de reservatório para os fármacos após a administração tópica dos mesmos (ANGELO et al., 2020; BLUME-PEYTAVI; VOGT, 2011; KATZER et al., 2019; PEREIRA et al., 2018, 2021; VYAS; KUMAR SONKER; GIDWANI, 2014).

Por ser um tipo de nanossistema que tem chamado muita atenção para administração folicular de fármacos, alguns estudos já foram conduzidos avaliando o desempenho de nanocarreadores lipídicos no tratamento tópico da alopecia. Nanoformulações encapsulando minoxidil com aproximadamente 300 nm de diâmetro demonstraram grande potencial em sustentar a liberação do fármaco e melhorar a sua penetração na pele (UPRIT et al., 2013; WANG et al., 2017). Resultados promissores também foram observados para o clobetasol, fármaco usado no tratamento de alopecia areata. Os carreadores lipídicos nanoestruturados, neste caso, aumentaram em cerca de 40 vezes o acúmulo do fármaco no local de ação quando comparado a formulação comercial (ANGELO et al., 2020).

Aliado ao fato de se acumularem nas cavidades foliculares, os nanocarreadores lipídicos têm mostrado a capacidade de encapsular moléculas com polaridades diferentes (hidrofílicas e lipofílicas) e também de controlar e sustentar a liberação dos fármacos (BELOQUI et al., 2016). Moléculas lipofílicas tem alta afinidade pela matriz lipídica e, portanto, são facilmente incorporadas na matriz lipídica dos nanocarreadores. Entretanto ativos hidrofílicos como o voriconazol e a clindamicina também apresentaram altos valores de eficiência de encapsulação (superiores a 70%) quando formulados em nanocarreadores lipídicos (SANTOS et al., 2018; TOLENTINO et al., 2020) uma vez que o sistema possui uma matriz amorfa que acomoda bem estas moléculas mais hidrofílicas.

Levando em consideração essa versatilidade oferecida pelos carreadores lipídicos nanoestruturados, um estudo recente desenvolveu uma nanoformulação co-encapsulando clindamicina e rifampicina. Os fármacos com polaridades diferentes tiveram mais de 80% de eficiência de encapsulação nos nanocarreadores, que, por sua vez, promoveram um acúmulo maior dos fármacos nos folículos pilosos (PEREIRA et al., 2021).

Além de promoverem direcionamento e acúmulo de fármacos, os nanocarreadores lipídicos promovem uma redução na manifestação de efeitos adversos associados ao uso dos medicamentos. Fármacos que são conhecidos por causar desconforto e irritabilidade cutânea após a administração, como a tretinoína e o ácido retinóico, quando encapsulados nesses nanossistemas lipídicos mostram uma redução do potencial tóxico e irritativo (CASTRO et al., 2009; MANDAWGADE; PATRAVALE, 2008; SHAH et al., 2007).

Após o advento dos nanocarreadores lipídicos, vários estudos já foram realizados no intuito de conhecer melhor a aplicabilidade e segurança dessas nanopartículas, demonstrando, em pouco tempo, a eficácia delas para utilização em diversos tipos de abordagens. Devido aos inúmeros benefícios oferecidos pelos carreadores lipídicos nanoestruturados, vários produtos que utilizam a tecnologia desses nanossistemas de liberação já foram lançados e estão disponíveis comercialmente (GARCÊS et al., 2018; SHARMA et al., 2017). Alguns exemplos de produtos cosméticos para uso tópico são: Cutanova (Dr. Rimpler), Nanobase (Yamanouchi), Super Vital (IOPE) e Surmer crème légère (Isabelle Lancray). A grande quantidade de estudos disponíveis na literatura e os produtos comerciais já disponíveis no mercado demonstram a biocompatibilidade desses nanocarreadores a base de lipídios e seu enorme potencial para uso e administração tópica de ativos.

Visto que o sucesso dos produtos farmacêuticos para o tratamento local da alopecia depende da capacidade que a formulação tem de (1) encapsular os fármacos de forma eficiente; (2) cooperar para que esses penetrem a pele de maneira adequada alcançando os folículos pilosos; e (3) não causar irritação cutânea, os nanocarreadores lipídicos se mostram como uma excelente alternativa, pois são sistemas biocompatíveis e que têm apresentado diversos benefícios para administração folicular de moléculas.

3. OBJETIVOS

3.1. OBJETIVO GERAL

O objetivo deste trabalho foi desenvolver e caracterizar uma formulação inovadora para administração tópica de latanoprostá e minoxidil co-encapsulados em nanocarreadores lipídicos, e ainda, avaliar o direcionamento e acúmulo dos fármacos nos folículos pilosos proporcionados por este sistema, a fim de melhorar o tratamento tópico da alopecia androgênica.

3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Desenvolver um método analítico por LC-MS capaz de detectar e quantificar de maneira inequívoca e simultânea o minoxidil e a latanoprostá na presença de interferentes de pele;
- Validar o método bioanalítico demonstrando sua seletividade, linearidade, sensibilidade, precisão, exatidão e baixos limites de detecção e quantificação;
- Verificar a compatibilidade química entre o minoxidil e a latanoprostá por meio de ensaios térmicos e de espectroscopia de infravermelho;
- Produzir nanocarreadores lipídicos para co-encapsulação dos fármacos;
- Caracterizar os nanocarreadores lipídicos quanto ao tamanho e distribuição de tamanho de partícula, potencial zeta, eficiência de encapsulação, pH em dispersão aquosa e morfologia;
- Estudar a estabilidade dos nanocarreadores lipídicos contendo os fármacos;
- Verificar o potencial irritante dos nanossistemas desenvolvidos;
- Determinar *in vitro* o perfil de liberação do minoxidil e da latanoprostá a partir dos nanocarreadores lipídicos;
- Avaliar *in vitro* a penetração nas camadas da pele e o acúmulo nos folículos pilosos dos fármacos encapsulados nos carreadores lipídicos nanoestruturados.

4. MATERIAL

4.1. Fármacos e padrões analíticos

A latanoprostá (Chemo, Itália) foi gentilmente doada pela empresa Aché Laboratórios Farmacêuticos (Guarulhos, Brasil). O minoxidil sulfato foi adquirido da Fagron (Anápolis, Brasil). Os padrões analíticos de ambos os fármacos (minoxidil sulfato e latanoprostá, > 99%) foram adquiridos da Sigma-Aldrich (Steinheim, Alemanha).

4.2. Solventes

O metanol e a acetonitrila, ambos de grau HPLC, foram obtidos da J.T.Baker (Philisburg, EUA). A água ultrapura foi obtida a partir de um sistema Milli-Q da Millipore (Illkirch Graffenstaden, França).

4.3. Outros insumos

O ácido fórmico grau HPLC usado para preparo da fase móvel foi adquirido da Sigma-Aldrich (Steinheim, Alemanha). Para a realização de técnica de *tape stripping* diferencial foi utilizada a fita Scotch nº 845 Book Tape (3M, Maplewood, EUA) e cola de cianoacrilato da marca Super Bonder (Loctite, Brasil).

Para o preparo dos nanocarreadores lipídicos, o Compritol[®] (behanato de glicerila) foi gentilmente doado pela empresa Gattefossé (Lyon, França). O Miglyol[®] 812N (triglicerídeos dos ácidos cáprico e caprílico) foi obtido da Stallergenes SA (Antony, França), o Span[®] 85 (trioleato de sorbitano) e o cloreto de cetilpiridínio foram adquiridos da Sigma-Aldrich (Steinheim, Alemanha).

Para o preparo do meio receptor (tampão pH 7.4), o fosfato de sódio monobásico, dibásico e o hidróxido de sódio foram adquiridos da Dinâmica (São Paulo, Brasil), o cloreto de sódio foi obtido da Cromoline (São Paulo, Brasil) e o Tween[®] 80 (polissorbató 80) foi obtido da Merck (Darmstadt, Alemanha).

Para os testes *in vitro* com linhagens de células, MTT (brometo de 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio) foi obtido de Sigma-Aldrich Co. (St. Louis, EUA). A epiderme humana reconstruída (RHE) foi fornecida pela EpiSkin[™]. O isopropanol, o dodecil sulfato de sódio (SDS) e a solução salina (NaCl) foram adquiridos na Dinâmica Química Contemporânea Ltda. (São Paulo, Brasil).

4.4. Pele

4.4.1. Orelha de porco

As orelhas de suínos foram obtidas em um abatedouro local (Frigorífico Sabugy, Planaltina, Brasil) e mantidas sob refrigeração até a retirada da pele. Após a lavagem em água corrente, as orelhas foram secas e fixadas com alfinetes em um suporte de isopor previamente coberto por papel alumínio (Figura 9). Com um bisturi, as peles foram removidas das orelhas. Em seguida, com o auxílio de uma tesoura, a camada adiposa foi retirada. Após todo o processo de limpeza, as peles foram cortadas em forma de círculos (aproximadamente 2 cm²) e armazenadas no congelador (-4° C) por até dois meses até o uso nos experimentos de permeação cutânea.



Figura 9: Retirada da pele da orelha suína para ser usada em ensaios de permeação. Fonte: adaptado ÂNGELO, 2018.

4.4.2. Separação das camadas da pele

Para separar as camadas da pele (estrato córneo, folículo piloso e pele remanescente) tanto para padronização e validação da quantificação do fármaco quanto após os experimentos de permeação, a técnica de *differential stripping* foi utilizada (Figura 10). Em resumo, cada fragmento de pele (2 cm²) foi colocado em um suporte de isopor coberto com papel alumínio e fixado com o auxílio de alfinetes. Primeiramente o estrato córneo foi retirado utilizando 10 pedaços de fita adesiva. Depois foi colocada uma gota de cola de cianoacrilato na superfície da pele e, em seguida, um pedaço de fita adesiva sobre ela. Após a secagem da cola (aproximadamente 2 minutos) a fita foi removida, removendo os folículos pilosos. Esse procedimento foi repetido mais uma vez para assegurar que todo o conteúdo folicular fosse removido. A pele remanescente foi cortada em pequenos pedaços.

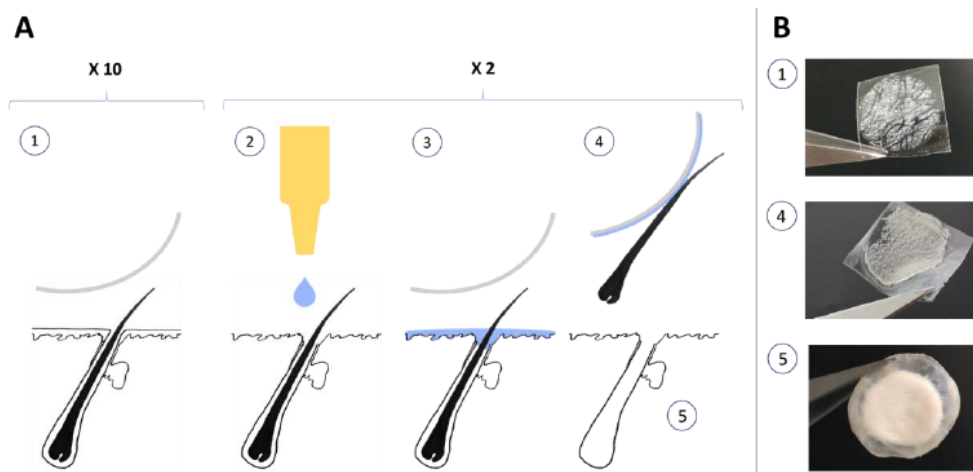


Figura 10: Esquema representativo da técnica de *tape stripping* diferencial (A) e fotografias (B) da técnica de *tape stripping*. Dez fitas adesivas foram utilizadas para remover o estrato córneo (1). O conteúdo do folículo piloso foi removido com o auxílio de cola de cianoacrilato e fita adesiva (2-4). A pele remanescente foi obtida após as bordas da área delimitada serem cortadas. Fonte: ÂNGELO, 2018.

4.4.3. Preparo dos extratos das camadas da pele

Depois da separação por *differential stripping*, cada camada da pele foi colocada em um pequeno frasco âmbar e foi submetida ao processo de extração (Figura 11). Para isso 5 mL de metanol foram colocados dentro de cada frasco fechando em seguida com uma tampa própria. As dispersões foram deixadas *overnight* em repouso e após esse tempo, o conteúdo extraído foi filtrado utilizando um filtro de seringa com poro de 0,45 μm e armazenado em geladeira ($\pm 4^\circ \text{C}$).

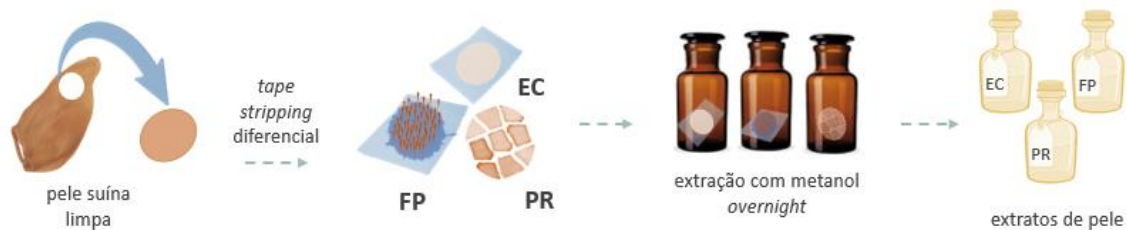


Figura 11: Esquema representativo do processo de preparação dos extratos de pele. Depois da limpeza da pele de porco, a técnica de *tape stripping* diferencial foi empregada, resultando na separação das três camadas da pele: estrato córneo (EC), folículo piloso (FP) e pele remanescente (PR). Após o processo de separação cada matriz foi acondicionada em um frasco contendo metanol para que fosse feita a extração. Ao final, os extratos obtidos foram armazenados em geladeira.

4.5. Ovos de galinha embrionados

Os ovos de galinha foram obtidos na granja Avifran (Planaltina, Brasil) no décimo dia de incubação. 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 12).

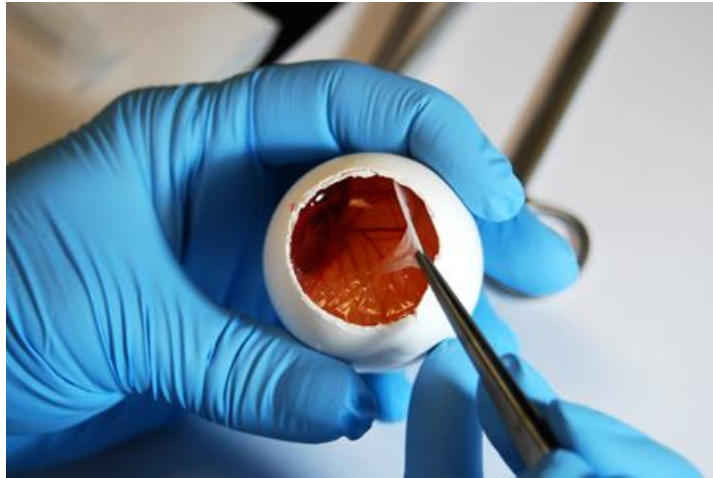


Figura 12: Ovo de galinha embrionado no décimo dia de incubação depois da remoção da casca para visualização da membrana corioalantoide. Fonte: <https://grupoinvestiga.com/>.

5. METODOLOGIA

5.1. MÉTODO ANALÍTICO

5.1.1. Parâmetros cromatográficos

A detecção e quantificação dos analitos latanoprosta e minoxidil foi realizada por LC-MS (cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas, do inglês *liquid chromatography mass spectrometry*) em um equipamento da Shimadzu, modelo 2020 (Kyoto, Japão), conectado a gerador de gás nitrogênio modelo Genius NM32LA (Peak Scientific, Reino Unido) e bomba de vácuo mecânica (Edwards, Burgess Hill, Inglaterra). O espectrômetro de massas possui fonte de ionização *dual-spray* acoplado ao sistema de cromatografia líquida. Para as análises, foi selecionado o modo de ionização positivo por eletrospray (ESI+). A aquisição de dados, análises e relatórios foram realizados usando o software *Shimadzu LC Solution*.

Como fase estacionária, foi utilizada uma coluna de fase reversa C₁₈ (4.6 x 150 mm; Shim-pack, Shimadzu). A fase móvel foi composta de (A) água com 0,1% v/v de ácido fórmico e (B) acetonitrila com 0,1% (v/v) de ácido fórmico em sistema de eluição por gradiente de concentração com vazão igual a 0,5 mL/min. O sistema de gradiente foi programado conforme descrito na Tabela 1 e demonstrado no gráfico apresentado na Figura 13. O forno foi mantido a 30° C durante todas as análises e o volume de injeção de cada amostra foi de 2 µL.

Tabela 1: Parâmetros obtidos para a eluição dos fármacos minoxidil e latanoprosta por gradiente em LC-MS. Fase móvel A = água ultrapura com 0,1% de ácido fórmico; Fase móvel B = acetonitrila com 0,1% de ácido fórmico.

| Tempo | Vazão (mL/min) | Fase móvel A (%) | Fase móvel B (%) |
|-------|----------------|------------------|------------------|
| 0,01 | 0,5 | 80 | 20 |
| 4,00 | 0,5 | 80 | 20 |
| 4,10 | 0,5 | 30 | 70 |
| 9,00 | 0,5 | 30 | 70 |
| 10,00 | 0,5 | 30 | 70 |
| 10,10 | 0,5 | 80 | 20 |
| 15,00 | 0,5 | 80 | 20 |

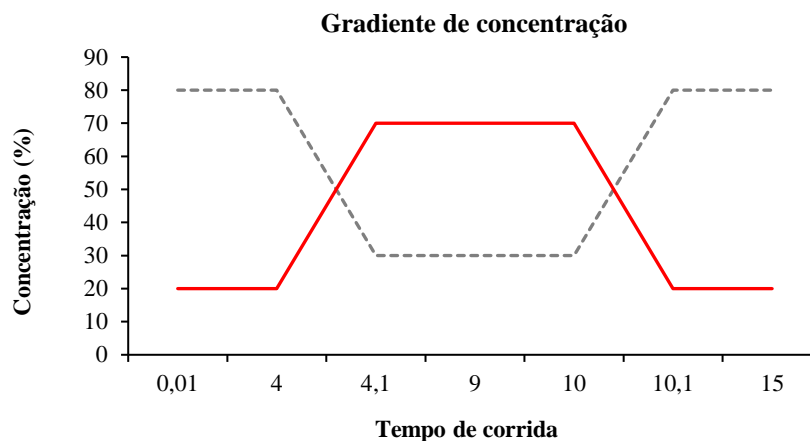


Figura 13: Gráfico demonstrando a variação de concentração de água com 0,1% de ácido fórmico (linha tracejada) e de acetonitrila com 0,1% de ácido fórmico (linha contínua) ao longo do tempo de eluição dos fármacos minoxidil e latanoprost por gradiente em LC-MS.

5.1.2. Preparo das soluções estoque

Foram preparadas, em triplicata, soluções estoque em metanol para cada analito de interesse, partindo-se de pesagens independentes dos fármacos, na concentração de 100 µg/mL. Essas soluções foram armazenadas em geladeira ($\pm 4^\circ \text{C}$) e, posteriormente, utilizadas para preparo das curvas de calibração.

5.2. VALIDAÇÃO DO MÉTODO BIOANALÍTICO

O método foi validado observando as diretrizes dos principais órgãos normativos: *International Conference of Harmonisation (ICH)*, da *Food and Drug Administration (FDA)* e da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Foram considerados os parâmetros de seletividade, linearidade (efeito matriz), limite de detecção, limite de quantificação, precisão e exatidão de métodos analíticos e bioanalíticos (BRASIL, 2012a; FDA, 2018; ICH, 2019). **Seletividade**

A seletividade do método analítico desenvolvido por LC-MS foi garantida através do monitoramento de razões massa-carga (m/z) específicas para cada fármaco. O espectrômetro de massas permite identificar as espécies correspondentes a cada pico cromatográfico através do seu espectro de massas único, garantindo a seletividade intrínseca da técnica (WILLE et al., 2012; WONG; MACLEOD, 2009). Desta forma, para

a verificação da seletividade, as razões m/z selecionadas foram: 210,1 e 193,1 para o minoxidil (DE ORSI et al., 2008), e 433,3 e 397,3 para a latanoprostá (RODRIGUEZ-ALLER et al., 2015). Foram monitorados dois íons para cada um dos fármacos sendo os primeiros relativos aos íons principais (210,1 e 433,3) e os seguintes relativos aos fragmentos (193,1 e 397,3) obtidos na fonte após a ionização por eletrospray.

Para certificar que os extratos de pele e o tampão fosfato não iriam interferir na quantificação dos fármacos, amostras com essas matrizes sem a presença dos analitos (solução branco) foram analisadas.

5.2.2. Linearidade

A linearidade do método foi avaliada a partir das soluções estoques dos analitos, que foram diluídas em metanol para a obtenção de amostras em diferentes concentrações para cada um dos fármacos: minoxidil (0,05; 0,1; 0,2; 0,5; 0,8 e 1,0 $\mu\text{g/mL}$) e latanoprostá (0,1; 0,5; 1,0; 2,0; 3,0 e 5,0 $\mu\text{g/mL}$). Foram então construídas curvas analíticas em triplicata para cada um dos fármacos.

Tendo em vista o efeito matriz na detecção dos fármacos por espectrometria de massas (MIZUNO et al., 2017), fez-se necessário analisar a linearidade do método frente aos possíveis interferentes presentes em cada matriz em que os fármacos estiverem (FDA, 2018). Para isso, além da curva em solvente metanol, foram construídas outras quatro curvas de calibração utilizando-se como solventes os extratos metanólicos das frações da pele (estrato córneo, folículo piloso e pele remanescente) obtidos conforme descrição no item 4.4.3 e, também, uma solução tampão fosfato 0,1 M com 2,5% (p/v) de Tween 80[®].

Portanto, no total, cinco curvas, em triplicata para cada concentração, foram preparadas a partir da solução estoque de cada fármaco. As curvas analíticas foram obtidas de forma independente para cada fármaco, relacionando-se a área do pico gerado pelo equipamento com a respectiva concentração dos analitos. Os dados foram ajustados pelo método de regressão linear, resultando em uma reta no formato $y = ax + b$, em que (a) corresponde ao coeficiente angular da reta e (b) ao coeficiente linear. As faixas lineares foram calculadas utilizando-se o coeficiente de correlação linear (r), e o método foi considerado linear ou não de acordo com o parâmetro mínimo aceitável de $r = 0,99$ (BRASIL, 2012a).

O efeito de matriz (*Ef*) que os contaminantes poderiam exercer sobre as análises dos fármacos de interesse foi analisado por meio de um cálculo teórico (BIE et al., 2012) usando a Equação 1.

$$Ef = \frac{S_{matriz} - S_{solvente}}{S_{solvente}} \times 100$$

Equação 1

onde: *Smatriz* é o coeficiente angular da curva de calibração do analito na matriz, e *Ssolvente* é o coeficiente angular da curva de calibração do analito no solvente.

5.2.3. Limites detecção e de quantificação

O limite de detecção (LD) corresponde à menor concentração de analito que pode ser detectada, mas não necessariamente quantificada. Já o limite de quantificação (LQ) corresponde à menor concentração de um analito que pode ser quantificada com precisão e exatidão. Ambos os valores foram determinados por cálculos teóricos (ICH, 2005) a partir de cada uma das curvas de calibração, de acordo com as Equações 2 e 3:

$$LD = 3,3 \times \frac{\sigma}{S}$$

Equação 2

$$LQ = 10 \times \frac{\sigma}{S}$$

Equação 3

onde σ é o desvio padrão dos valores de intercepção do eixo *y*, e *S* é o coeficiente angular.

5.2.4. Precisão

A precisão do método foi avaliada em termos da repetibilidade e da precisão intermediária. A repetibilidade (intra-ensaio) foi verificada a partir de amostras preparadas em três níveis de concentração das curvas de calibração para cada analito. Para o minoxidil foram preparadas as seguintes concentrações: 0,1; 0,5 e 1,0 µg/mL. Para a latanoprostá foram preparadas as seguintes concentrações: 0,5; 2,0 e 5,0 µg/mL. O

ensaio foi realizado em triplicata. Já a precisão intermediária (inter-ensaio) foi avaliada em dois dias diferentes no mesmo equipamento e por analistas distintos. As mesmas concentrações foram utilizadas e o ensaio também foi realizado em triplicata.

Os resultados de precisão foram expressos por meio do coeficiente de variação (CV), calculado de acordo com a Equação 4 (ICH, 2019):

$$CV = \left(\frac{\sigma}{\text{média}} \right) \times 100$$

Equação 4

onde: σ é o desvio padrão da média dos resultados obtidos.

5.2.5. Exatidão

A exatidão do método foi avaliada em termos da porcentagem de recuperação dos fármacos das camadas da pele (estrato córneo, folículo piloso e pele remanescente) previamente contaminadas com concentrações conhecidas deles (ICH, 2005).

A técnica de *differential stripping*, descrita no item 4.4.2, foi utilizada para separar as camadas da pele. Depois, cada camada foi acondicionada separadamente em frascos de vidro. A esses frascos foram adicionados diferentes volumes das soluções estoque (100 $\mu\text{g/mL}$ em metanol) dos fármacos a fim de atingir determinadas concentrações de minoxidil (0,1, 0,5 e 1,0 $\mu\text{g/mL}$) e latanoprost (0,5, 2,0 e 5,0 $\mu\text{g/mL}$). Em seguida, após a total evaporação do solvente, foram adicionados 5 mL de metanol a esses frascos e o processo de extração (item 4.4.3) foi realizado por aproximadamente 12 h (*overnight*) sem agitação das amostras e sob temperatura ambiente.

Após a extração, as amostras foram filtradas e analisadas seguindo-se o método analítico proposto por LC-MS. As análises foram realizadas em triplicata para cada camada da pele e para cada concentração testada. A recuperação foi determinada a partir do cálculo da razão entre a concentração mensurada dos fármacos e a concentração teórica (Equação 5).

$$\text{Recuperação (\%)} = \left(\frac{\text{Concentração}_{\text{mensurada}}}{\text{Concentração}_{\text{teórica}}} \right) \times 100$$

Equação 5

5.2.6. Estabilidade analítica

A estabilidade dos fármacos nas amostras armazenadas depois do preparo foi avaliada a fim de certificar a integridade dos fármacos (BRASIL, 2012a; ICH, 2019). Foram preparadas amostras contendo os dois fármacos em suas concentrações nominais (0,5 µg/mL para o minoxidil e 2,0 µg/mL para a latanoprost) a partir de diluições das soluções estoque usando metanol, extratos de pele (estrato córneo, folículo piloso e pele remanescente) ou solução de tampão. As amostras foram então armazenadas em geladeira (± 4 °C) e analisadas por LC-MS nos tempos 0, 1, 2, 7, 15 e 30 dias.

5.3. ESTUDO DE COMPATIBILIDADE ENTRE OS FÁRMACOS

5.3.1. Análise térmica

A caracterização térmica para verificação da compatibilidade entre o minoxidil e a latanoprost foi realizada por meio de análise térmica diferencial (DTA) e de análise termogravimétrica (TGA) usando um equipamento DTG-60H (Shimadzu, Japão) e o *software* TA-60. Para os ensaios foram usados como amostras os fármacos isolados e a mistura física de minoxidil e latanoprost em igual proporção (p/p). As amostras foram então pesadas (aproximadamente 4 mg) em cadinhos de platina mantidos no equipamento em atmosfera de nitrogênio com vazão de 50 mL/min e velocidade de aquecimento de 10° C/min no intervalo entre 25 a 500° C.

5.3.2. Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR)

Para caracterizar as estruturas moleculares e elucidar as interações entre o minoxidil e a latanoprost, foram feitos estudos de espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR - *Fourier transform infrared spectroscopy*). As análises foram feitas no equipamento Spectrum 100 (PerkinElmer, EUA). Os espectros foram registrados em comprimentos de onda que variaram de 4000 a 400 cm⁻¹ com uma resolução de 4 cm⁻¹. Para as análises, foram utilizadas como amostras os fármacos separadamente e a mistura física do minoxidil e latanoprost na mesma proporção usada para produzir os nanocarreadores lipídicos (40:1 p/p).

5.4. OBTENÇÃO DOS NANOCARREADORES LIPÍDICOS

Os nanocarreadores lipídicos foram obtidos pela técnica de microemulsificação com pequenas modificações, usando uma metodologia já descrita na literatura (ANDRADE et al., 2016). Para obtenção dos nanossistemas, 10 mg de latanoprosta foram misturados a 350 mg de Compritol[®] (behenato de glicerila), 50 µL de Miglyol[®] 812N (triglicerídeos dos ácidos cáprico e caprílico), 140 µL de Tween[®] 80 (polissorbato 80), 60 µL de Span[®] 85 (trioleato de sorbitano). Essa mistura foi aquecida a 70° C sob agitação a 200 rpm.

Após atingir a temperatura, foram adicionados 100 mg de CPC (cloreto de cetilpiridínio) e 250 µL de água ultrapura na mesma temperatura (70° C). Em seguida, foram adicionados 400 mg de minoxidil à mistura que foi homogeneizada e a mantida sob agitação magnética até atingir uniformidade.

A mistura foi então gotejada em 14 mL de tampão fosfato, pH 7.4, gelado (4° C) e todo o sistema foi homogeneizando com Ultra-Turrax T18 (IKA, Alemanha) a 13.400 rpm, por 10 minutos. Em seguida, o sistema foi levado a um sonicador (Sonics Vibra Cell, EUA) em banho de gelo por 10 minutos, com amplitude de 25 Hz, pulso ligado por 30 segundos e em repouso por 30 segundos. Por fim, o volume da formulação contendo os nanocarreadores lipídicos foi ajustado para 20 mL com tampão fosfato e homogeneizado por agitação manual.

5.5. CARACTERIZAÇÃO DOS NANOCARREADORES LIPÍDICOS

5.5.1. Distribuição de tamanho de partícula

O diâmetro hidrodinâmico médio e a distribuição do tamanho das nanopartículas (índice de polidispersividade – PdI) foram analisados no equipamento Zetasizer Nano ZS (Malvern, EUA) por meio da técnica de espalhamento dinâmico de luz. Para isso, 20 µL da formulação foram suspensos em 980 µL de água e levados ao aparelho para análise.

5.5.2. Potencial zeta

O potencial zeta foi medido por mobilidade eletroforética, utilizando o aparelho Zetasizer Nano ZS (Malvern, EUA). Para avaliação desse parâmetro, 20 µL da formulação foram suspensos em 980 µL de água e a suspensão resultante foi analisada.

5.5.3. Eficiência de encapsulação

A eficiência de encapsulação (EE) de cada fármaco nos nanocarreadores lipídicos foi calculada por meio da Equação 6 abaixo (CZAJKOWSKA-KOŚNIK; SZEKALSKA; WINNICKA, 2019; GOMES et al., 2014; MAKONI; KASONGO; WALKER, 2019). Para tanto foi determinada a concentração de fármaco livre nas amostras, ou seja, a quantidade de fármaco que não esteve associada aos nanocarreadores lipídicos, e comparada à concentração inicial de fármaco na amostra (fármaco total). Assim, amostras de 500 µL da formulação dos nanossistemas foram colocadas em dispositivo de ultrafiltração Vivaspin® 2 (Sartorius, Alemanha) com membrana de 10.000 MWCO HY. As amostras foram centrifugadas por 20 minutos a 4500 rpm. Ao final, uma diluição (1:1000, v/v) do filtrado foi realizada com metanol para quantificar o minoxidil e o restante do filtrado foi analisado diretamente para quantificação da latanoprost, ambos em LC-MS.

$$EE (\%) = \left[\frac{(Fármaco_{total} - Fármaco_{livre})}{Fármaco_{total}} \right] \times 100$$

Equação 6

A fim de assegurar que a membrana utilizada no dispositivo de ultrafiltração não interagia com os fármacos, foi realizada uma validação do método. Para isso, uma solução contendo os fármacos livres em concentrações conhecidas foi submetida ao processo de filtração. Ao final do processo, essas soluções foram quantificadas em LC-MS e verificou-se que não houve interação dos fármacos com a membrana do sistema filtrante, certificando que o método é adequado para o objetivo proposto.

5.5.4. Morfologia

Para caracterização morfológica, os nanocarreadores lipídicos foram analisados em Microscópio Eletrônico de Varredura (MEV) JSM-700IF e Microscópio Eletrônico de Transmissão (MET) JEM-1011 (JEOL, Japão) do Laboratório de Microscopia e Microanálise (LMM) do IB/UnB. Para o preparo as amostras, elas foram diluídas numa proporção de 1:100 (v/v) em água destilada. Alíquotas de 20 µL foram depositadas sobre os suportes para análise.

Para análise no MEV, as amostras diluídas foram depositadas em uma lamínula de vidro posicionada sobre um suporte de metal. Após a secagem em temperatura ambiente as amostras foram metalizadas com ouro e analisadas em magnitudes de até 20.000 vezes de aumento.

Para análise no MET, as amostras diluídas foram depositadas em grades de cobre revestidas de resina “formvar”, e deixadas em temperatura ambiente por 10 minutos para secar. O excesso das formulações foi retirado com papel filtro. Em seguida foram adicionados 20 µL de acetato de uranila (3%) e após 10 minutos em temperatura ambiente para secar, o excesso foi removido com papel filtro. As nanoestruturas foram então levadas ao equipamento e analisadas em magnitudes de até 20.000 vezes de aumento.

5.5.5. Análise de pH

O pH da formulação contendo os nanocarreadores lipídicos em meio tampão fosfato foi determinado utilizando um medidor de pH digital Digimed DM-22 (Digimed Analytica, São Paulo, Brasil). Soluções tampão padrão (pH 4,01 e 6,86) foram usadas para calibrar o instrumento antes das medições.

5.6. ESTUDOS DE ESTABILIDADE

A estabilidade físico-química dos nanocarreadores lipídicos foi determinada por análise de três alíquotas das nanoformulações armazenadas sob refrigeração ($\pm 4^\circ \text{C}$) nos dias 0, 7, 15, 30, 60 e 90. As análises foram realizadas no aparelho Zetasizer Nano ZS (Malvern, EUA), observando possíveis variações no diâmetro hidrodinâmico médio das nanopartículas, PDI e potencial zeta. Foram avaliadas também as alterações no teor dos fármacos encapsulados nos nanocarreadores lipídicos (minoxidil e latanoprost) conforme descrito no item 5.5.3.

5.7. ESTUDO DO POTENCIAL IRRITATIVO DA NANOFORMULAÇÃO

5.7.1. Ensaio HET-CAM

Foi realizado o ensaio HET-CAM (do inglês, *hen's egg-chorioallantoic membrane test*) que utiliza a membrana corioalantoide de ovos de galinha embrionados no décimo dia de incubação para avaliar o potencial irritativo das formulações. O ensaio corresponde

a uma adaptação do método descrito por Luepke em 1985 (LUEPKE, 1985), utilizado pela legislação europeia, e indicado também no Brasil pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (BRASIL, 2012b), para avaliação de segurança de diferentes produtos cosméticos e farmacêuticos.

No décimo dia de incubação, a casca do ovo ao redor da câmara de ar foi retirada dando acesso a membrana da casca. Essa membrana foi então removida cuidadosamente fazendo com que a membrana cório-alantoide ficasse exposta (Figura 14). Sobre a membrana cório-alantoide foram adicionados 300 μ L da formulação contendo os nanocarreadores lipídios ou dos controles positivo (NaOH 1 mol/L) e negativo (NaCl 0,9%). Os ensaios foram realizados em triplicada para cada amostra.



Figura 14: Ovo de galinha embrionado no décimo dia de incubação depois da remoção da casca para visualização da membrana corioalantoide. Fonte: (QUINTÃO, 2018).

Após 20 segundos de contato, a nanoformulação e controles foram retirados, foi feita uma lavagem com soro fisiológico e a membrana cório-alantoide foi examinada por 5 minutos para verificar a ocorrência de hiperemia, hemorragia ou coagulação/opacidade especificamente nos tempos 0,5; 2 e 5 minutos. O tempo necessário (em minutos) para provocar qualquer um desses eventos foi anotado e o índice de irritabilidade foi obtido de acordo com a pontuação descrita na Tabelas 2 e classificação descrita na Tabela 3.

Tabela 2: Escala para teste de HET-CAM conforme efeitos observados ao longo de 5 minutos (LUEPKE, 1985).

| Efeito observado | <i>Tempo (min) / Índice</i> | | |
|-------------------|-----------------------------|------------------|------------------|
| | <i>0,0 – 0,5</i> | <i>0,5 – 2,0</i> | <i>2,0 – 5,0</i> |
| Hiperemia | 5 | 3 | 1 |
| Hemorragia | 7 | 5 | 3 |
| Coagulação | 9 | 7 | 5 |

Tabela 3: Classificação final das formulações quanto ao seu potencial de irritabilidade HET-CAM (LUEPKE, 1985).

| 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) |

5.7.2. Ensaio com epiderme humana reconstruída

O potencial irritativo da formulação contendo os nanocarreadores lipídicos com minoxidil e latanoprostá foi também verificado através de um estudo *in vitro* utilizando epiderme humana reconstruída, uma cultura organotípica que é histologicamente semelhante à epiderme humana *in vivo*. O ensaio segue as diretrizes da OECD (do inglês, *Organisation for Economic Cooperation and Development*) descritas no teste n°439 – *In Vitro Skin Irritation: Reconstructed Human Epidermis Test Method* (OECD, 2019).

A epiderme humana reconstruída, fornecida pela EpiSkin™, foi transferida da placa de gel de agarose para placas de 24 poços contendo meio de cultura fresco, 300 µL por poço. Após 24 horas da transferência, foram colocados sob a epiderme 16 µL da formulação contendo os nanocarreadores lipídicos. Como controle positivo foi utilizado 16 µL de dodecil sulfato de sódio (SDS) a 5% (v/v) e como controle negativo foi utilizado 16 µL de solução salina (NaCl) a 0,9% (v/v). As amostras ficaram em contato com a epiderme humana construída por 42 minutos em estufa mantida com 5% de CO₂, temperatura de 37 °C e 95% de umidade. Em seguida foi realizado um processo de lavagem do material em cada um dos poços com 1 mL de solução salina repetindo a lavagem por 25 vezes. Depois da lavagem, a placa contendo as amostras de epiderme foi colocada em estufa (5% de CO₂, 37 °C e 95% de umidade) por mais 42 horas.

Após o tempo de recuperação, foi realizado o ensaio colorimétrico de MTT para avaliar a viabilidade celular. Em resumo, as amostras de epiderme tratadas com a formulação e os controles foram transferidas para outra placa de 24 poços contendo 300 µL de MTT a 1 mg/mL. As placas foram colocadas na estufa (5 % de CO₂, 37 °C e 95 %) para incubação por 2 horas. Depois da incubação, foram adicionados 750 µL de

isopropanol aos poços para extração dos cristais de formazan e posterior leitura a 570 nm em espectrofotômetro de microplacas (Bio-Tec PowerWave, HT, EUA). O estudo foi realizado em triplicata para cada amostra e o resultado foi baseado na densidade óptica (absorbância) obtida de cada amostra deduzida da densidade óptica do branco (isopropanol). São classificados como irritantes as amostras que reduzem em 50% ou mais a viabilidade celular quando comparada a viabilidade celular do controle negativo (composto não irritante).

5.8. ESTUDOS *IN VITRO* DE LIBERAÇÃO

5.8.1. Seleção do meio receptor

Para os experimentos *in vitro* de liberação e penetração cutânea foi necessário selecionar um meio para funcionar como solução receptora. Recomenda-se que o meio selecionado seja similar ao encontrado em condições fisiológicas e que garanta as condições *sink* nos experimentos. Ou seja, precisa-se garantir que o meio não sature impedindo a difusão dos fármacos.

Visto que a latanoprostá não é solúvel em água, foi preciso realizar um ensaio de solubilidade. Para isso, um excesso (até a saturação) de ambos os fármacos (latanoprostá e minoxidil) foi adicionado em frascos contendo tampão fosfato 0,1M (pH 7.4) com Tween 80® nas concentrações 1,0; 2,5 ou 5% (m/v). Após a adição, os frascos foram fechados e deixados sob agitação magnética a 500 rpm por 24 horas em temperatura ambiente. Depois desse tempo, o excesso dos fármacos decantou, o sobrenadante foi filtrado e a amostra foi quantificada por LC-MS. As amostras foram avaliadas em triplicata para cada condição.

5.8.2. Ensaio *in vitro* de liberação dos fármacos

Os perfis de liberação da latanoprostá e do minoxidil a partir dos nanocarreadores lipídicos e da solução controle (fármacos livres) foram determinados *in vitro* usando células de difusão modificadas do tipo Franz (Figura 15).

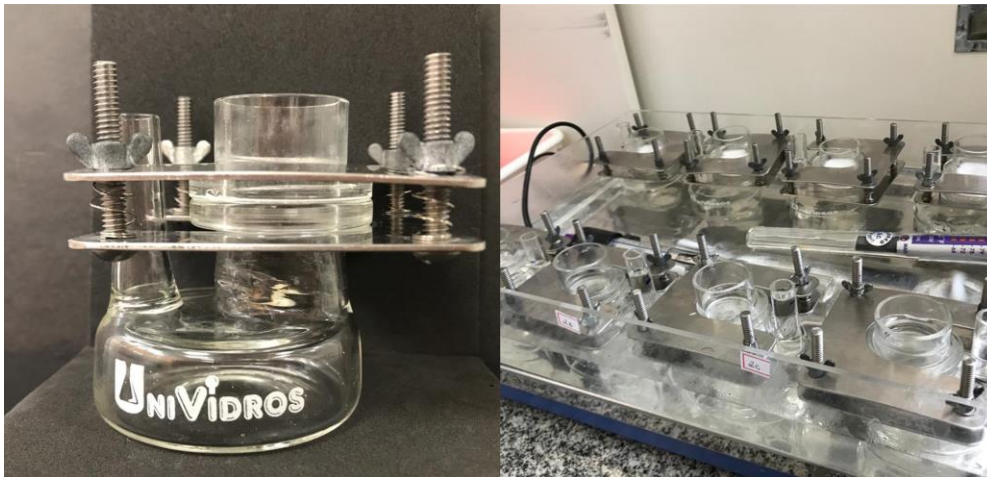


Figura 15: Célula de difusão modificada do tipo Franz montada com membrana sintética separando o compartimento doador do receptor para realização dos ensaios *in vitro* de liberação em banho aquecido com termostato.

Para o ensaio, uma membrana sintética de celulose (*SnakeSkin*TM, 10.000 MWCO, Thermo Scientific, EUA) foi posicionada entre o compartimento doador e receptor da célula de Franz. O compartimento receptor foi preenchido com 60 mL de solução tampão fosfato com 2,5% de Tween 80[®], enquanto no compartimento doador foi colocado 1 mL da formulação contendo os nanocarreadores ou do controle contendo os fármacos livres em solução na mesma concentração.

Amostras (1 mL) da solução receptora foram coletadas em intervalos de tempo definidos, filtradas, diluídas em metanol (1:100 v/v) e levadas para serem quantificadas por LC-MS. À medida que as amostras eram coletadas, o mesmo volume de solução tampão era repostado no compartimento receptor. Durante todo o ensaio as células foram mantidas em banho aquecido por termostato ($30 \pm 2^\circ \text{C}$) e a solução receptora foi mantida sob agitação magnética constante a 500 rpm. Cada formulação foi testada com quatro replicatas.

O perfil de liberação da latanoprostá e do minoxidil a partir dos nanocarreadores lipídicos foi analisado em comparação ao controle por meio de métodos gráficos que relacionaram a porcentagem de fármaco liberado em relação ao total de fármaco colocado no compartimento doador em função do tempo.

5.9. ESTUDOS *IN VITRO* DE PENETRAÇÃO CUTÂNEA

Os estudos *in vitro* de penetração cutânea foram conduzidos por 24 horas em células de difusão do tipo Franz modificadas (Figura 16).



Figura 16: Células de difusão modificada do tipo Franz a pele de orelha de porco separando o compartimento doador do receptor para realização do ensaio *in vitro* de penetração cutânea em banho aquecido com termostato.

A pele suína foi colocada entre os compartimentos doador (superior) e receptor (inferior) das células. Amostras (1 mL) da formulação desenvolvida contendo os nanocarreadores lipídicos ou do controle contendo os fármacos livres em solução na mesma concentração (2% de minoxidil e 0,05% de latanoprost) foram colocadas no compartimento doador. O compartimento receptor foi preenchido com 15 mL de tampão fosfato 0,1M (pH 7.4) contendo 2,5% de Tween 80[®] (p/v). A solução receptora foi mantida sob agitação magnética constante a 500 rpm em banho aquecido por termostato ($30 \pm 2^\circ \text{C}$). Cada formulação foi testada em cinco replicatas.

Alternativamente, uma segunda série de experimentos de penetração cutânea foi realizada com a formulação contendo os nanocarreadores lipídicos seguindo a mesma metodologia descrita anteriormente. Porém, antes do início do ensaio, uma alíquota da formulação (500 μL) foi colocada sob a pele e o local foi massageado por 3 minutos com movimentos circulares em um único sentido usando o dedo indicador (ANGELO et al., 2020; OLIVEIRA et al., 2020a). Após a aplicação da massagem, a pele foi posicionada na célula de Franz, mais 500 μL da formulação foram colocados sobre a pele e o ensaio foi realizado da mesma forma que o anterior.

Ao final dos experimentos foram coletadas amostras da solução receptora para posterior análise por LC-MS e as camadas da pele foram separadas utilizando a técnica de *differential stripping*. Depois de separadas, as camadas da pele (estrato córneo, folículo piloso e pele remanescente) foram colocadas em pequenos frascos e submetidas ao processo de extração como descrito anteriormente no item 4.4.3. Após o processo de extração, as amostras foram filtradas e levadas para serem quantificadas por LC-MS.

Os dados de quantidade de cada fármaco recuperado de cada camada de pele tratada tanto com as nanopartículas lipídicas quanto com a solução controle, com e sem massagem, foram plotados em gráficos de barras. A partir desses dados, foi feito um cálculo para determinar o fator de direcionamento dos fármacos para os folículos pilosos para cada formulação e condição testada (TOLENTINO et al., 2020). O cálculo foi feito com base na seguinte equação:

$$\text{Fator de direcionamento} = \left(\frac{Q_{FP}}{Q_{EC} + Q_{FP} + Q_{PR}} \right)$$

Equação 7

onde: Q_{FP} é a quantidade de fármaco acumulada nos folículos pilosos, Q_{EC} é a quantidade de fármaco retida no estrato córneo e Q_{PR} quantidade de fármaco acumulada na pele remanescente.

5.10. ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS DADOS

Os dados quantitativos estão apresentados nas Tabelas e Figuras como média \pm desvio padrão da média de, no mínimo, três replicatas. A análise estatística dos dados foi realizada com a utilização do programa GraphPad Prism 6.0. Diferenças significativas entre conjuntos de dados foram verificadas por análise de variância *one way*, seguido de teste de Tukey com comparação múltipla dos dados. O nível de significância estatística foi aceito como $p < 0,05$.

6. RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1. DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DO MÉTODO ANALÍTICO

Para as etapas de desenvolvimento e avaliação de desempenho de novas formulações é necessário utilizar um método adequado para quantificar os fármacos nelas incorporados. Esse método deve ser capaz de separar os analitos (fármacos) de interesse de possíveis interferentes contidos tanto na formulação, quanto nas matrizes biológicas de onde eles serão extraídos. No caso deste estudo, os principais interferentes estiveram presentes na pele quando se analisou os dados dos ensaios de penetração cutânea.

Apesar de já existirem na literatura vários artigos que fornecem metodologias para a quantificação de minoxidil sulfato em formulações farmacêuticas na pele (GELFUSO et al., 2011; MATOS et al., 2015a), não há nenhum método descrito para o mesmo fim com a latanoprosta. É possível encontrar alguns trabalhos que analisaram latanoprosta em produtos farmacêuticos e em matrizes biológicas (PATEL; PATEL; GIRAM, 2015; WALASH; EL-SHAHENY, 2016; ZAMMATARO et al., 2011). Entretanto nenhuma metodologia foi desenvolvida para quantificar latanoprosta na pele ou nos folículos pilosos, tampouco um método que quantificasse de forma simultânea os dois fármacos em associação numa mesma formulação.

Para tanto, o desenvolvimento do método analítico para quantificação simultânea dos fármacos começou através da realização de testes em HPLC-UV (Cromatografia Líquida de Alta Eficiência, do inglês: *High Performance Liquid Chromatography*, acoplada a um detector espectrofotométrico). Os resultados mostraram-se insatisfatórios pelo fato de que houve interferência da matriz biológica (pele) na quantificação dos analitos, e também porque a diferença de intensidade dos sinais era muito grande, prejudicando a resolução dos picos.

A latanoprosta tem sua absorção máxima por volta de 210 nm (WALASH; EL-SHAHENY, 2016), comprimento de onda em que normalmente ocorrem muitas interferências dos componentes da formulação e das matrizes de pele no sinal. Já o minoxidil sulfato apresenta absorção em 285 nm (MATOS et al., 2015a), sendo um comprimento de onda um pouco mais seletivo, não sendo muito influenciado por contaminantes, além de apresentar picos mais intensos. Outro problema encontrado durante as primeiras tentativas no HPLC-UV foi em relação às concentrações que se

pretendia usar nos estudos futuros: mais altas para o minoxidil sulfato e muito baixas para a latanoprost, gerando cromatogramas com picos não compatíveis em relação à intensidade dos sinais.

Na tentativa de solucionar os problemas encontrados na análise dos fármacos por HPLC-UV os estudos foram desenvolvidos com o auxílio de um LC-MS. A análise por LC-MS foi escolhida por ser a combinação de duas técnicas que permitem que os analitos de interesse sejam isolados e quantificados em misturas altamente complexas. Em resumo, a cromatografia líquida diferencia as substâncias por suas propriedades físico-químicas enquanto a espectrometria de massas diferencia as substâncias por suas massas moleculares (especificamente sua razão m/z). É esta seletividade dupla que torna a técnica LC-MS uma ferramenta analítica poderosa. O espectrômetro de massas permite identificar as espécies correspondentes a cada pico cromatográfico através do seu espectro de massas único, garantindo a seletividade intrínseca da técnica (WILLE et al., 2012; WONG; MACLEOD, 2009).

Durante o desenvolvimento do método analítico, foram testados diferentes tipos de fase móvel (água, acetonitrila e metanol), contendo ou não aditivos (ácido fórmico e ácido acético), em várias proporções e com diferentes processos de eluição – isocrático ou por gradiente de concentração. Foram necessários também inúmeros estudos e ensaios para determinar e validar a condição mais segura para quantificar os fármacos por LC-MS sem que os contaminantes das matrizes tivessem influência nas análises. Esses ensaios foram realizados de maneira empírica até se chegar a condições cromatográficas que promoveram a separação de ambos os analitos dos interferentes.

A validação do método apresentada a seguir teve como principal objetivo demonstrar por meio de verificações experimentais que os resultados analíticos produzidos são confiáveis. Além disso, objetivou também comprovar que o método é adequado à finalidade a que se destina, mediante critérios estabelecidos pela legislação vigente (BRASIL, 2017; ICH, 2005). A etapa de desenvolvimento e validação do método bioanalítico já foi publicada no *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* (OLIVEIRA et al., 2020b).

6.1.1. Seletividade

Seletividade é a capacidade de um método em distinguir e quantificar o analito de interesse, de forma inequívoca, na presença de substâncias que possam interferir nessa determinação (ICH, 2005; ANVISA, 2017). O objetivo do método proposto neste trabalho foi a quantificação de dois fármacos na presença de interferentes da pele, de modo a dar suporte a ensaios de permeação cutânea utilizados tanto no desenvolvimento, quanto no controle de qualidade de medicamentos dermatológicos. A separação de compostos promovida pela cromatografia permite a eliminação ou redução de interferentes, de forma que a informação analítica quantitativa de um ou mais analitos a partir de uma mistura complexa possa ser obtida.

A técnica LC-MS possui um alto grau de especificidade, uma vez que picos não conhecidos podem ser isolados monitorando-se apenas os valores de massa selecionados (SKOOG et al., 2005). A combinação pode fornecer também a massa molar e informação estrutural, resultando em uma análise quantitativa exata. Desta maneira, a técnica permite não só a separação de diferentes substâncias, como também a identificação desses constituintes (MIZUNO et al., 2017; SKOOG et al., 2005). Em um espectrômetro de massas, as moléculas da amostra são ionizadas e, em seguida, selecionadas pelo detector em função da razão m/z de cada íon. As fontes de ionização produzem fragmentos, os quais também podem ser ionizados, corroborando ainda mais para a alta seletividade do método, uma vez que conduzem a confirmação do analito de interesse (BILBAO et al., 2015; SKOOG et al., 2005).

O *software* que analisa os dados do equipamento gera um gráfico correlacionando a intensidade do sinal emitido pelos íons detectados *versus* a razão m/z de cada um deles. Desta forma, a seletividade é garantida devido ao monitoramento de razões m/z específicas para cada analito e pelos diferentes tempos de retenção. Na Figura 17 é possível observar os cromatogramas para o minoxidil e para a latanoprosta em uma corrida seguindo-se o método proposto, e na Figura 18 seus espectros de massa, correlacionando as razões m/z dos íons gerados.

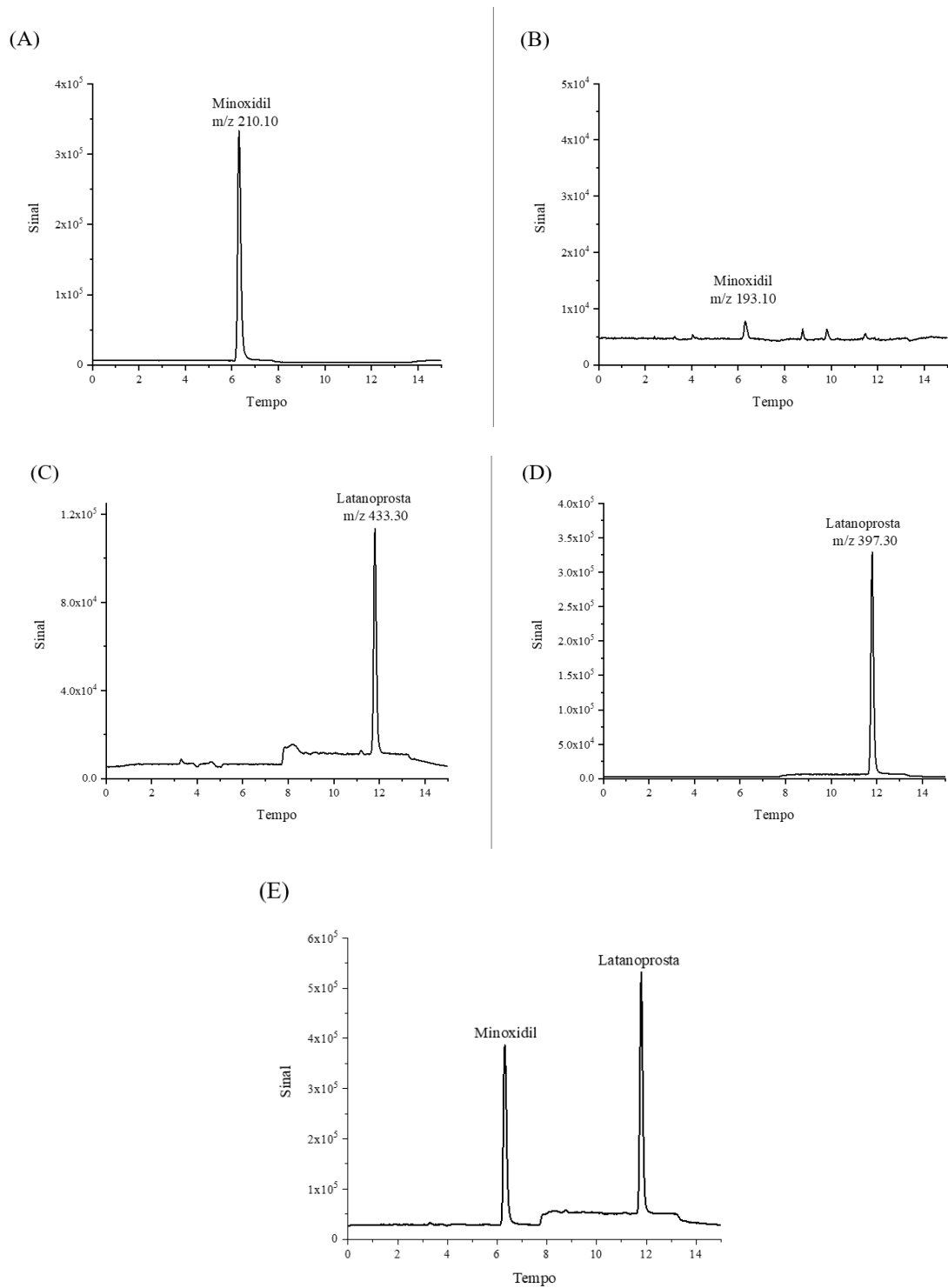


Figura 17: (A) Cromatogramas obtidos após análise do minoxidil em modo SIM para seu íon principal (m/z 210,10) e (B) seu fragmento (m/z 193,1), com tempo de retenção de 6,4 minutos. (C) Cromatogramas obtidos após análise da latanoprost em modo SIM para seu íon principal (m/z 433,3) e (D) para seu fragmento (m/z 397,3), respectivamente, com tempo de retenção de 11,8 minutos. (E) Cromatograma total obtido em modo TIC para os dois fármacos eluídos em uma mesma corrida. SIM – *selected ion mode*; TIC – *total ion chromatogram*.

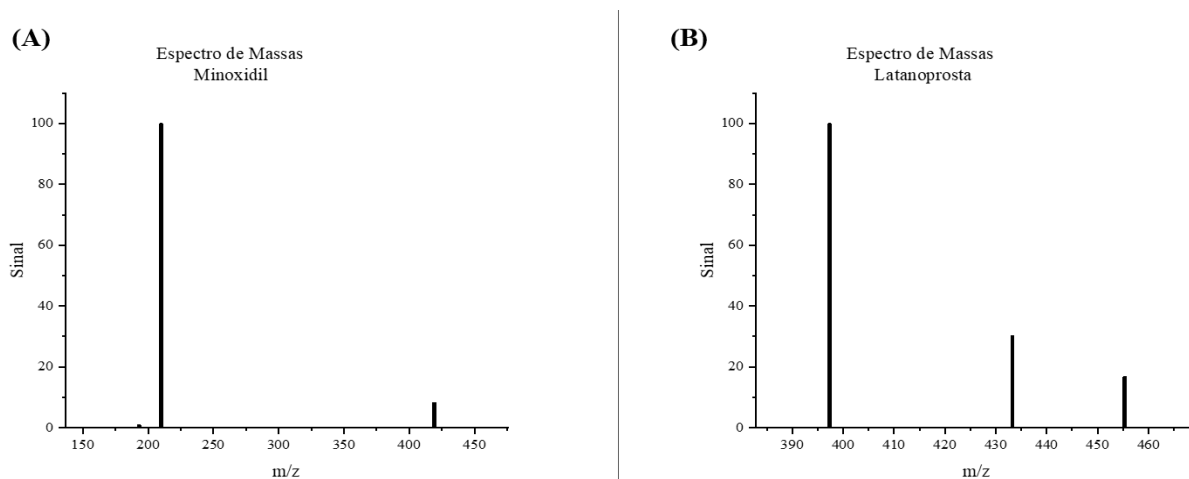


Figura 18: (A) Espectro de massas do minoxidil sulfato e (B) da latanoprostá. Os espectros de massas foram obtidos após ionização das amostras em modo positivo por eletrospray. Nas figuras estão representados os principais picos em obtidos após a análise dos fármacos em modo de varredura para verificação dos principais sinais.

A seletividade do método analítico também foi verificada através da análise dos cromatogramas dos interferentes isolados (branco) e comparando-os com os fármacos dissolvidos em metanol (Figura 19). Não foram detectados picos interferentes no mesmo tempo de retenção da latanoprostá (modo SIM m/z 433,3, Figura 19 B) após a injeção das amostras de brancos de matriz de pele (estrato córneo, folículo piloso e pele remanescente) e de solução tampão. Entretanto, ao observar os cromatogramas referentes à detecção do minoxidil (modo SIM m/z 210,1, Figura 19 A) é possível verificar que houve pequenas interferências próximas ao pico do fármaco, quase no mesmo tempo de retenção. Entretanto, essas pequenas interferências causadas pela pele serão identificadas pelo LC-MS por meio da distinção dos sinais dos analito (fármaco) dos sinais provenientes dos contaminantes (estrato córneo, folículo piloso e pele remanescente). Essa identificação ocorre devido à seletividade intrínseca da técnica usada pelo equipamento para detecção. Portanto, o método bioanalítico desenvolvido diferencia seletivamente os fármacos dos interferentes das camadas da pele e dos componentes do tampão.

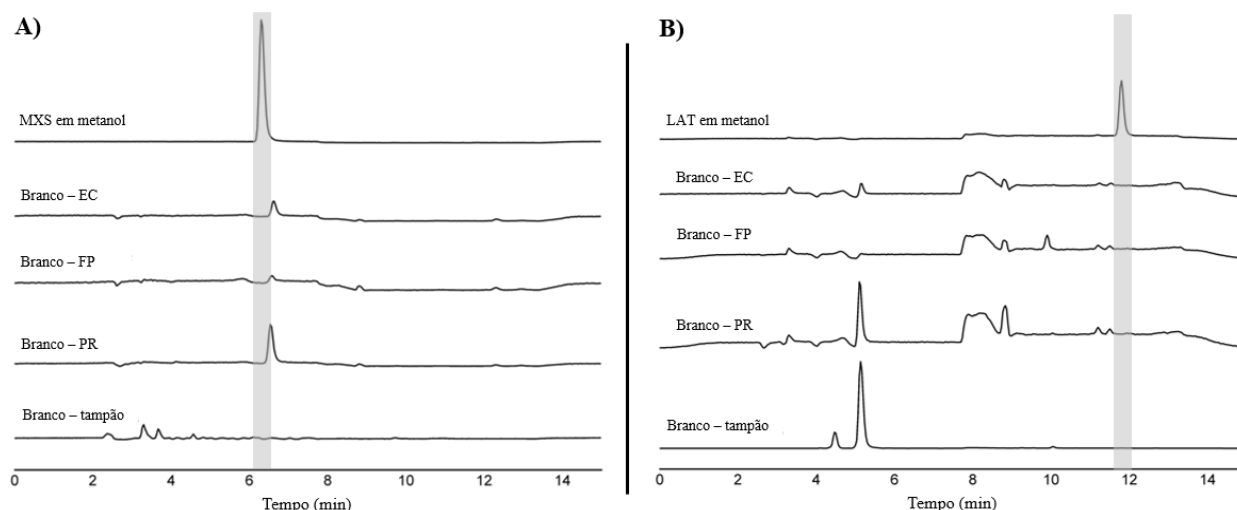


Figura 19: Esquema representando a sobreposição dos cromatogramas da injeção das amostras contendo os interferentes isolados (brancos) e dos fármacos em solvente: (A) minoxidil (m/z 210,1) e (B) latanoprost (m/z 433,3). MXS – minoxidil; LAT – latanoprost; EC – estrato córneo; FP – folículo piloso; PR – pele remanescente.

6.1.2. Linearidade

A linearidade de um método analítico corresponde à sua capacidade em obter respostas diretamente proporcionais à concentração de um analito em uma amostra, dentro de um intervalo determinado. Uma relação linear deve ser avaliada em toda a faixa estabelecida para o método (BRASIL, 2017). O cálculo de regressão linear da curva para o minoxidil sulfato dissolvido em metanol resultou na seguinte equação: $y = 3.032.329,17x + 76.612,68$. A equação obtida para latanoprost dissolvida no mesmo solvente foi: $y = 172370x + 6637,1$, em que y corresponde à área do pico e x à concentração dos fármacos em $\mu\text{g/mL}$. O coeficiente de correlação linear foi de 0,9990 para o minoxidil sulfato e 0,9994 para a latanoprost. Ambos os resultados estão de acordo com as diretrizes padronizadas tanto pela ANVISA (2017) quanto pelo ICH (2005), havendo proporcionalidade entre a área do pico e a concentração dos fármacos (Figura 20), dentro de uma faixa de concentrações definida. Os valores dos coeficientes de correlação linear também atendem aos requisitos vigentes para validação – acima de 0,99 –, assim como o coeficiente angular, que deve ser diferente de zero.

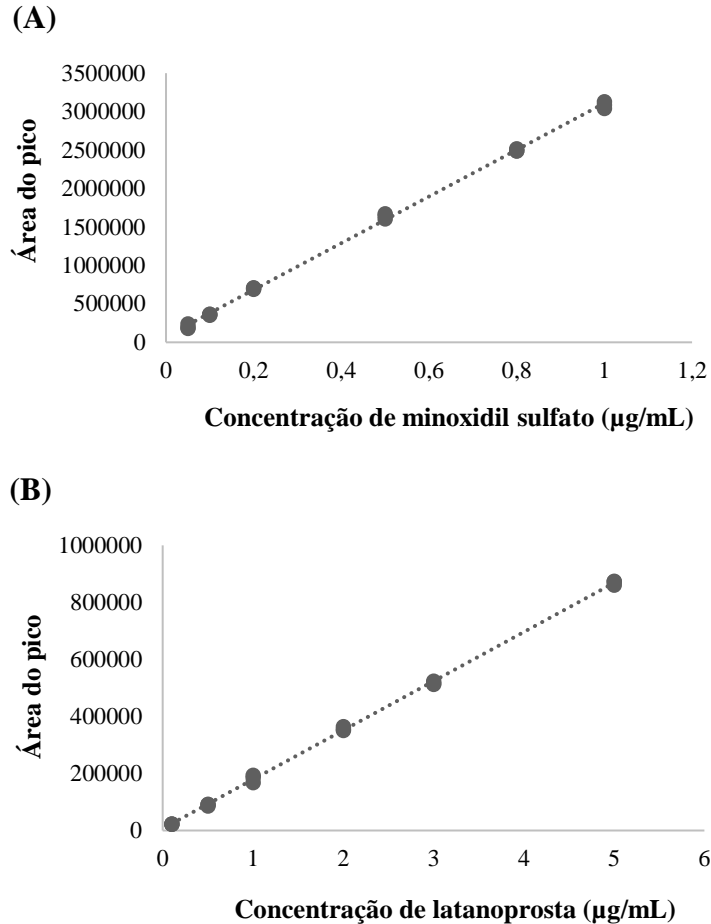


Figura 20: Curvas analíticas em metanol obtidas pela análise de uma triplicata. (A) Minoxidil sulfato na faixa de concentração de 0,05 a 1,0 µg/mL; equação da reta: $y = 3.032.329,17x + 76.612,68$; $r^2 = 0,9990$. (B) Latanoprost na faixa de concentração de 0,1 a 5,0 µg/mL; equação da reta: $y = 172370x + 6637,1$; $r^2 = 0,9994$.

O efeito matriz é comumente descrito em trabalhos que utilizam a técnica de espectrometria de massas (DE VARGAS et al., 2012; TESSEMA et al., 2018; ZHOU et al., 2013), especialmente quando se trata de métodos bioanalíticos. Isso acontece porque os constituintes de uma matriz biológica geralmente co-eluem com os analitos, interferindo na detecção de massas, gerando uma amplificação ou uma supressão do sinal dos analitos de interesse (SARGENT, 2013; WARGNIEZ et al., 2017; WILLE et al., 2012). Portanto, no intuito de avaliar se havia interferentes influenciando na quantificação dos analitos de interesse, três curvas, em triplicata, foram preparadas utilizando como diluente as soluções metanólicas contaminadas com as camadas da pele (estrato córneo, folículo piloso e pele remanescente). Na Figura 21 é possível observar os resultados.

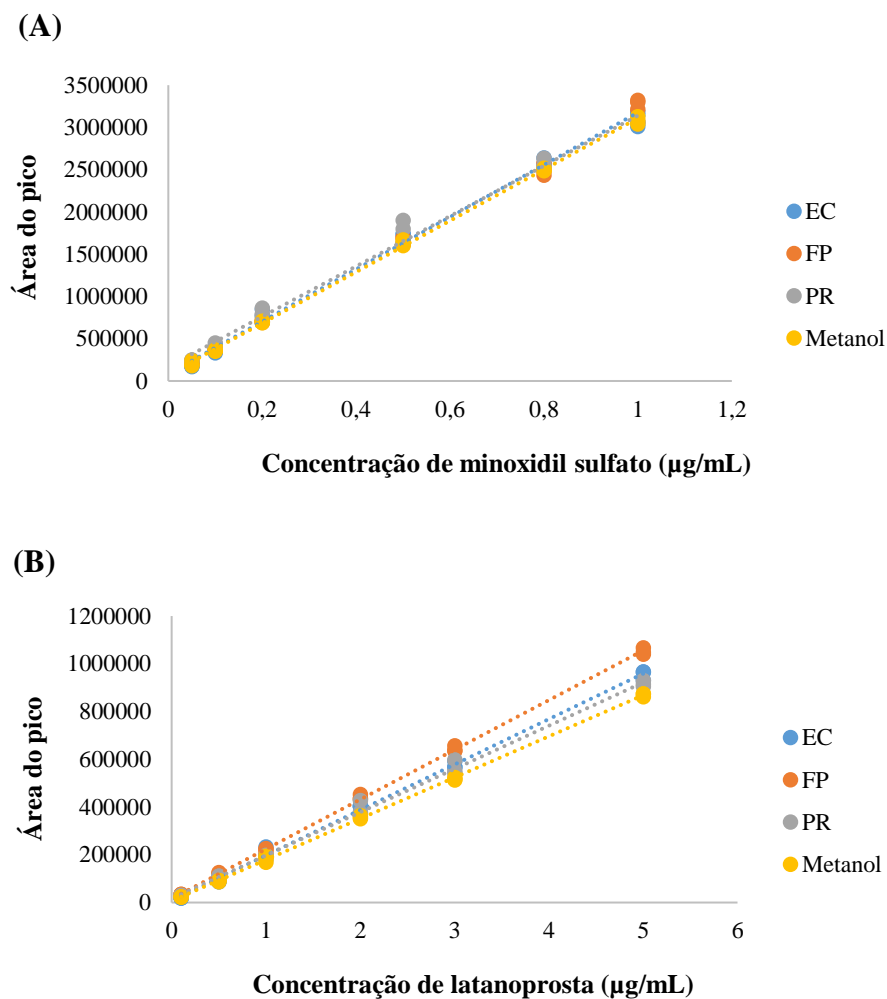


Figura 21: Correspondência entre as curvas em metanol (solvente) e as curvas em solução metanólica contaminadas com as camadas da pele para ambos os fármacos, realizadas em triplicata. **(A)** Minoxidil sulfato - Equação da reta: $y = 3.091.586,83x + 84.843,82$; r^2 0,995 para EC; Equação da reta: $y = 3.163.276,40x + 60.063,3$; r^2 0,9975 para FP; Equação da reta: $y = 2.971.917,34x + 168.122,51$; r^2 0,9930 para PR. **(B)** Latanoprost - Equação da reta: $y = 190358x + 6940,3$; r^2 0,9978 para EC; Equação da reta: $y = 208000x + 15736$; r^2 0,9993 para FP; Equação da reta: $y = 181124x + 16128$; r^2 0,9969 para PR. EC: estrato córneo; FP: folículo piloso; PR: pele remanescente.

Considerando a complexidade química da pele e a presença de sais da solução tampão, o efeito da matriz foi avaliado para cada um dos contaminantes através de cálculos teóricos. Na Tabela 4 estão descritos os resultados obtidos após o cálculo do efeito matriz para as curvas na presença do estrato córneo, folículo piloso e pele remanescente e solução tampão, para o minoxidil e para a latanoprost.

Tabela 4: Valores obtidos após cálculo para verificação do efeito matriz (Ef) em presença dos contaminantes (EC, FP, PR e solução tampão) para os fármacos de interesse minoxidil (MXS) e latanoprosta (LAT) nas diferentes matrizes. EC: estrato córneo; FP: folículo piloso; PR: pele remanescente.

| Contaminante | % Ef (MXS) | % Ef (LAT) |
|---------------------|-------------------|-------------------|
| EC | 1,95 | 10,43 |
| FP | 4,31 | 20,67 |
| PR | -1,99 | 5,07 |
| Tampão | -66,87 | -59,25 |

Até 15% de efeito matriz é aceitável para métodos bioanalíticos (BRASIL, 2012a). Observando os resultados, conclui-se que estrato córneo, folículo piloso e pele remanescente interferem discretamente (< 5%) no sinal do minoxidil, encontrando-se dentro do limite aceitável. Por outro lado, para a latanoprosta, as soluções contaminadas com estrato córneo e folículo piloso geraram uma interferência considerável no sinal do analito, uma possível amplificação do sinal. A maior interferência dos contaminantes da pele na detecção da latanoprosta, quando comparada ao minoxidil, provavelmente está relacionada a sua característica lipofílica, que aumenta a interação do fármaco com os componentes lipofílicos da pele.

Os resultados obtidos nos cálculos do efeito matriz para a solução tampão (-66,87% para o minoxidil, e -59,25% para a latanoprosta) mostram a significância e a magnitude do efeito matriz nessas amostras devido a uma supressão dos sinais. Esse efeito é esperado devido à presença de grandes quantidades de sal (eletrólitos) nas amostras, que alteram a condutividade da solução eluente após a ionização feita pela eletrospray (SARGENT, 2013).

Um dos indicativos que sugere a interferência dos constituintes da matriz (efeito matriz) em um método bioanalítico é a ausência de paralelismo entre as retas (inclinação) das curvas de calibração (BRASIL, 2017; FDA, 2018). A Figura 22 mostra que não houve paralelismo das curvas obtidas com a solução tampão quando comparado a curva de calibração dos fármacos em solvente (metanol), evidenciando que o efeito matriz é bastante pronunciado para ambos os fármacos quando estão nessa matriz.

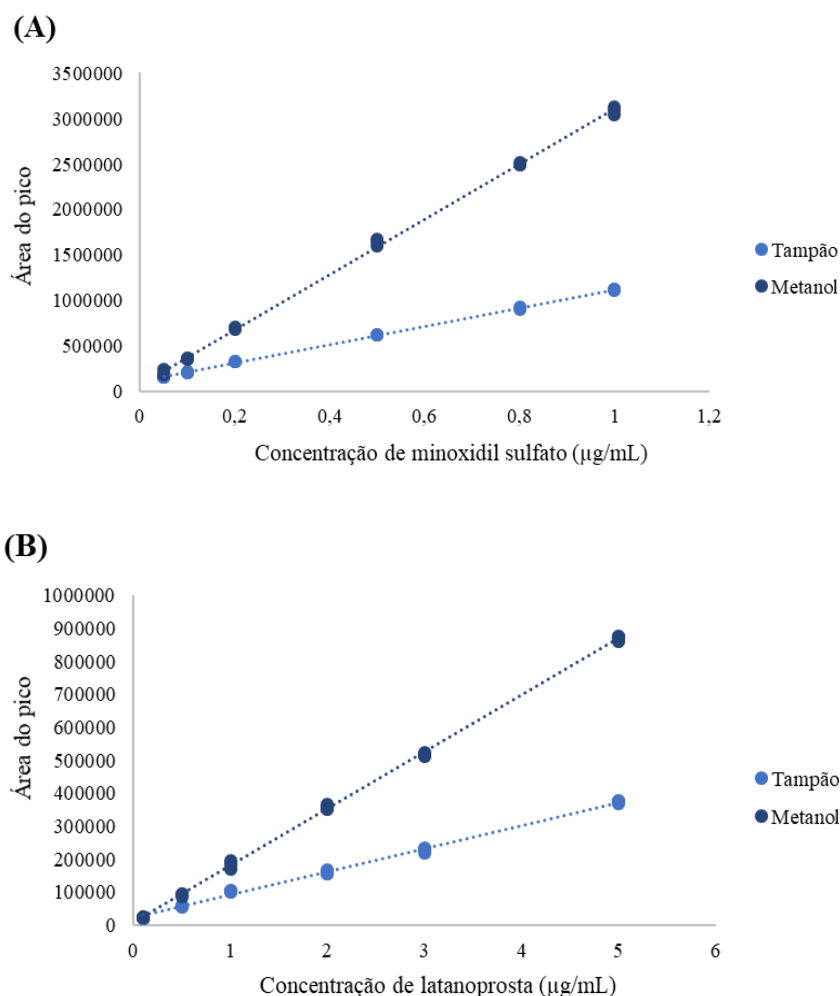


Figura 22: Correspondência entre as curvas analíticas no solvente e na solução tampão (pH 7,4 com 2,5% de Tween 80), realizadas em triplicata, para ambos os fármacos. **(A)** Minoxidil sulfato - Equação da reta: $y = 1.004.515,08x + 118.041,56$; $r^2 0,9995$. **(B)** Latanoprost - Equação da reta: $y = 70229x + 20925$; $r^2 0,9971$.

Em resumo, para garantir que as quantificações de minoxidil e latanoprost ocorressem de forma fidedigna, as análises foram realizadas sempre usando curvas diferentes a depender da matriz a qual os fármacos eram extraídos.

6.1.3. Limites de detecção e quantificação

O limite de detecção diz respeito à menor concentração de analito presente em uma amostra que pode ser analisada, porém o valor não é fidedigno o suficiente para ser quantificado. Já o limite de quantificação, por sua vez, é a menor concentração de analito que pode ser quantificada em uma amostra de forma precisa e exata (GUSTAVO GONZÁLEZ; ÁNGELES HERRADOR, 2007; RIBANI et al., 2004). A Tabela 5 apresenta os dados de limites de detecção e quantificação, respectivamente, calculados para ambos os analitos de interesse (minoxidil e latanoprost).

Tabela 5: Valores obtidos dos limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) para o minoxidil e latanoprostá nos diferentes meios. EC: estrato córneo; FP: folículo piloso; PR: pele remanescente.

| | Metanol ($\mu\text{g/mL}$) | EC ($\mu\text{g/mL}$) | FP ($\mu\text{g/mL}$) | PR ($\mu\text{g/mL}$) | Tampão ($\mu\text{g/mL}$) |
|---------------------|--|-----------------------------------|-----------------------------------|-----------------------------------|---------------------------------------|
| Minoxidil | | | | | |
| LD | 0,012 | 0,021 | 0,003 | 0,027 | 0,002 |
| LQ | 0,036 | 0,065 | 0,008 | 0,081 | 0,006 |
| Latanoprostá | | | | | |
| LD | 0,044 | 0,124 | 0,046 | 0,141 | 0,060 |
| LQ | 0,135 | 0,376 | 0,138 | 0,426 | 0,181 |

Para o minoxidil, todos os valores de limite de detecção, independente da matriz, foram inferiores a $0,05 \mu\text{g/mL}$, que é a menor concentração da curva de calibração. Os valores de limite de quantificação para o minoxidil foram todos inferiores a $0,1 \mu\text{g/mL}$ que é a segunda menor concentração da curva analítica.

Para a latanoprostá, os valores de limite de detecção se mostraram muito próximos de $0,1 \mu\text{g/mL}$ e os valores de limite de quantificação foram todos menores que $0,5 \mu\text{g/mL}$, que são, respectivamente, as duas menores concentrações da curva de calibração.

Os baixos valores de limite de detecção e de quantificação para ambos os fármacos refletem a alta sensibilidade do método, mostrando sua capacidade em determinar quantidades pequenas dos fármacos retidos nas camadas da pele. Se considerarmos, por exemplo, a aplicação na pele de 1 mL de uma formulação contendo 2% de minoxidil e 0,05% de latanoprostá (doses usuais), o método será capaz de quantificar 0,0025% da dose de minoxidil e 0,5% de latanoprostá que penetrarem nas camadas da pele.

Dessa forma, o método bioanalítico desenvolvido se mostra relevante para o objetivo que se propõe, ou seja, a determinação de pequenas quantidades dos fármacos retidos nas camadas da pele após os ensaios de permeação cutânea, e a quantificação dos fármacos em outros estudos de desenvolvimento de novos produtos dermatológicos contendo latanoprostá e minoxidil.

6.1.4. Precisão

A precisão de um procedimento analítico avalia a proximidade entre os resultados obtidos a partir de análises repetidas e independentes utilizando um mesmo método. De acordo com a ANVISA (2017), a precisão deve ser expressa por meio da repetibilidade, da precisão intermediária ou da reprodutibilidade. Neste trabalho, tanto a repetibilidade

quanto a precisão intermediária foram determinadas. A avaliação da precisão é essencial para estimar a variabilidade e os erros aleatórios intrínsecos ao processo analítico. Erros esses que não podem ser evitados ou controlados pois ocorrem de maneira aleatória, como por exemplo, inconformidade das vidrarias, reagentes, sensibilidade do equipamento e preparação de amostras (CUNHA-FILHO et al., 2009; MATOS et al., 2015b).

Os resultados da precisão foram expressos em função do coeficiente de variação. Os valores de coeficiente de variação para os ensaios de repetibilidade foram todos menores ou muito próximos de 5% tanto para o minoxidil quanto para a latanoprostá (Tabela 6), indicando a capacidade do método de manter uma resposta analítica consistente independente das pequenas variações nas análises. Os valores de precisão intermediária (inter-ensaio) variaram de 1,9 a 12,9%. Maiores valores de coeficiente de variação são esperados em métodos bioanalíticos que possuam efeito matriz devido a interferência na detecção dos analitos (BIE et al., 2012; WARGNIEZ et al., 2017). Ainda assim os valores de coeficiente de variação para ambos os fármacos, tanto nos ensaios de repetibilidade quanto nos ensaios de precisão intermediária, foram menores que 15% e estão dentro dos limites recomendados para métodos bioanalíticos (FDA, 2018).

Tabela 6: Valores de precisão obtidos após análise da repetibilidade e da precisão intermediária do método bioanalítico. DP: desvio padrão; CV: coeficiente de variação; DP: desvio padrão; EC: estrato córneo; FP: folículo piloso; PR: pele remanescente.

| | Concentração mensurada ($\mu\text{g/mL}$) \pm DP | Precisão (CV %) | Concentração mensurada ($\mu\text{g/mL}$) \pm DP | Precisão (CV %) |
|---------------------|---|--------------------|---|--------------------|
| Minoxidil | | | | |
| | <i>Repetibilidade</i> | | <i>Precisão intermediária</i> | |
| <i>Metanol</i> | 0,106 \pm 0,003 | 2,61 | 0,099 \pm 0,006 | 6,55 |
| | 0,530 \pm 0,009 | 1,72 | 0,523 \pm 0,015 | 2,83 |
| | 0,981 \pm 0,005 | 0,51 | 0,976 \pm 0,019 | 1,95 |
| <i>EC</i> | 0,091 \pm 0,005 | 5,71 | 0,090 \pm 0,005 | 5,72 |
| | 0,541 \pm 0,013 | 2,38 | 0,521 \pm 0,023 | 4,42 |
| | 0,978 \pm 0,016 | 1,59 | 0,970 \pm 0,024 | 2,49 |
| <i>FP</i> | 0,088 \pm 0,005 | 5,29 | 0,095 \pm 0,006 | 6,48 |
| | 0,545 \pm 0,015 | 2,81 | 0,532 \pm 0,022 | 4,14 |
| | 1,017 \pm 0,036 | 3,53 | 1,000 \pm 0,041 | 4,08 |
| <i>PR</i> | 0,105 \pm 0,004 | 3,73 | 0,094 \pm 0,010 | 10,24 |
| | 0,574 \pm 0,009 | 1,58 | 0,556 \pm 0,030 | 5,33 |
| | 1,073 \pm 0,029 | 2,66 | 1,004 \pm 0,058 | 5,74 |
| <i>Tampão</i> | 0,085 \pm 0,002 | 2,58 | 0,097 \pm 0,012 | 12,41 |
| | 0,462 \pm 0,022 | 4,69 | 0,510 \pm 0,047 | 9,31 |
| | 0,855 \pm 0,021 | 2,42 | 0,967 \pm 0,087 | 8,99 |
| Latanoprostá | | | | |
| | <i>Repetibilidade</i> | | <i>Precisão intermediária</i> | |
| <i>Metanol</i> | 0,512 \pm 0,013 | 2,57 | 0,504 \pm 0,020 | 3,95 |
| | 2,222 \pm 0,011 | 0,48 | 2,111 \pm 0,082 | 3,89 |
| | 5,107 \pm 0,059 | 1,15 | 5,223 \pm 0,251 | 4,81 |
| <i>EC</i> | 0,534 \pm 0,011 | 2,01 | 0,497 \pm 0,045 | 9,10 |
| | 2,066 \pm 0,029 | 1,39 | 1,977 \pm 0,160 | 8,07 |
| | 5,038 \pm 0,087 | 1,73 | 4,950 \pm 0,136 | 2,74 |
| <i>FP</i> | 0,490 \pm 0,012 | 2,44 | 0,483 \pm 0,024 | 5,01 |
| | 1,965 \pm 0,032 | 1,61 | 1,953 \pm 0,075 | 3,85 |
| | 4,661 \pm 0,032 | 0,68 | 4,726 \pm 0,118 | 2,50 |
| <i>PR</i> | 0,547 \pm 0,014 | 2,50 | 0,539 \pm 0,024 | 4,52 |
| | 2,090 \pm 0,105 | 5,02 | 2,073 \pm 0,075 | 3,63 |
| | 5,380 \pm 0,107 | 1,98 | 5,241 \pm 0,147 | 2,80 |
| <i>Tampão</i> | 0,403 \pm 0,004 | 1,02 | 0,457 \pm 0,048 | 10,56 |
| | 1,598 \pm 0,025 | 1,54 | 1,833 \pm 0,179 | 9,77 |
| | 4,022 \pm 0,229 | 5,70 | 4,711 \pm 0,609 | 12,94 |

6.1.5. Exatidão

A exatidão do método foi avaliada por meio de dados de recuperação dos fármacos das camadas da pele (estrato córneo, folículo piloso e pele remanescente). O estudo de recuperação tem como objetivo verificar a capacidade extratora do solvente utilizado e padronizar o método de extração para assegurar que a quantidade de fármaco que penetrou nas camadas da pele – após os ensaios de permeação – seja recuperada e quantificada com eficiência. Assim, considerando que os fármacos podem interagir de maneiras distintas com os vários componentes da matriz cutânea, é essencial verificar a exatidão do método após o processo extrativo dos fármacos (REIS et al., 2018).

Os valores de recuperação (Tabela 7) variaram de 69,9 a 101,0% para o minoxidil e de 79,2 a 90,5% para a latanoprost. Esses valores de exatidão estão de acordo com o recomendado para métodos bioanalíticos, que não precisam ser iguais a 100% mas é recomendável que estejam acima de 70% (ÂNGELO et al., 2017; FDA, 2018; ICH, 2019; REIS et al., 2018).

Tendo em vista que o objetivo deste trabalho é a validação de um método analítico que será utilizado para estudos que visam o desenvolvimento de uma nova formulação para o tratamento da alopecia, os folículos pilosos da pele representam a matriz de maior interesse nos ensaios. Ambos os fármacos apresentaram resultados em termos de recuperação acima dos 80% nos folículos pilosos, demonstrando a eficiência do método anteriormente validado para o seguimento das análises *in vitro*.

Tabela 7: Valores de recuperação de minoxidil sulfato (MXS) e latanoprost (LAT) quantificadas nas diferentes camadas da pele (EC, FP e PR) por extração overnight com metanol.

| <i>Estrato córneo</i> | | <i>Folículo piloso</i> | | <i>Pele remanescente</i> | |
|---|----------------------------------|---|----------------------------------|---|----------------------------------|
| <i>Concentração mensurada</i> ($\mu\text{g/mL}$) | <i>Fármaco recuperado</i> (%) | <i>Concentração mensurada</i> ($\mu\text{g/mL}$) | <i>Fármaco recuperado</i> (%) | <i>Concentração mensurada</i> ($\mu\text{g/mL}$) | <i>Fármaco recuperado</i> (%) |
| Minoxidil | | | | | |
| 0,070 | 69,6 | 0,089 | 88,7 | 0,070 | 69,8 |
| 0,463 | 92,6 | 0,505 | 101,0 | 0,429 | 85,8 |
| 0,797 | 79,7 | 0,910 | 91,0 | 0,745 | 74,5 |
| Latanoprost | | | | | |
| 0,401 | 80,2 | 0,438 | 87,6 | 0,453 | 90,5 |
| 1,668 | 83,4 | 1,625 | 81,2 | 1,810 | 90,5 |
| 3,935 | 78,7 | 3,999 | 80,0 | 4,103 | 82,1 |

6.1.6. Estabilidade analítica

A preparação e armazenamento de amostras são etapas críticas em ensaios analíticos, especialmente quando se utiliza técnicas muito sensíveis como LC-MS. Isso porque pequenas interferências, como produtos de degradação dos próprios analitos, podem ser detectadas atrapalhando a análise. A estabilidade analítica das amostras contendo minoxidil e latanoprostá foi avaliada em termos da porcentagem (teor) dos fármacos (em contato com as matrizes – estrato córneo, folículo piloso, pele remanescente e tampão – ou em solvente) nas amostras armazenadas em geladeira ($\pm 4^\circ \text{C}$) por um período de até 30 dias (FERREIRA-NUNES et al., 2018).

Os dados apresentados na Tabela 8 mostram que não houve diferenças significativas no teor dos fármacos nas amostras armazenadas em geladeira por 30 dias, mesmo na presença das matrizes biológicas de pele (estrato córneo, folículo piloso e pele remanescente) e da solução tampão ($p > 0,05$). Portanto, os resultados mostram que as amostras contendo minoxidil e latanoprostá podem ser armazenadas em geladeira ($\pm 4^\circ \text{C}$) por até 30 dias sem comprometer sua estabilidade em ensaios analíticos por LC-MS.

Tabela 8: Estabilidade do minoxidil e da latanoprostá em amostras armazenadas em geladeira ($\pm 4^\circ \text{C}$) por até 30 dias após o preparo em diferentes meios para avaliar a estabilidade analítica. Meios: solvente metanol; EC – estrato córneo, FP – folículo piloso; PR – pele remanescente; solução tampão fosfato.

| | Teor de minoxidil (%) | | | | | |
|----------------|-----------------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|
| | dia 0 | dia 1 | dia 2 | dia 7 | dia 15 | dia 30 |
| <i>Metanol</i> | 105,0 \pm 5,8 | 110,3 \pm 5,8 | 106,2 \pm 1,9 | 104,7 \pm 2,4 | 107,0 \pm 3,0 | 107,8 \pm 5,1 |
| <i>EC</i> | 102,7 \pm 0,9 | 102,2 \pm 0,3 | 105,8 \pm 1,6 | 102,0 \pm 1,3 | 101,8 \pm 4,3 | 105,7 \pm 0,7 |
| <i>FP</i> | 111,2 \pm 0,7 | 108,3 \pm 0,6 | 108,3 \pm 1,7 | 109,6 \pm 1,6 | 109,0 \pm 2,0 | 110,8 \pm 2,3 |
| <i>PR</i> | 105,3 \pm 3,1 | 107,8 \pm 2,5 | 105,3 \pm 2,5 | 107,1 \pm 1,7 | 106,2 \pm 3,5 | 108,1 \pm 5,2 |
| <i>Tampão</i> | 102,9 \pm 1,0 | 102,7 \pm 1,1 | 105,4 \pm 1,0 | 102,4 \pm 0,5 | 103,8 \pm 1,7 | 78,5 \pm 22,1 |

| | Teor de latanoprostá (%) | | | | | |
|----------------|--------------------------|------------------|-----------------|-----------------|-----------------|------------------|
| | dia 0 | dia 1 | dia 2 | dia 7 | dia 15 | dia 30 |
| <i>Metanol</i> | 106,3 \pm 7,5 | 105,8 \pm 10,8 | 102,6 \pm 5,2 | 108,3 \pm 6,5 | 104,1 \pm 2,2 | 113,7 \pm 15,5 |
| <i>EC</i> | 102,0 \pm 3,1 | 100,3 \pm 1,5 | 99,7 \pm 0,8 | 98,1 \pm 1,0 | 102,2 \pm 1,9 | 101,1 \pm 2,8 |
| <i>FP</i> | 97,5 \pm 1,6 | 95,1 \pm 2,7 | 102,0 \pm 1,1 | 94,0 \pm 1,1 | 95,9 \pm 2,3 | 93,7 \pm 2,0 |
| <i>PR</i> | 96,1 \pm 2,4 | 106,4 \pm 2,8 | 98,8 \pm 1,9 | 97,1 \pm 1,7 | 94,3 \pm 2,2 | 96,5 \pm 2,4 |
| <i>Tampão</i> | 89,9 \pm 12,7 | 93,9 \pm 3,3 | 104,1 \pm 5,9 | 90,5 \pm 5,9 | 95,1 \pm 3,7 | 91,4 \pm 7,5 |

6.2. AVALIAÇÃO DA COMPATIBILIDADE ENTRE OS FÁRMACOS

6.2.1. Análise térmica

A associação de dois fármacos em uma mesma formulação farmacêutica pode ser inviável se ocorrer algum tipo de interação química entre as moléculas que modifique a sua identidade química e, conseqüentemente, seu efeito farmacológico. Além disso, o processo de produção da formulação contendo os nanocarreadores lipídicos apresentado neste trabalho envolve o aquecimento de seus componentes (matriz lipídica e tensoativos) e também dos fármacos minoxidil e latanoprost, alcançando temperaturas de até 80 °C. Mudanças na temperatura também podem ocasionar a perda de estabilidade dos fármacos, inviabilizando o desenvolvimento da formulação. Portanto, um estudo para se verificar a compatibilidade entre os ativos foi realizado por meio de análises térmicas dos fármacos isoladamente e da mistura física, utilizando as técnicas de análise térmica diferencial (DTA) e termogravimétrica (TGA) (DOURADO, 2019).

A análise de DTA é capaz de captar as trocas de calor com o ambiente, identificando eventos endotérmicos e exotérmicos que ocorrem durante o processo de aquecimento. Na Figura 23 é possível observar que na faixa de temperatura em que acontece o processo de produção dos nanocarreadores (até 80 °C) não ocorreu nenhum evento térmico de importância para nenhum dos fármacos. Os eventos térmicos que ocorreram, tanto para os fármacos individualmente quanto na mistura física, indicam que o processo de produção não afeta a estabilidade dos ativos.

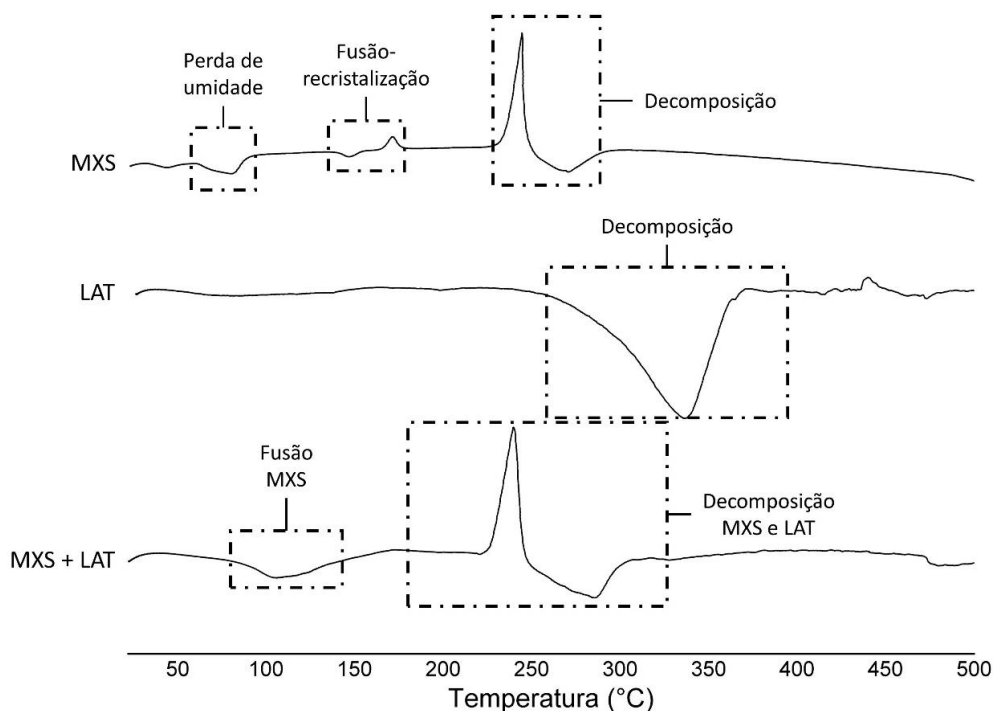


Figura 23: Termogramas de DTA (análise térmica diferencial) obtidos durante a análise dos fármacos minoxidil (MXS) e latanoprost (LAT) sozinhos ou em mistura física (MXS + LAT) com destaque para os eventos térmicos que ocorreram.

O minoxidil apresenta quatro eventos térmicos importantes: o primeiro evento ocorre em aproximadamente 61 °C e é característico de perda de água, retida na estrutura da molécula devido ao processo de produção e absorção de umidade do ambiente. Os dois próximos eventos iniciam em 141 °C e 167 °C, sendo um evento endotérmico, seguido de um evento exotérmico. Este fenômeno é conhecido como fusão-recristalização, que consiste na modificação da estrutura cristalina durante o processo de aquecimento, na qual uma parte da estrutura cristalina sofre fusão, enquanto outra parte sofre modificações na estrutura do cristal, sem chegar a desfazer a estrutura, funcionando como uma recristalização (ANDROSCH; ZHANG; SCHICK, 2019; LV et al., 2017).

Portanto os picos que se iniciam em 141 °C e 167 °C são, respectivamente, o evento endotérmico que marca a fusão de uma parte da estrutura cristalina e o evento exotérmico que marca a recristalização dos outros cristais, mantendo parte da estrutura. Já os dois últimos eventos que iniciam em 236 °C marcam a decomposição do minoxidil, sendo caracterizada por um pico exotérmico, que indica uma decomposição oxidativa, e um largo evento endotérmico que marca decomposição térmica.

A análise da latanoprost mostrou apenas o evento de decomposição térmica que se inicia na temperatura de 300 °C, sem qualquer outro evento de importância na faixa de

temperatura analisada. Esse perfil térmico ocorre pelo fato de que a latanoprosta já se apresenta em estado líquido e não em forma de pó.

Analisando o termograma da mistura física é possível observar uma antecipação de eventos térmicos de ambas as moléculas. O minoxidil teve sua fusão antecipada para 90 °C, indicando uma pequena perda de estabilidade e inibição do evento de recristalização. Possivelmente isso ocorre devido ao efeito de solubilização parcial do minoxidil na presença da latanoprosta.

O evento de decomposição da latanoprosta, por sua vez, também sofreu uma antecipação, ocorrendo juntamente com a decomposição do minoxidil, sugerindo novamente uma perda de estabilidade térmica com a junção dos dois fármacos. Apesar da perda de estabilidade térmica mostrada, os eventos ocorridos se mantiveram em temperaturas maiores que 80 °C, que é a temperatura máxima alcançada na produção dos nanocarreadores, sugerindo que os fármacos se mantêm estáveis durante a produção da formulação.

O grau de decomposição dos sistemas medido pela TGA é um parâmetro importante para se obter indícios sobre a estabilidade de uma amostra (PIRES et al., 2017). O uso da primeira derivada das curvas de perda de massa fornecida pela TGA possibilita a distinção dos eventos de decomposição de cada componente, mesmo em misturas complexas (SILVA et al., 2016).

As análises de termogravimetria (TGA) (Figura 24) corroboram com o que foi observado nos termogramas da análise térmica diferencial (DTA). Tanto o minoxidil quanto a latanoprosta apresentam a decomposição como seus principais pontos de perda de massa.

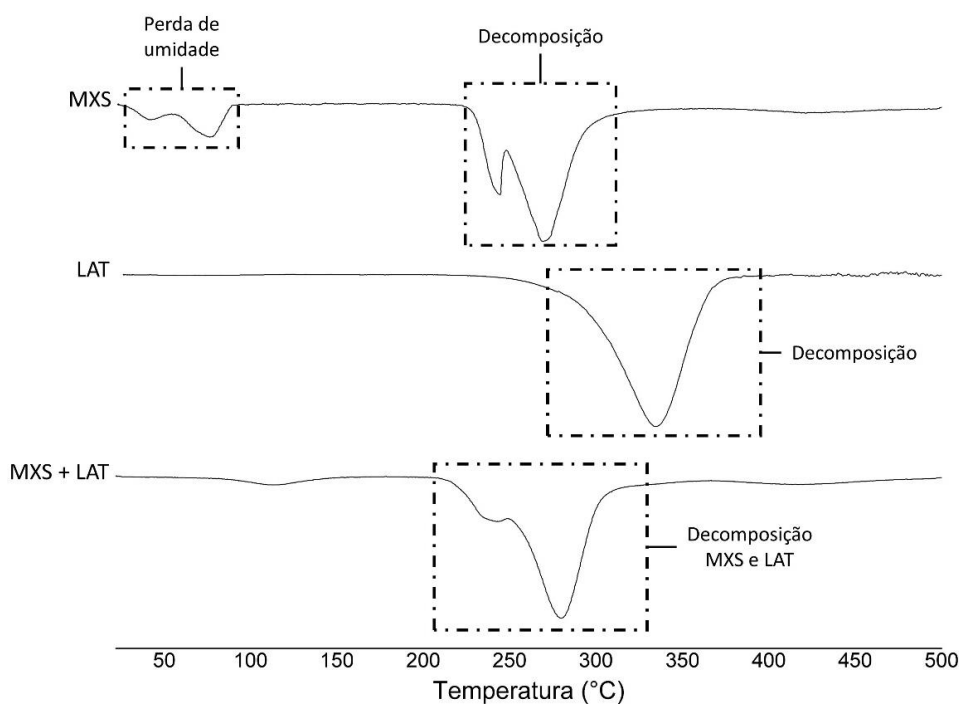


Figura 24: Primeira derivada das análises termogravimétricas (TGA) dos fármacos minoxidil (MXS) e latanoprost (LAT) isoladamente ou em mistura física (MXS + LAT) com destaque para os eventos térmicos que ocorreram durante as análises.

Assim como ocorreu no DTA, na análise de TGA da mistura física foi observada uma antecipação do evento de decomposição da latanoprost, que ocorreu juntamente com o principal evento de perda de massa do minoxidil, em aproximadamente 232 °C. Apesar disso, não existem indícios de que exista uma perda de estabilidade térmica que afete os fármacos nas condições de produção da formulação com nanocarreadores proposta pelo trabalho (PEREIRA et al., 2021).

6.2.2. FTIR

Para avaliar a ocorrência de interações entre as moléculas e confirmar a ausência de incompatibilidades entre os fármacos já indicada pelas análises de estabilidade térmica, foi realizada também uma avaliação da estabilidade química por meio da técnica de espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) e os resultados espectrais estão apresentados na Figura 25.

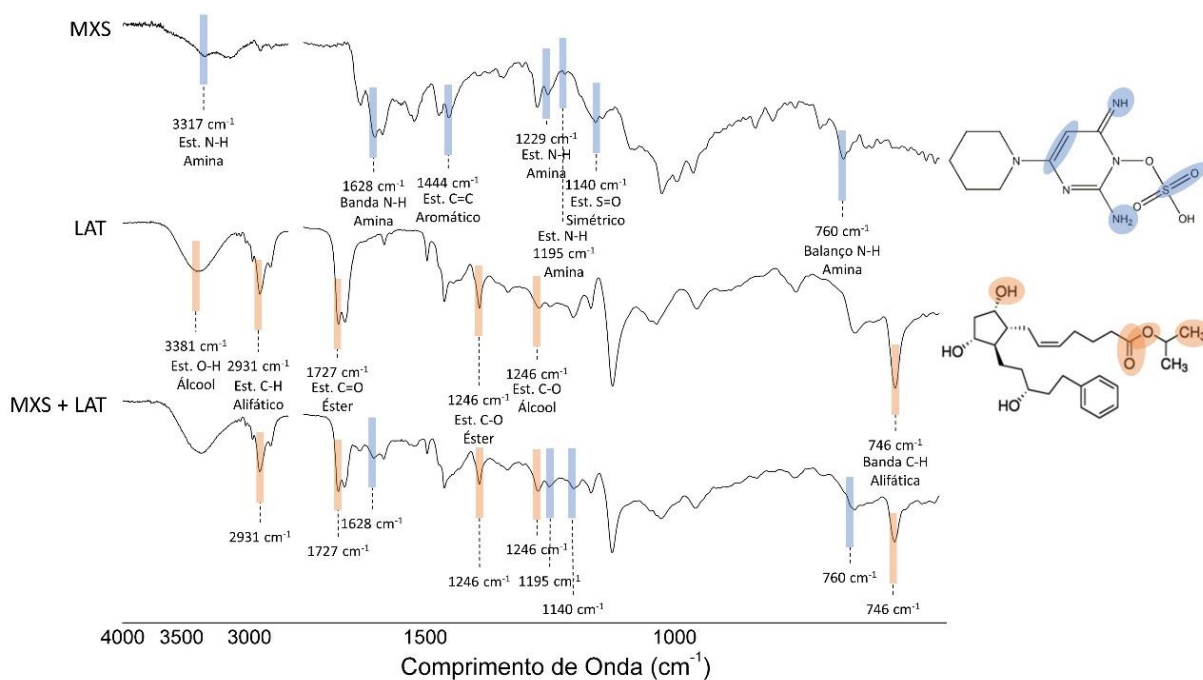


Figura 25: Espectros de FTIR (espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier) e estruturas químicas dos fármacos minoxidil (MXS) e latanoprost (LAT) sozinhos ou em mistura física (MXS+LAT).

A molécula do minoxidil foi identificada pelas vibrações moleculares de suas estruturas. Dentre elas, as principais são os estiramentos N–H em 3317 cm^{-1} , 1229 cm^{-1} e 1195 cm^{-1} , juntamente com a banda N–H em 1628 cm^{-1} e a deformação angular assimétrica no plano (balanço) N–H em 760 cm^{-1} , caracterizando as diversas formas do grupo funcional amina na molécula. A molécula também foi marcada pelos estiramentos C=C do anel aromático heterocíclico em 1444 cm^{-1} e o estiramento S=O simétrico em 1140 cm^{-1} , indicativo do grupamento sulfato.

A latanoprost, por sua vez, foi marcada principalmente pelos estiramentos: O–H em 3381 cm^{-1} e C–O em 1246 cm^{-1} , que marcam a presença dos grupamentos álcool; C=O em 1727 cm^{-1} e C–O em 1370 cm^{-1} que marcam a presença do éster; C–H em 2931 cm^{-1} e a banda C–H em 746 cm^{-1} que marcam a presença das ligações do carbono e hidrogênio nas cadeias alifáticas.

Na mistura física é possível observar uma sobreposição dos espectros, onde algumas estruturas particulares de cada uma das moléculas podem ser identificadas. A presença do minoxidil na mistura é identificada por quatro marcadores: os estiramentos N–H da amina em 1195 cm^{-1} e S=O simétrico do grupo sulfato em 1140 cm^{-1} , a banda N–H da amina em 1628 cm^{-1} e o balanço N–H da amina em 760 cm^{-1} (PEREIRA et al., 2017).

Já a presença da latanoprostina na mistura física é identificada através de cinco estruturas: os estiramentos C=O e C–O do éster em 1727 cm^{-1} e 1246 cm^{-1} , respectivamente; o estiramento C–O do álcool em 1246 cm^{-1} ; e o estiramento C–H alifático em 2931 cm^{-1} que identifica, juntamente com a banda C–H em 746 cm^{-1} , a presença da cadeia alifática (FATHALLA; FOUAD; SOLIMAN, 2020).

Dessa forma é possível verificar através da análise dos espectros de FTIR que não foi encontrada nenhuma alteração visível na orientação das estruturas químicas de ambas as moléculas quando misturadas, sugerindo assim que existe compatibilidade química entre os fármacos em mistura física (PIRES et al., 2017). Com isso é possível concluir que os fármacos possuem compatibilidade química entre si. Embora exista uma leve perda de estabilidade térmica, isso não afeta as características dos fármacos nas condições as quais serão submetidos durante o processo de produção da formulação contendo os nanocarreadores lipídicos.

6.3. OBTENÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DA FORMULAÇÃO CONTENDO OS NANOCARREADORES LIPÍDICOS

As nanopartículas em suas diversas apresentações são sistemas muito estudados para a administração tópica de fármacos por oferecerem vantagens quando comparados a formulações que contêm o fármaco em sua forma livre. A nanoencapsulação de fármacos aumenta a estabilidade dos produtos por proteger as suas moléculas, previne irritações pela exposição direta de fármacos com a pele, permite um controle da liberação e, no caso das nanopartículas lipídicas, via de regra, possibilita o aumento da permeação cutânea de fármacos por aumentarem a hidratação da pele devido a um efeito oclusivo (FANG et al., 2014).

Além disso, muitos estudos apontam para o fato de que nanopartículas aplicadas topicamente tendem a se acumular nos apêndices cutâneos, mais significativamente nos folículos pilosos, vetorizando a liberação dos fármacos nelas encapsulados para este local, o que seria uma vantagem importante para o tratamento de doenças associadas aos folículos pilosos, como é o caso da alopecia androgênica (KATZER et al., 2019; PEREIRA et al., 2018).

De fato, as nanopartículas lipídicas têm se mostrado excelentes sistemas para a administração tópica e direcionamento de ativos para os folículos pilosos da pele, sendo

muito utilizadas em trabalhos que visam o desenvolvimento de formulações para o tratamento de queda de cabelo (PEREIRA et al., 2018). Essa característica de direcionamento, no entanto, está associada a várias características do nanocarreador, como seu tamanho, potencial zeta, além da natureza da matriz pela qual ela é constituída.

Tipicamente os carreadores lipídicos nanoestruturados se apresentam como um sistema coloidal contendo nanopartículas com tamanho que, geralmente, varia de 100 a 500 nm a depender da técnica de obtenção e dos excipientes utilizados (PURI et al., 2009). Sua matriz é formada por uma mistura de lipídios sólidos e lipídios líquidos, que tem a função de desorganizar a estrutura cristalina típica dos lipídios sólidos, resultando em uma matriz estrutural menos ordenada, com mais espaços para acomodar maiores quantidades de fármaco (MAKONI; KASONGO; WALKER, 2019).

A estabilidade das formulações com nanocarreadores lipídicos é influenciada principalmente pelos lipídios utilizados e pelos tensoativos que conferem estabilidade eletrostática e estérica entre os componentes da formulação (CZAJKOWSKA-KOŚNIK; SZEKALSKA; WINNICKA, 2019). Os tensoativos também têm influência no tamanho das partículas, de modo que quanto maior a quantidade de tensoativo menor o tamanho dos nanossistemas lipídicos (SHARMA et al., 2017).

A formulação produzida com os nanocarreadores lipídicos contendo minoxidil e latanoprosta encapsulados apresentou uma coloração branca e opaca como mostrado na Figura 26. A nanoformulação foi capaz de encapsular altas concentrações de ambos os fármacos, concentrações essas praticamente iguais às concentrações encontradas nos produtos comerciais e/ou magistrais: 2% de minoxidil e 0,05% de latanoprosta.

O processo de obtenção do nanocarreadores e os resultados obtidos após alguns estudos de desempenho da nanoformulação já foram patenteados junto ao INPI – Instituto Nacional da Propriedade Industrial – através do processo de número: BR 10 2020 014445 6.



Figura 26: Formulação contendo nanocarreadores lipídicos com minoxidil e latanoprostá.

A encapsulação de minoxidil e latanoprostá em nanocarreadores lipídicos permitiu que dois ativos de polaridades diferentes fossem veiculados numa mesma formulação. Esta formulação é livre de etanol ou outro co-solvente orgânico, ao contrário do que é encontrado na maioria das formulações comerciais que possuem minoxidil na composição e acabam causando irritações cutâneas nos pacientes (ROSSI et al., 2016). Esse efeito adverso é a uma das principais causas de descontinuação do tratamento da alopecia e, portanto, a formulação inovadora desenvolvida aqui já apresenta uma grande vantagem tecnológica.

6.3.1. Distribuição de tamanho de partícula

O tamanho de partícula é uma característica determinante da qualidade de uma formulação, pois a estabilidade física dos sistemas coloidais depende da sua distribuição de tamanho (SHARMA et al., 2017). Os nanocarreadores lipídicos desenvolvidos contendo minoxidil sulfato e latanoprostá apresentaram tamanho médio de 393,5 (\pm 36,0) nm com PDI médio de 0,38 (\pm 0,09).

Além da predição de estabilidade física em suspensão aquosa, as dimensões nanométricas dos nanocarreadores indicam que eles estão propensos a penetrarem a pele via folículos pilosos (PATZELT et al., 2011; PATZELT; LADEMANN, 2013). Um estudo publicado aponta que nanopartículas lipídicas com diâmetros maiores que 100 nm

tendem a contribuir para que as moléculas não atravessem a pele e sejam absorvidas pela circulação sanguínea e sim para que essas penetrem a pele e fiquem retidas nas camadas mais superfícies exercendo efeito local (GARCÊS et al., 2018). O que avaliamos a seguir foi a capacidade dos nanocarreadores com essa dimensão de promover um acúmulo maior de fármaco nos folículos pilosos.

O valor médio de PDI ficou dentro do usualmente encontrado para carreadores lipídicos nanoestruturados (PIRES et al., 2019). Quanto mais próximo de zero, mais monodisperso é uma amostra, mas se tratando de nanocarreadores lipídicos, amostras com valores de PDI que se encontram no intervalo de 0 a 0,5 já são consideradas amostras homogêneas (MÜLLER; RADTKE; WISSING, 2002; SHARMA et al., 2017).

6.3.2. Potencial zeta

Os nanocarreadores lipídicos desenvolvidos apresentaram potencial zeta positivo, igual a + 22,6 (\pm 0,2) mV. A carga positiva das partículas provavelmente se deve ao estabilizante CPC presente na formulação, que é um tensoativo catiônico. O valor encontrado de potencial zeta indica estabilidade dos nanossistemas produzidos, pois alguns estudos relatam que valores de potencial próximos a |30| mV conferem estabilização eletrostática a sistemas nanoestruturados, que evita que haja a aglomeração das nanopartículas (GHARIB et al., 2015; GOMES et al., 2014; PIRES et al., 2019).

6.3.3. Eficiência de encapsulação

A eficiência de encapsulação se refere à proporção de fármaco que foi associada aos nanocarreadores lipídicos referente ao fármaco livre na formulação. O valor encontrado de eficiência de encapsulação foi de 86,95 (\pm 0,41) % para o minoxidil e de 99,92 (\pm 0,05) % para a latanoprostina.

O alto valor de eficiência de encapsulação para a latanoprostina era esperado devido à sua característica lipofílica – $\log P = 4,16$ (RODRIGUEZ-ALLER et al., 2015), que aumenta a afinidade da molécula pelos lipídios que compõem os nanocarreadores lipídicos.

O minoxidil sulfato também alcançou um alto valor de eficiência de encapsulação apesar de ser uma molécula mais hidrofílica ($\log P = 0,44$) que teoricamente possuiria menor afinidade pelos lipídios (GELFUSO et al., 2013; GOMES et al., 2014; PADOIS et

al., 2011; SANTOS et al., 2018). Como os nanocarreadores lipídicos são partículas formadas por uma mistura de lipídios sólidos e líquidos estabilizados por tensoativos, isso resulta em uma matriz estrutural mais amorfa e desorganizada. Essa característica estrutural, de fato, tem a vantagem de permitir que altas taxas fármacos lipofílicos sejam encapsulados, obviamente, mas também possibilita a encapsulação de ativos hidrofílicos devido sua composição (principalmente os lipídios líquidos e tensoativos) e conformação (QIU et al., 2012).

Outra possível explicação para a altas taxas de minoxidil encapsulado nos nanocarreadores lipídicos é a presença do excipiente CPC na formulação. Por ser um tensoativo catiônico que confere carga positiva para os nanossistemas lipídicos, ele deve contribuir para a formação de par iônico com o minoxidil, que, nas condições em que se encontra na formulação, possui residual de carga negativo. A formação de par iônico de CPC com fármaco é uma estratégia que parece aumentar a lipofilicidade de fármacos muito hidrofílicos, contribuindo também no aumento da permeabilidade através de membranas biológicas (DARSAZAN et al., 2019).

6.3.4. Morfologia

A análise morfológica dos nanocarreadores lipídicos foi realizada a partir de imagens capturadas por microscopia de transmissão (MET) e de varredura (MEV), que estão apresentadas nas Figuras 27 e 28.

Nas imagens é possível observar que os carreadores apresentaram formato majoritariamente esférico e está de acordo com o observado para outros nanocarreadores lipídicos descritos na literatura (ANGELO et al., 2020; PIRES et al., 2019; SANTOS et al., 2018; SILVA et al., 2016). O tamanho visualizado para os nanocarreadores lipídicos é compatível com o valor médio encontrado nas análises de diâmetro hidrodinâmico obtidos por espalhamento de luz dinâmico, ou seja, entre 200 e 500 nm.

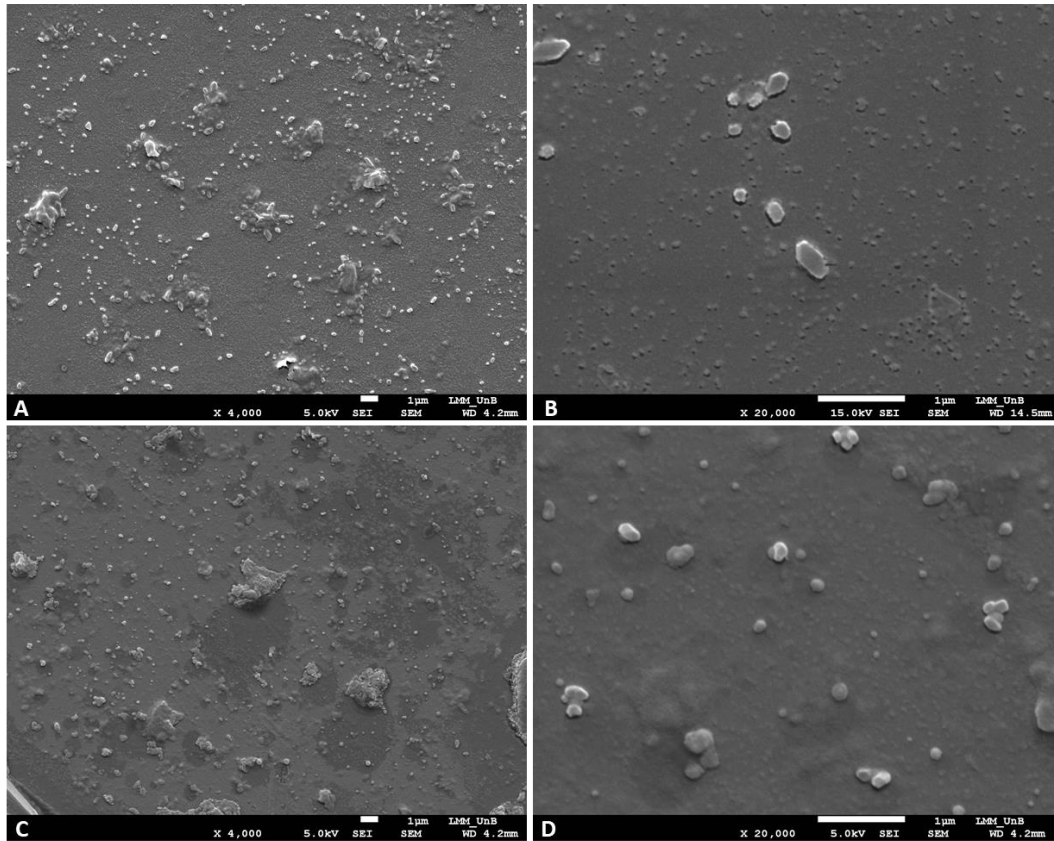


Figura 27: Imagens obtidas por microscopia eletrônica de varredura (MEV) dos nanocarreadores lipídicos vazios (A e B) e com minoxidil e latanoprosta (C e D). Aumento de 4.000 a 20.000 vezes.

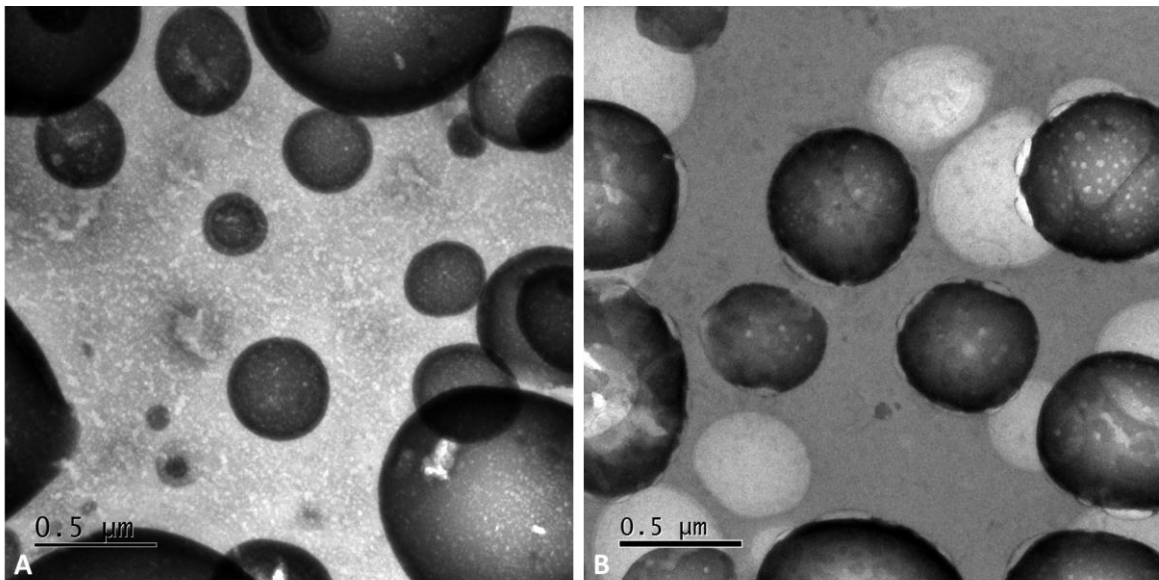


Figura 28: Imagens obtidas por microscopia eletrônica de transmissão (MET) dos nanocarreadores lipídicos vazios (A) e com minoxidil e latanoprosta (B). Aumento de 6.000 vezes.

6.3.5. pH

O valor de pH encontrado para a formulação desenvolvida contendo os nanocarreadores lipídicos em dispersão foi de $6,4 \pm 0,2$. Este valor é considerado seguro para o uso tópico dermatológico (LAUTERBACH; MÜLLER-GOYMANN, 2015; ÖHMAN; VAHLQUIST, 1998; SCHNEIDER et al., 2007), uma vez que a superfície da pele humana possui uma característica levemente ácida que é importante para manter a integridade e coesão do estrato córneo (barreira lipídica) e ainda regular a homeostase da permeabilidade via epiderme (FLUHR et al., 2008; SCHMID-WENDTNER; KORTING, 2006).

6.4. AVALIAÇÃO DA ESTABILIDADE

Durante o período de armazenamento, partículas em dispersão coloidal podem sofrer alterações físico-químicas, podendo aderir-se uma as outras formando agregados, que tendem a sedimentar. Já os fármacos encapsulados podem ser expulsos da matriz lipídica e sofrer degradação. Essas circunstâncias influenciam diretamente na estabilidade da formulação, conseqüentemente, a avaliação da integridade dos nanocarreadores e dos fármacos nele encapsulados é uma forma de demonstrar a qualidade da formulação durante o período de armazenamento (MAKONI; KASONGO; WALKER, 2019).

Os estudos de estabilidade foram realizados em amostras armazenadas na geladeira na temperatura de aproximadamente 4° C e foram feitas análises de caracterização dos nanossistemas. A estabilidade não foi avaliada em temperatura ambiente pois é sabido que devido à natureza lipídica dos nanocarreadores quando estes são expostos a temperaturas mais altas, por longos períodos, ocorre um aumento na mobilidade interna dos lipídios, ou até sua fusão, causando desestabilização (BELOQUI et al., 2016; PIRES et al., 2019).

As análises para determinação de estabilidade dos nanossistemas foram realizadas nos tempos 0, 7, 15, 30, 60 e 90 dias após a produção dos nanocarreadores lipídicos e os resultados estão apresentados na Tabela 9.

Tabela 9: Caracterização dos nanocarreadores lipídicos contendo minoxidil (MXS) e latanoprost (LAT) durante 90 dias para determinar a estabilidade. PdI: índice de polidispersividade.

| Dia | Diâmetro hidrodinâmico (nm) | PdI | Potencial zeta (mV) | Teor encapsulado (%) | |
|-----|-----------------------------|-------------|---------------------|----------------------|--------------|
| | | | | MXS | LAT |
| 0 | 393,3 ± 36,0 | 0,38 ± 0,09 | 22,6 ± 0,2 | 86,95 ± 0,41 | 99,92 ± 0,05 |
| 7 | 411,7 ± 35,4 | 0,32 ± 0,09 | 23,5 ± 0,4 | 86,33 ± 0,97 | 99,88 ± 0,15 |
| 15 | 421,3 ± 40,3 | 0,37 ± 0,11 | 23,0 ± 1,60 | 86,01 ± 2,93 | 99,73 ± 0,07 |
| 30 | 421,9 ± 41,4 | 0,37 ± 0,07 | 23,4 ± 1,3 | 84,33 ± 5,74 | 99,74 ± 0,10 |
| 60 | 430,2 ± 53,7 | 0,33 ± 0,10 | 22,0 ± 1,7 | 86,18 ± 3,41 | 99,86 ± 0,10 |
| 90 | 407,6 ± 1,4 | 0,32 ± 0,04 | 23,1 ± 0,8 | 85,76 ± 0,02 | 99,97 ± 0,01 |

As análises estatísticas foram feitas comparando os resultados do dia 0 e do dia 90 e não houve mudança significativa nos valores de diâmetro hidrodinâmico, PdI e potencial zeta ($p > 0,05$). Porém, houve diferença estatística ($p < 0,05$) nos valores de teor dos fármacos na formulação após três meses de armazenamento.

Apesar de se mostrarem estatisticamente diferentes, as diferenças nos valores de teor foram muito discretas (menores que 2%) tanto para o minoxidil quanto para a latanoprost. Essa variação está de acordo com o especificado em guias de estabilidade de produtos farmacêuticos, que estabelecem que perdas menores que 5% no teor em relação ao valor inicial são consideradas aceitáveis (BRASIL, 2019). Os resultados reforçam que o armazenamento dos nanocarreadores lipídicos em geladeira ($\pm 4^\circ \text{C}$) indicam que essa condição é importante para manter a integridade e conservar a estabilidade da formulação.

Quando comparados às nanopartículas lipídicas sólidas, os nanocarreadores lipídicos são conhecidos por conferir maior estabilidade aos fármacos encapsulados. Isso ocorre principalmente porque a estrutura da matriz lipídica desses nanossistemas é mais amorfa e desorganizada, oferecendo mais espaço para uma melhor acomodação moléculas, e prevenindo a expulsão do fármaco e favorecendo assim a estabilidade da formulação por maiores períodos de armazenamento (CZAJKOWSKA-KOŚNIK; SZEKALSKA; WINNICKA, 2019; PURI et al., 2009). Outros estudos já mostraram que os nanocarreadores lipídicos são realmente capazes de preservar a integridade das formulações por até três meses, visto que não foram encontradas alterações significativas de tamanho hidrodinâmico, PdI, potencial zeta e teor encapsulado (MAKONI;

KASONGO; WALKER, 2019; SHARMA et al., 2017; SOUTO et al., 2004; WANG et al., 2017).

6.5. AVALIAÇÃO *IN VITRO* DO POTENCIAL IRRITATIVO DA NANOFORUMULAÇÃO

Apesar de os sistemas lipídicos terem sua biocompatibilidade bem estabelecida, sendo conhecida como uma das principais vantagens do seu uso, alguns componentes da formulação, como os tensoativos, podem conferir certa toxicidade ao produto. Um estudo recente advertiu que o fármaco latanoprostá pode desencadear um tipo de irritação cutânea conhecida como dermatite por alergia de contato, entretanto esse efeito adverso parece ser bastante raro (NAPOLITANO et al., 2019). Desta forma, o potencial irritativo das formulações desenvolvidas foi avaliado por meio de dois ensaios *in vitro*, o HET-CAM e a viabilidade de epiderme reconstituída.

6.5.1. Ensaio HET-CAM

O ensaio HET-CAM é um teste muito usado para avaliar o potencial irritante de formulações, evitando a realização de testes em animais. Sua sensibilidade não é tão grande para produtos que sejam moderadamente irritantes, porém é muito eficiente para indicar substâncias que são irritantes severas (OLIVEIRA et al., 2012).

Na Figura 29 está apresentada a sequência de imagens na qual é possível observar os efeitos após a adição da formulação ou dos controles negativo e positivo na membrana corioalantoide dos ovos de galinha. Para avaliar o potencial irritativo da formulação é necessário a comparação com os controles.

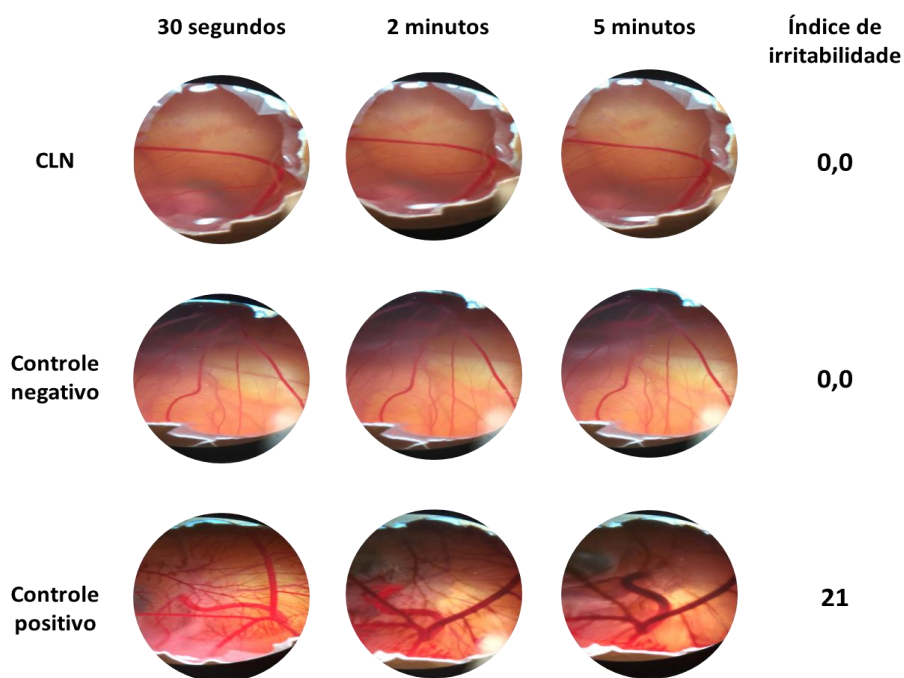


Figura 29: Imagem com fotos que mostram os efeitos observados para estabelecer o índice de irritabilidade dos nanocarreadores lipídicos contendo minoxidil e latanoprost (CLN) e dos controles negativo (NaCl 0,9%) e positivo (NaOH 1M) após 30 segundos, 2 minutos e 5 minutos de ensaio HET-CAM.

O controle positivo resultou em alteração completa da vascularização, alterando visivelmente a cor e o calibre dos vasos sanguíneos assim que houve contato da solução de NaOH com a membrana. Logo, é possível observar que houve hiperemia logo aos 30 segundos de ensaio e coagulação aos 2 minutos. Não foi observada hemorragia, que é o extravasamento de sangue dos vasos. Em contrapartida, ao observar o controle negativo é possível inferir que não houve nenhuma alteração na vascularização normal da membrana corioalantoide. A coloração e o calibre dos vasos permaneceram inalterados ao longo de todo o ensaio após a adição da solução de NaCl 0,9%.

Assim como o controle negativo, a formulação desenvolvida não se mostrou irritante. Na Figura 28 é possível observar que não houve manifestação de hiperemia, hemorragia ou coagulação depois de 5 minutos em que os nanocarreadores lipídicos ficaram em contato com a membrana corioalantoide. Portanto, o índice de irritabilidade calculado para a nanoformulação foi igual a 0, o que difere bastante do índice obtido para o controle positivo (conhecidamente irritante) que foi igual a 21. O resultado observado está de acordo com os descritos na literatura para sistemas lipídicos nanoparticulados, classificados como formulações não irritantes (KUMAR; SINHA, 2016, 2017) ou irritantes leves (ANDRADE et al., 2016) e também para nanopartículas contendo

latanoprost (OLIVEIRA et al., 2020a). Esse resultado, portanto, indica a segurança da formulação em não causar irritação.

6.5.2. Ensaio com epiderme humana reconstruída

A pele humana é primeira barreira de proteção do organismo contra agentes ambientais, por isso a irritação cutânea ou dérmica é um dos efeitos mais comumente observados após a aplicação de produtos tópicos. Considerando que os dados obtidos por HET-CAM não são capazes de diferenciar produtos que são moderadamente irritantes, o potencial irritativo da formulação utilizando epiderme humana reconstruída também foi verificado. Esse é um estudo mais específico para verificação da segurança no uso de formulações para administrações cutâneas pois utiliza um modelo *in vitro* contendo células humanas que simulam de forma mais real as condições encontradas *in vivo* (KOSE et al., 2018).

O modelo de teste *in vitro* que utiliza epiderme humana reconstruída mimetiza as propriedades bioquímicas e fisiológicas da epiderme humana *in vivo*, e é capaz de avaliar o mecanismo de ação (dano celular e tecidual) que ocorre durante o processo de irritação (KOLLE et al., 2013). Esse tipo de ensaio é altamente reprodutível e tem baixa variabilidade, demonstrando seu alto valor científico e possibilitando a redução do uso de animais de laboratórios para a realização de ensaios (PEDROSA et al., 2017). Estudos sugerem ainda que os testes *in vivo* em animais tendem a superestimar a irritação cutânea, apontando que o modelo de teste *in vitro* tem uma maior concordância com os dados encontrados para humanos (JÍROVÁ et al., 2010). Esses achados reforçam a grande importância desse modelo de estudo e as inúmeras vantagens em utilizá-lo.

A irritação cutânea é definida como um dano reversível produzido após a exposição da pele a alguma substância irritante (KOLLE et al., 2013; OECD, 2019). A manifestação clínica da irritação normalmente é caracterizada por eritema e edema, resultado de eventos desencadeados pela penetração de um agente químico irritante através do estrato córneo (WELSS; BASKETTER; SCHRÖDER, 2004). Após a ruptura da barreira cutânea, os queratinócitos danificados produzem citocinas e mediadores inflamatórios que disparam uma cascata inflamatória afetando até as células mais profundas da derme (HO; CAMPBELL; LAVERGNE, 2015). O modelo de epiderme humana reconstruída da EpiSkin™ avalia o potencial irritativo dos agentes químicos

através dos eventos iniciais da cascata inflamatória através da mensuração da viabilidade celular (OECD, 2019).

A viabilidade celular nos modelos de epiderme humana reconstruída é mensurada através do ensaio MTT que avalia a citotoxicidade induzida após a exposição das células à uma determinada amostra. Esse é um ensaio colorimétrico que avalia a viabilidade celular através da atividade mitocondrial das células (VAN MEERLOO; KASPERS; CLOOS, 2011). O ensaio se baseia na redução do MTT (coloração amarela) em formazan pela enzima succinato desidrogenase que está presente na mitocôndria das células ativas. A quantidade de formazan (precipitados de cor roxa) produzida é proporcional ao número de células que possuem atividade metabólica e que, conseqüentemente, estão viáveis.

São classificados como irritantes as amostras que reduzem em 50% ou mais a viabilidade celular quando comparada a viabilidade celular do controle negativo (composto não irritante). As amostras são consideradas não irritantes quando apresentam viabilidade celular superior a 50% da viabilidade celular do controle negativo. Os valores de desvio padrão aceitáveis para o teste são aqueles menores que 18% (OECD, 2019).

Assim, o potencial irritativo da formulação contendo os nanocarreadores lipídicos em modelo de epiderme reconstituída foi avaliado e os resultados obtidos estão apresentados na Figura 30.

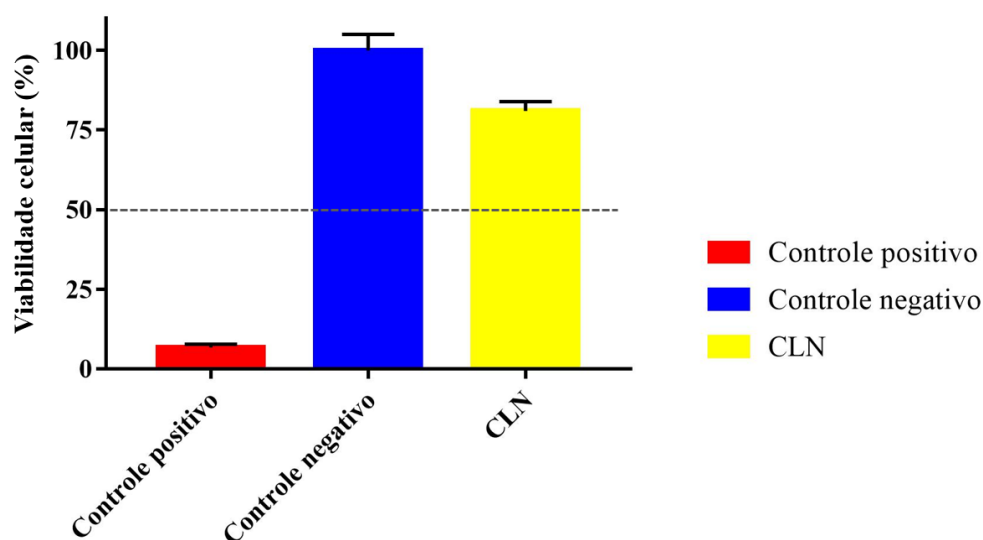


Figura 30: Viabilidade celular (%) obtida a partir de testes de potencial irritativo em epiderme humana reconstruída após tratamento com SDS 5% (controle positivo), solução salina 0,9% (controle negativo) e nanocarreadores lipídicos contendo minoxidil e latanoprost (CLN). Resultados apresentados como médias \pm desvio padrão; n = 3.

O controle negativo (NaCl 0,9%), substância conhecidamente não irritante, foi considerada como 100% da viabilidade celular. Já o controle positivo (SDS 5%), substância conhecidamente irritante, reduziu bastante a viabilidade celular apresentando um valor de 6,75%, bem menor que o valor preconizado (50%) pelo guia da OECD. Após a aplicação da formulação contendo as nanocarreadores lipídicos a viabilidade celular foi preservada, mantendo 80,96% das células que compõem a epiderme humana reconstruída viáveis. Considera-se, portanto, que a formulação dos nanocarreadores que não causa irritação cutânea, corroborando o resultado do ensaio HET-CAM, o que garante a segurança para sua aplicação tópica.

Os nanocarreadores lipídicos são conhecidos por terem como características principais a biocompatibilidade e o baixo potencial irritativo devido sua composição, majoritariamente lipídica (GARCÊS et al., 2018; SHARMA et al., 2017). Sistemas lipídicos nanoparticulados já tiveram seu potencial irritativo testado (*in vitro* e *in vivo*) utilizando diferentes metodologias e os estudos mostram que não há dano na pele após a aplicação desses nanossistemas (GONZÁLEZ-MIRA et al., 2011; VAIRO et al., 2019; WANG et al., 2017).

Os carreadores lipídicos nanoestruturados são seguros por não causarem sensibilização, eritema, edema, inflamação ou qualquer outro sinal de irritação cutânea. Inclusive, estudos sugerem sua utilização para melhorar a tolerabilidade na utilização de medicamentos conhecidamente irritantes (como por exemplo a tretinoína), sendo essas nanoformulações lipídicas mais seguras que as formas tradicionalmente usadas nos produtos comerciais (CZAJKOWSKA-KOŚNIK; SZEKALSKA; WINNICKA, 2019).

6.6. AVALIAÇÃO *IN VITRO* DA LIBERAÇÃO

6.6.1. Avaliação da solubilidade dos fármacos no meio receptor

Para a realização dos estudos *in vitro* de liberação e de permeação cutânea é necessário que a solução receptora garanta a condição *sink*, a qual estabelece que a concentração de fármaco no compartimento receptor não pode exceder 10% de sua solubilidade no meio em estudo para que não haja saturação do líquido receptor (AZARMI; ROA; LÖBENBERG, 2007; RUELA et al., 2016).

Dá-se preferência para o uso de soluções aquosas com valores de pH próximos ao fisiológico. O minoxidil é um fármaco altamente solúvel em água, porém, devido à baixa solubilidade da latanoprosta em água, cerca de 0,05 mg/mL (RODRIGUEZ-ALLER et al., 2015), optou-se por adicionar o tensoativo Tween 80[®] ao tampão fosfato para aumentar a solubilidade da latanoprosta no meio receptor.

Considerando que a concentração de latanoprosta usada nos ensaios propostos será de aproximadamente 500 µg/mL, que será usado 1 mL das formulações no compartimento doador e que a o compartimento receptor comporta 15 mL de solução tampão, caso todo fármaco passasse para o líquido receptor, a concentração seria de aproximadamente 33,3 µg/mL. A Tabela 10 mostra os valores de solubilidade experimental de ambos os fármacos, mostrando que todas as quantidades de Tween 80[®] testadas seriam adequadas para garantir a condição *sink*.

Tabela 10: Solubilidade do minoxidil (MXS) e da latanoprosta (LAT) em solução tampão fosfato 0,1M (pH 7.4) com diferentes quantidades de Tween 80[®] (m/v) – massa/volume.

| Concentração de Tween 80 [®] (m/v) | Solubilidade MXS (mg/mL) | Solubilidade LAT (mg/mL) |
|--|-----------------------------|-----------------------------|
| 1,0% | 5443,79 | 0,98 |
| 2,5% | 5206,53 | 3,49 |
| 5,0% | 7212,16 | 6,78 |

Para os experimentos desse trabalho foi selecionada a concentração de 2,5% de Tween 80[®] para que houvesse uma margem grande de garantia (de 10 vezes o requerido para garantir as condições *sink*) caso optássemos por outras concentrações de trabalho.

6.6.2. Avaliação *in vitro* da liberação dos fármacos

O estudo de liberação *in vitro* foi realizado com o objetivo de avaliar a velocidade com que os fármacos são liberados dos nanocarreadores lipídicos. Os perfis de liberação do minoxidil e da latanoprosta foram comparados ao de um controle que continha os fármacos na sua forma livre na mesma concentração que nas nanopartículas. Os resultados gráficos dos perfis de liberação estão apresentados na Figura 31.

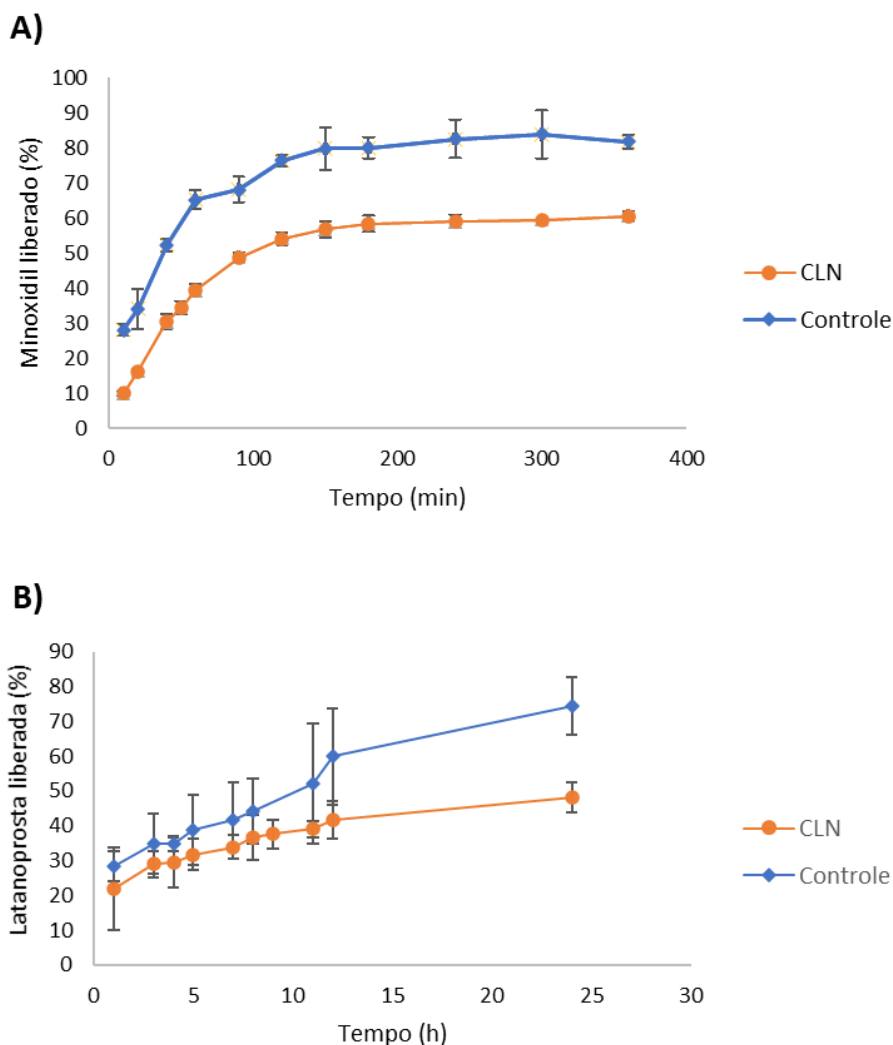


Figura 31: Perfis de liberação do minoxidil (A) e da latanoprost (B) a partir dos nanocarreadores lipídicos (CLN) em comparação ao controle com a mesma concentração dos fármacos livres em solução; n = 4. Resultados apresentados como média \pm desvio padrão.

Os perfis de liberação dos fármacos são diferentes devido principalmente às diferenças de afinidade entre eles e a matriz lipídica que compõem os nanossistemas. Assim, para o minoxidil, observa-se uma liberação mais rápida e para a latanoprost, uma liberação bem mais lenta. Por esse motivo foram realizadas coletas em diferentes intervalos de tempo para cada um dos fármacos (de zero a 6 horas para o minoxidil e de zero a 24 horas para a latanoprost).

Logo no início do estudo (90 minutos) praticamente 70% de minoxidil proveniente da solução controle atravessou a membrana de celulose e ficou disponível no compartimento receptor. Contudo, o fármaco contido nos nanocarreadores lipídicos foi liberado numa velocidade menor, deixando quase 50% de minoxidil livre no meio receptor após os mesmos 90 minutos de ensaio. Após a terceira hora a liberação atingiu

uma estabilização em torno de 60%, mostrando que a nanoformulação foi capaz de controlar a liberação do minoxidil.

A encapsulação de fármacos hidrofílicos como a clindamicina e o voriconazol em carreadores lipídicos nanoestruturados gerou perfis de liberação semelhantes ao do observado para o minoxidil (SANTOS et al., 2018; TOLENTINO et al., 2020). Por serem hidrofílicos, eles têm pouca afinidade com os lipídios que compõe a matriz das nanopartículas, tendo grande preferência por meios mais aquosos como é o caso da solução tampão (solução receptora). Além disso, a alta carga de minoxidil, que tem na partícula em relação a quantidade de lipídios que formam a matriz dos nanocarreadores, acelera a liberação do fármaco.

Diferente do observado para o minoxidil, a liberação da latanoprostá a partir dos nanocarreadores ocorreu de forma bastante controlada, pois ao final de 24 horas de ensaio menos de 50% do fármaco foi liberado. Esse perfil já era esperado devido às características lipofílicas da latanoprostá que faz com que o fármaco tenha muita afinidade com a matriz lipídica dos nanocarreadores, ficando fortemente associado aos nanossistemas.

O perfil de liberação lento e prolongado de fármacos lipofílicos a partir carreadores lipídicos nanoestruturados também já foi reportado. Um trabalho que avaliou o perfil de liberação do clobetasol mostrou que no terceiro dia de ensaio apenas 50% do fármaco havia sido liberado (ANGELO et al., 2020). Um comportamento parecido foi observado com nanocarreadores lipídicos contendo timol e óleo essencial de *Lippia origanoides*, substâncias conhecidamente hidrofóbicas que após 24 horas de estudo tiveram pouco mais de 20% liberadas (PIRES et al., 2019).

A liberação de fármacos a partir de nanocarreadores lipídicos ocorre por difusão e degradação dos lipídios da partícula (CZAJKOWSKA-KOŚNIK; SZEKALSKA; WINNICKA, 2019), podendo ser mais lenta ou mais rápida de acordo com as características do fármaco. Os perfis indicam que liberação dos fármacos foi mais lenta para a latanoprostá e sustentada para o minoxidil, sendo adequadas para a finalidade proposta, que é funcionar como um sistema de depósito nos folículos pilosos (ANGELO et al., 2020; PARDEIKE; HOMMOSS; MÜLLER, 2009).

6.7. AVALIAÇÃO *IN VITRO* DA PENETRAÇÃO CUTÂNEA

Na Figura 32 estão apresentadas as quantidades de latanoprost e minoxidil recuperadas das camadas da pele após 24 horas de ensaio de penetração cutânea com os nanocarreadores lipídicos em comparação a uma solução com os fármacos livres.

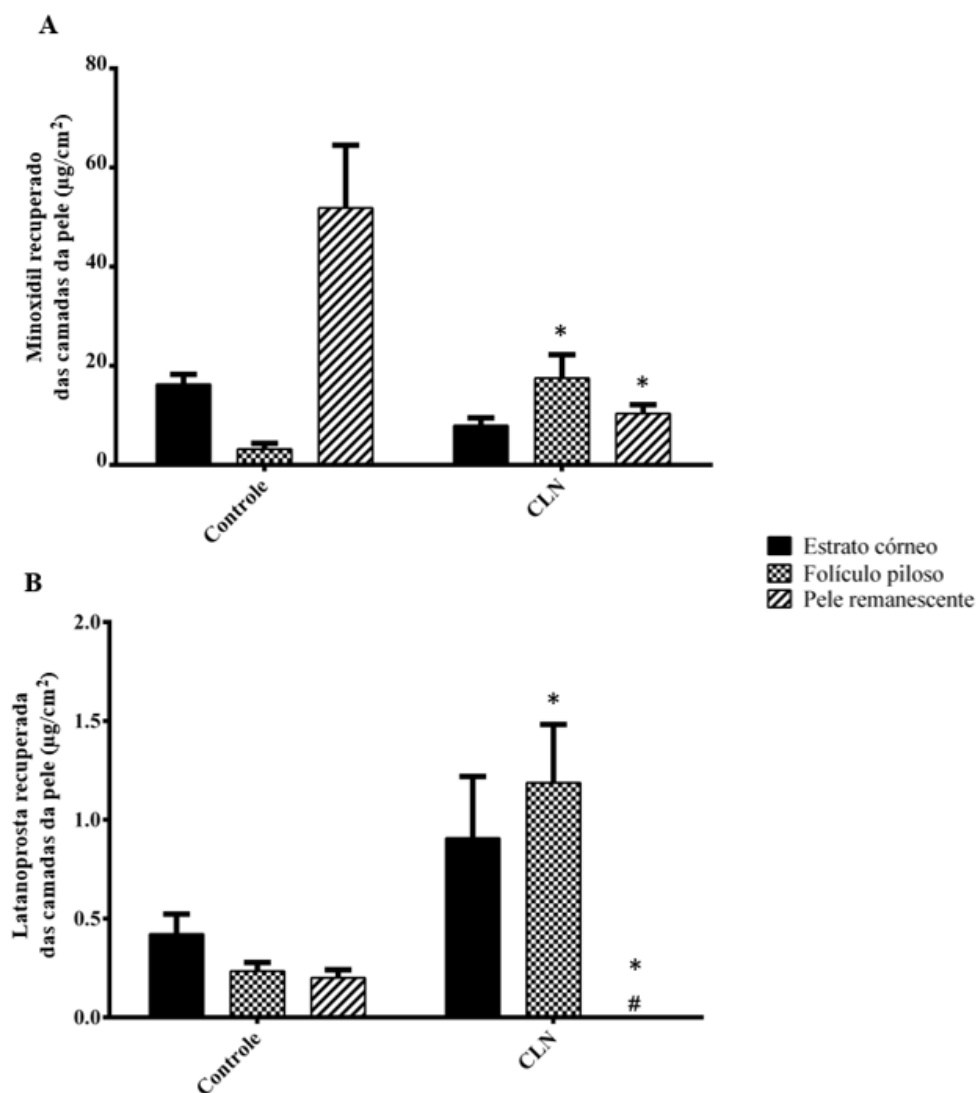


Figura 32: Quantificação de (A) minoxidil e de (B) latanoprost após ensaios *in vitro* de penetração cutânea de 24h em células de Franz. Resultados apresentados como média \pm desvio padrão; n = 5. CLN: nanocarreadores lipídicos; Controle: solução aquosa com 2% de minoxidil e 0,05% de latanoprost; (#) não foi detectada latanoprost na pele remanescente.

A formulação contendo nanocarreadores lipídicos aumentou significativamente, em 3 vezes ($p < 0,05$) o acúmulo de latanoprost nos folículos pilosos em relação ao seu controle. Em relação à quantidade de minoxidil, também foi observado um aumento significativo de 2 vezes ($p < 0,05$) na concentração deste fármaco liberada nos folículos pilosos a partir dos nanocarreadores em comparação ao controle.

Como dito anteriormente, os orifícios foliculares são capazes de acomodar as nanopartículas lipídicas (BLUME-PEYTAVI; VOGT, 2011; MATOS et al., 2015a; PATZELT; LADEMANN, 2013), uma vez que elas possuem diâmetro inferior a 500 nm. Além disso, entende-se haver uma afinidade entre o material lipídico que compõe os nanocarreadores lipídicos e o sebo contido no interior dos folículos pilosos da pele, secretadas por glândulas sebáceas a eles associadas (FANG et al., 2014; GOMES et al., 2014; KATZER et al., 2019; PEREIRA et al., 2018).

A utilização de formulações que contenham nanocarreadores lipídicos para a administração tópica de substâncias cujo alvo de ação são os folículos pilosos vem sendo proposta em estudos. Esse tipo de nanoformulação é muito benéfica para direcionar a liberação dos fármacos para o local desejado, isso porque os sistemas coloidais parecem possuir uma tendência natural de se acumularem nos folículos pilosos (LADEMANN et al., 2015; SANTOS et al., 2018; TOLENTINO et al., 2020). De fato, um estudo recente mostrou que a via folicular tem forte influência na penetração cutânea de fármacos a partir de carreadores lipídicos nanoestruturados. Isso porque nesse estudo, quando os folículos pilosos foram bloqueados artificialmente houve um grande impacto na permeação cutânea de fármacos, aumentando a retenção de substâncias mais lipofílicas no estrato córneo e favorecendo a penetração de substâncias mais hidrofílicas para as camadas mais profundas da pele (PEREIRA et al., 2021), o que não ocorreu quando os fármacos estavam em sua forma livre.

Com relação às quantidades dos fármacos retidos no estrato córneo e na pele remanescente, os nanocarreadores restringiram a penetração do minoxidil nessas camadas da pele, e essa restrição chegou a ser igual a 5 vezes ($p < 0,05$) se considerarmos as camadas mais profundas da pele (PR). Ainda que de maneira mais sutil, as nanopartículas também restringiram a penetração da latanoprostá para a PR.

Essa restrição de penetração através das vias epidérmicas é possivelmente causada pelo controle da liberação que os nanocarreadores lipídicos promovem, como indicado nos ensaios de liberação, e também pelas características físico-químicas dos fármacos que interagem de maneira diferente com a matriz cutânea. Ao comparar a quantidade de minoxidil e de latanoprostá que penetrou as camadas da pele após a administração do controle (solução com fármacos livres) é possível observar que o minoxidil permeou o estrato córneo e acumulou na pele remanescente. Já a latanoprostá, que possui um

coeficiente de partição ($\log P = 4,28$) muito maior que o do minoxidil ($\log P = 0,44$), ficou mais retida no estrato córneo – que é a camada mais lipofílica da pele – e nos folículos pilosos, que possuem um conteúdo lipídico devido ao sebo secretado pelas glândulas sebáceas (OLIVEIRA et al., 2020b; PEREIRA et al., 2018).

Não houve quantificação de nenhum dos fármacos na solução receptora após as 24 horas de ensaio *in vitro* de permeação cutânea da formulação contendo os nanocarreadores lipídicos e dos controles. Esse achado sugere que, nas condições de estudo, não deve haver absorção sistêmica apreciável dos fármacos após a administração deles na pele, o que provavelmente evitaria a ocorrência de efeitos adversos sistêmicos (GEORGETTI et al., 2008; KANDEKAR et al., 2018).

De maneira geral, o fato de não haver detecção na solução receptora e a restrição de penetração dos fármacos pelas vias epidérmicas proporcionada pelos nanocarreadores lipídicos deve favorecer a terapia tópica da alopecia (PEREIRA et al., 2021). Tudo isso, aliado ao fato de que o principal objetivo que era carrear os fármacos para o local de ação (folículos pilosos) foi desempenhado com sucesso.

Na Tabela 11 abaixo estão apresentados os valores do fator de direcionamento calculado para a formulação contendo os nanocarreadores lipídicos e para a solução controle com os fármacos livres. O cálculo foi feito dividindo-se a quantidade de fármaco acumulada nos folículos pilosos pelo total da quantidade de fármaco retido em todas as camadas da pele (estrato córneo, folículo piloso e pele remanescente).

Tabela 11: Valores do fator de direcionamento dos fármacos para os folículos pilosos após 24 h de ensaio *in vitro* de penetração cutânea da formulação contendo os nanocarreadores lipídicos (CLN) e do controle solução aquosa com 2% de minoxidil e 0,05% de latanoprostá.

| | Fator de direcionamento | |
|---------------------|-------------------------|-------|
| | Controle | CLN |
| Minoxidil | 0,101 | 0,505 |
| Latanoprostá | 0,336 | 0,560 |

Pode-se verificar que com a incorporação dos fármacos nos nanocarreadores lipídicos, o fator de direcionamento do minoxidil para os folículos pilosos foi aumentado em 5 vezes em relação à solução controle (de 0,101 para 0,505) e para a latanoprostá, o aumento foi de quase 2 vezes (de 0,336 para 0,560). Com isso, temos que a nanoformulação de fato direcionou significativamente a liberação de ambos os fármacos

para os folículos pilosos, que é o local de ação para ambos os fármacos, o que em último caso resulta em maior eficiência terapêutica e redução de efeitos colaterais com a terapia tópica da alopecia utilizando essa nova formulação nanoestruturada.

Estudos recentes do nosso grupo evidenciam essa habilidade das partículas nanométricas em direcionar a liberação dos fármacos para os folículos pilosos, aumentando o fator de direcionamento dessas formulações quando comparadas aos controles. Tanto os nanossistemas poliméricos (a base de policaprolactona, quitosana e ácido hialurônico) quanto os produzidos com lipídios foram capazes de aumentar o fator de direcionamento para as unidades pilosebáceas em até três vezes mais (PEREIRA et al., 2021; TOLENTINO et al., 2020, 2021; USHIROBIRA et al., 2020).

Em geral, logo após uma administração passiva, as nanopartículas tendem a ficar retidas no EC ou a acumular-se nos apêndices cutâneos, especialmente nos folículos pilosos. Essas invaginações funcionam como um local de armazenamento e reserva, onde os nanossistemas liberam o seu conteúdo (fármaco) de forma gradual. A aplicação de uma massagem manual na pele provoca um movimento que tende a direcionar o transporte de nanopartículas para os folículos pilosos (ANGELO et al., 2020; RADTKE et al., 2017). O estímulo físico parece originar um deslocamento lateral do pelo, deixando ainda mais exposto o orifício do infundíbulo, aumentando assim a área disponível para que as nanopartículas penetrem na pele (PROW et al., 2011).

Recentemente alguns estudos mostraram que a administração de formulações nanoparticuladas (lipídicas ou poliméricas) na pele seguida de aplicação de massagem manual aumentou as quantidades de fármaco que penetram a pele, direcionando principalmente para os folículos pilosos (ANGELO et al., 2020; RADTKE et al., 2017; USHIROBIRA et al., 2020). Essa tendência provavelmente está em maior parte associada ao tamanho nanométrico das partículas do que com sua natureza lipídica ou polimérica (OLIVEIRA et al., 2020a).

A fim de averiguar a influência de uma estimulação mecânica na liberação dos fármacos na pele, foi realizado um ensaio de penetração cutânea após a formulação ser massageada de 3 minutos sobre a pele. Na Figura 33 estão apresentadas as quantidades de minoxidil e latanoprostá recuperadas das camadas da pele após 24 horas de ensaio de

penetração cutânea com os nanocarreadores lipídicos com e sem a aplicação da massagem.

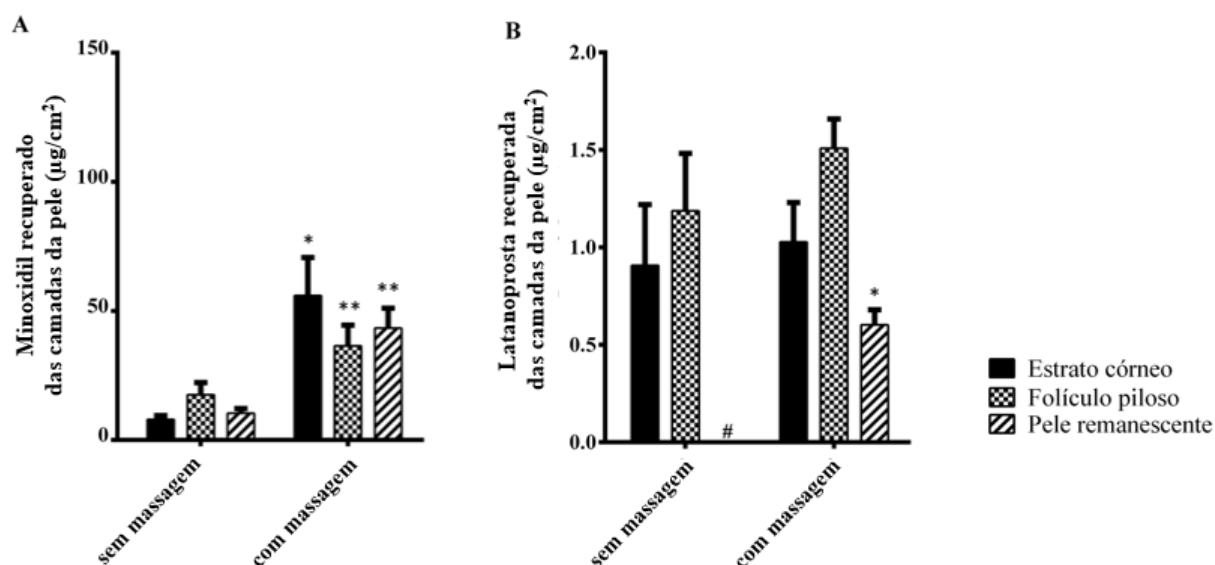


Figura 33: Resultados da quantificação de (A) minoxidil e de (B) latanoprosta recuperados após 24h de ensaios *in vitro* de permeação cutânea (com e sem massagem prévia) a partir da formulação contendo os nanocarreadores lipídicos. Resultados apresentados como média \pm desvio padrão; $n = 5$. (#) não foi detectada latanoprosta na pele remanescente.

A aplicação de massagem aumentou consideravelmente a quantidade de minoxidil e de latanoprosta que penetrou nas camadas da pele e ainda assim não houve detecção dos fármacos na solução receptora, como ocorreu para permeação sem massagem. Esse aumento foi bastante pronunciado para o minoxidil, já que a quantidade recuperada no estrato córneo foi 7 vezes ($p < 0,05$) maior quando comparada a quantidade recuperada após a penetração sem o massageamento. Também houve um aumento significativo ($p < 0,01$) nas concentrações de minoxidil que ficaram retidas na pele remanescente (4 vezes) e nos folículos pilosos (2 vezes). Já em relação a latanoprosta, o aumento na quantidade de fármaco nas camadas da pele foi menos pronunciado.

Utilizar nanoestruturas para administração cutânea de fármacos oferece diversas vantagens físico-químicas para a formulação em si e no seu desempenho. Esses sistemas coloidais favorecem a permeação cutânea de substâncias por possuírem mecanismos de interação com a pele que aumentam a biodisponibilidade do fármaco no local (BORGHETTI-CARDOSO et al., 2016). Acredita-se que após uma massagem, o estímulo mecânico realizado promove uma interação do coloide com a pele, isso tende a aumentar a deposição dos nanossistemas nos folículos pilosos e, provavelmente como

consequência, também aumentar a penetração do seu conteúdo em outras camadas da pele (ANGELO et al., 2020; SANTOS et al., 2018; USHIROBIRA et al., 2020).

A Tabela 12 retoma os valores do fator de direcionamento para os folículos pilosos obtidos no ensaio de penetração cutânea passiva (sem massagem) da formulação contendo os nanocarreadores lipídicos e da solução controle a fim de comparar com os valores obtidos no ensaio de penetração cutânea com massagem da formulação com as nanopartículas.

Tabela 12: Valores do fator de direcionamento dos fármacos para os folículos pilosos após 24 h de ensaio *in vitro* de penetração cutânea (sem e com massagem) da formulação contendo os nanocarreadores lipídicos (CLN) e do controle com solução aquosa com 2% de minoxidil e 0,05% de latanoprost.

| | Fator de direcionamento | | |
|--------------------|-------------------------|------------------|------------------|
| | Controle | CLN sem massagem | CLN com massagem |
| Minoxidil | 0,101 | 0,505 | 0,278 |
| Latanoprost | 0,336 | 0,560 | 0,464 |

Apesar de ter aumentado a quantidade de fármaco recuperado em cada uma das camadas da pele, foi observada uma redução dos fatores de direcionamento para os folículos pilosos. Essa piora no direcionamento ocorreu principalmente porque o aumento da penetração dos fármacos foi generalizado (em todas as camadas da pele) e não só nos folículos pilosos. Outra possibilidade é que o estímulo físico do massageamento poderia estar desfazendo os nanocarreadores lipídicos por causa da própria fricção e também devido ao calor. Um aumento da temperatura no local facilmente provocaria a desorganização dos lipídicos que compõe as nanopartículas.

7. CONCLUSÕES

O estudo obteve sucesso em desenvolver de forma inédita nanocarreadores lipídicos para a incorporação de dois fármacos promissores para o tratamento tópico da alopecia. O método bioanalítico por LC-MC se mostrou eficiente para a quantificação de minoxidil e latanoprostá na presença de contaminantes. A nanoformulação demonstrou biocompatibilidade e sua aplicação por longos períodos não deverá causar irritação no paciente devido sua composição lipídica e livre de solventes orgânicos. De fato, os ensaios *in vitro* mostraram o baixo índice de irritabilidade da nanoformulação desenvolvida.

Os nanocarreadores lipídicos apresentaram características adequadas para uma aplicação cutânea visando ao direcionamento para os folículos pilosos. Eles foram capazes de encapsular mais que 85% de ambos os fármacos, e manter esse teor inalterado por 3 meses armazenados sob refrigeração. Além disso, os nanossistemas controlaram a liberação dos dois fármacos, ainda que o controle exercido sobre o fármaco lipofílico tenha sido mais prolongado.

Quando aplicados sobre a pele, os nanocarreadores mostraram-se capazes de direcionar até 3 vezes mais a penetração dos fármacos para os folículos pilosos, e, ao mesmo tempo, restringir a quantidade de minoxidil e latanoprostá acumulada nas outras camadas da pele, que não são locais de interesse para a terapia da alopecia. Por fim, o massagemamento, apesar de ter promovido uma maior penetração cutânea dos fármacos, reduziu um pouco a concentração dos fármacos direcionada para os folículos pilosos.

8. PERSPECTIVAS FUTURAS

Como perspectiva a curto prazo do estudo, destacam-se ensaios *in vitro* em linhagem celular de queratinócitos humanos com os fármacos isolados, associados e com a formulação dos nanocarreadores lipídicos que vem sendo padronizados junto ao grupo de pesquisa da Profa. Dra. Juliana Lott. Esses estudos buscam avaliar por meio da análise de marcadores de crescimento celular a atividade da nanoformulação bem como os mecanismo de ação dos fármacos.

9. REFERÊNCIAS

- ADIL, A.; GODWIN, M. The effectiveness of treatments for androgenetic alopecia: A systematic review and meta-analysis. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 77, n. 1, p. 136- 141.e5, jul. 2017.
- ALMOHANNA, H. M.; PERPER, M.; TOSTI, A. Safety concerns when using novel medications to treat alopecia. **Expert Opinion on Drug Safety**, v. 17, n. 11, p. 1115–1128, 2018.
- ANDRADE, L. M. et al. Voriconazole-loaded nanostructured lipid carriers for ocular drug delivery. **Cornea**, v. 35, n. 6, p. 866–871, 2016.
- ANDROSCH, R.; ZHANG, R.; SCHICK, C. Melt-recrystallization of poly (l-lactic acid) initially containing α' -crystals. **Polymer**, v. 176, p. 227–235, ago. 2019.
- ANGELO, T. et al. Effect of physical stimuli on hair follicle deposition of clobetasol-loaded Lipid Nanocarriers. **Scientific Reports**, v. 10, n. 1, p. 1–13, 2020.
- ÂNGELO, T. et al. Chromatographic method for clobetasol propionate determination in hair follicles and in different skin layers. **Biomedical Chromatography**, v. 31, n. 2, p. 1–7, 2017.
- ÂNGELO, T. **Combinação de nanocarreadores lipídicos e métodos físicos para retenção de propionato de clobetasol em folículos pilosos**. [s.l.] Universidade de Brasília, 2018.
- AZARMI, S.; ROA, W.; LÖBENBERG, R. **Current perspectives in dissolution testing of conventional and novel dosage forms** *International Journal of Pharmaceutics*, 2007.
- BANKA, N.; BUNAGAN, M. J. K.; SHAPIRO, J. **Pattern Hair Loss in Men. Diagnosis and Medical Treatment** *Dermatologic Clinics*, 2013.
- BARRÓN-HERNÁNDEZ, Y. L.; TOSTI, A. Bimatoprost for the treatment of eyelash, eyebrow and scalp alopecia. **Expert Opinion on Investigational Drugs**, v. 26, n. 4, p. 515–522, 3 abr. 2017.
- BELOQUI, A. et al. Nanostructured lipid carriers: Promising drug delivery systems for future clinics. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine**, v. 12, n. 1, p. 143–161, 2016.
- BIE, M. et al. Simultaneous Determination of Tetracycline Antibiotics in Beehives by Liquid Chromatography – Triple Quadrupole Mass Spectrometry. **Advances in Applied Science Research**, v. 3, n. 1, p. 462–468, 2012.
- BIENOVÁ, M. et al. Androgenetic alopecia and current methods of treatment. **Acta Dermatovenerologica Alpina, Pannonica et Adriatica**, v. 14, n. 1, p. 5–8, 2005.
- BILBAO, A. et al. Processing strategies and software solutions for data-independent acquisition in mass spectrometry. **Proteomics**, v. 15, n. 5–6, p. 964–980, 2015.

BLOCH, L. D. et al. Latanoprost and minoxidil: Comparative double-blind, placebo-controlled study for the treatment of hair loss. **Surgical and Cosmetic Dermatology**, v. 10, n. 1, p. 39–43, 2018.

BLUME-PEYTAVI, U. et al. A randomized double-blind placebo-controlled pilot study to assess the efficacy of a 24-week topical treatment by latanoprost 0.1% on hair growth and pigmentation in healthy volunteers with androgenetic alopecia. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 66, n. 5, p. 794–800, 2012.

BLUME-PEYTAVI, U.; VOGT, A. Human hair follicle: Reservoir function and selective targeting. **British Journal of Dermatology**, v. 165, n. SUPPL. 2, p. 13–17, 2011.

BORGHETI-CARDOSO, L. et al. Topical and Transdermal Delivery of Drug-Loaded Nano/ Microsystems with Application of Physical Enhancement Techniques. **Current Drug Targets**, v. 17, n. 13, p. 1545–1559, 2 set. 2016.

BRASIL, A. N. DE V. S. (ANVISA). **Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução da Diretoria Colegiada - RDC N° 27 de 17 de maio de 2012. Anais...2012a**

BRASIL, A. N. DE V. S. (ANVISA). **Guia para Avaliação de Segurança de Produtos Cosméticos. Guia para Avaliação de Segurança de Produtos Cosméticos. Anais...2012b** Disponível em: <<http://portal.anvisa.gov.br/documents/106351/107910/Guia+para+Avaliação+de+Segurança+de+Produtos+Cosméticos/ab0c660d-3a8c-4698-853a-096501c1dc7c>>

BRASIL, A. N. DE V. S. (ANVISA). **Agência Nacional de Vigilância Sanitária - Resolução da Diretoria Colegiada - RDC N° 166, de 24 de d julho de 2017. Resolução da Diretoria Colegiada - RDC N° 166, de 24 de d julho de 2017. Anais...Brasil: 2017** Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/documents/10181/2721567/RDC_166_2017_COMP.pdf/d5fb92b3-6c6b-4130-8670-4e3263763401>

BRASIL, A. N. DE V. S. (ANVISA). **Guia de estudos de estabilidade - RDC N° 318, 2019.**

BUHL, A. E. et al. Minoxidil sulfate is the active metabolite that stimulates hair follicles. **Journal of Investigative Dermatology**, 1990.

CASTRO, G. A. et al. Formation of ion pairing as an alternative to improve encapsulation and stability and to reduce skin irritation of retinoic acid loaded in solid lipid nanoparticles. **International Journal of Pharmaceutics**, 2009.

CHOI, Y. M.; DIEHL, J.; LEVINS, P. C. Promising alternative clinical uses of prostaglandin F₂α analogs: Beyond the eyelashes. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 72, n. 4, p. 712–716, abr. 2015.

CORRÊA, M. A. **COSMETOLOGIA Ciência e Técnica**. 1ª ed. [s.l.] Editora Medfarma, 2012.

CUNHA-FILHO, M. S. S. et al. Validation of analytical method and development of dissolution test for the antineoplastic beta-lapachone. **Latin American Journal of Pharmacy**, 2009.

CZAJKOWSKA-KOŚNIK, A.; SZEKALSKA, M.; WINNICKA, K. Nanostructured lipid carriers: A potential use for skin drug delivery systems. **Pharmacological Reports**, v. 71, n. 1, p. 156–166, fev. 2019.

DARSAZAN, B. et al. Evaluation of Ion-pair Formation of Adefovir to Improve Permeation across Artificial and Biological Membranes. **Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**, v. 21, n. 1, p. 160–170, 2019.

DE ORSI, D. et al. High-performance liquid chromatography-diode array and electrospray-mass spectrometry analysis of non-allowed substances in cosmetic products for preventing hair loss and other hormone-dependent skin diseases. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 48, n. 3, p. 641–648, 2008.

DE VARGAS, B. A. et al. Validation of an LC method to determine skin retention profile of genistein from nanoemulsions incorporated in hydrogels. **Journal of Chromatographic Science**, v. 50, n. 2, p. 114–118, 2012.

DIGIUNI, M.; FOGAGNOLO, P.; ROSSETTI, L. A review of the use of latanoprost for glaucoma since its launch. **Expert Opinion on Pharmacotherapy**, v. 13, n. 5, p. 723–745, 2012.

DOURADO, D. Thermal Analysis as a Useful Tool in Drug-Excipient Compatibility Studies: The Impact in Pharmaceuticals Products. **Biomedical Journal of Scientific & Technical Research**, v. 22, n. 3, 31 out. 2019.

DUTKIEWICZ, R.; ALBERT, D. M.; LEVIN, L. A. Effects of latanoprost on tyrosinase activity and mitotic index of cultured melanoma lines. **Experimental Eye Research**, 2000.

FABBROCINI, G. et al. Female pattern hair loss: A clinical, pathophysiologic, and therapeutic review. **International Journal of Women's Dermatology**, v. 4, n. 4, p. 203–211, 2018.

FANG, C.-L. et al. Delivery and targeting of nanoparticles into hair follicles. **Therapeutic Delivery**, v. 5, n. 9, p. 991–1006, 22 set. 2014.

FATHALLA, D.; FOUAD, E. A.; SOLIMAN, G. M. Latanoprost niosomes as a sustained release ocular delivery system for the management of glaucoma. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, v. 46, n. 5, p. 806–813, 2020.

FDA, F. AND D. A. **Bioanalytical Method Validation Guidance Food and Drug Administration**, 2018.

FERREIRA-NUNES, R. et al. Versatile chromatographic method for catechin determination in development of topical formulations containing natural extracts. **Biomedical Chromatography**, v. 32, n. 2, p. 1–8, 2018.

FIREMAN, S. et al. A look at emerging delivery systems for topical drug products. **Dermatologic Therapy**, v. 24, n. 5, p. 477–488, set. 2011.

FLUHR, J. W. et al. Skin irritation and sensitization: Mechanisms and new approaches for risk assessment. 1. Skin irritation. **Skin Pharmacology and Physiology**, v. 21, n. 3,

p. 124–135, 2008.

GARCÊS, A. et al. Formulations based on solid lipid nanoparticles (SLN) and nanostructured lipid carriers (NLC) for cutaneous use: A review. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 112, n. September 2017, p. 159–167, 2018.

GELFUSO, G. M. et al. Chitosan microparticles for sustaining the topical delivery of minoxidil sulphate. **Journal of Microencapsulation**, v. 28, n. 7, p. 650–658, 2011.

GELFUSO, G. M. et al. Iontophoresis-targeted, follicular delivery of minoxidil sulfate for the treatment of alopecia. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, 2013.

GEORGETTI, S. R. et al. Evaluation of in vivo efficacy of topical formulations containing soybean extract. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 352, n. 1–2, p. 189–196, 2008.

GHARIB, R. et al. **Liposomes incorporating cyclodextrin-drug inclusion complexes: Current state of knowledge** *Carbohydrate Polymers*, 2015.

GOMES, M. J. J. et al. Lipid nanoparticles for topical and transdermal application for alopecia treatment: development, physicochemical characterization, and in vitro release and penetration studies. **International Journal of Nanomedicine**, v. 9, n. July, p. 1231, mar. 2014.

GONZÁLEZ-MIRA, E. et al. Potential Use of Nanostructured Lipid Carriers for Topical Delivery of Flurbiprofen. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 100, n. 1, p. 242–251, jan. 2011.

GOREN, A.; NACCARATO, T. Minoxidil in the treatment of androgenetic alopecia. **Dermatologic Therapy**, v. 31, n. 5, p. 1–2, 2018.

GUARRERA, M.; REBORA, A. Kenogen in female androgenetic alopecia: A longitudinal study. **Dermatology**, 2005.

GUPTA, A. K. et al. Efficacy of Off-Label Topical Treatments for the Management of Androgenetic Alopecia: A Review. **Clinical Drug Investigation**, v. 39, n. 3, p. 233–239, 2019.

GUSTAVO GONZÁLEZ, A.; ÁNGELES HERRADOR, M. A practical guide to analytical method validation, including measurement uncertainty and accuracy profiles. **TrAC - Trends in Analytical Chemistry**, v. 26, n. 3, p. 227–238, 2007.

HAN, J. H. et al. Effect of minoxidil on proliferation and apoptosis in dermal papilla cells of human hair follicle. **Journal of Dermatological Science**, v. 34, n. 2, p. 91–98, 2004.

HARRIS, M. I. N. DE C. **Pele: estrutura, propriedades e envelhecimento**. [s.l.: s.n.].

HO, K. K.; CAMPBELL, K. L.; LAVERGNE, S. N. Contact dermatitis: A comparative and translational review of the literature. **Veterinary Dermatology**, v. 26, n. 5, p. 314–e67, 2015.

ICH. **ICH Topic Q2 (R1) Validation of Analytical Procedures: Text and**

Methodology International Conference on Harmonization, 2005.

ICH, I. C. ON H. **ICH Harmonised Guideline - Bioanalytical Method Validation - M10**, 2019.

JÍROVÁ, D. et al. Comparison of human skin irritation patch test data with in vitro skin irritation assays and animal data. **Contact Dermatitis**, 2010.

JOHNSTONE, M. A.; ALBERT, D. M. Prostaglandin-Induced Hair Growth. **Survey of Ophthalmology**, v. 47, n. 4 SUPPL. 1, p. S185–S202, ago. 2002.

KANDEKAR, S. G. et al. Selective delivery of adapalene to the human hair follicle under finite dose conditions using polymeric micelle nanocarriers. **Nanoscale**, v. 10, n. 3, p. 1099–1110, 2018.

KATZER, T. et al. Physiopathology and current treatments of androgenetic alopecia: Going beyond androgens and anti-androgens. **Dermatologic Therapy**, 26 ago. 2019.

KOLLE, S. N. et al. Erratum to “Applicability of in vitro tests for skin irritation and corrosion to regulatory classification schemes: Substantiating test strategies with data from routine studies” [Regul. Toxicol. Pharmacol. (2012) 402-414]. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v. 65, n. 3, p. 366–378, 2013.

KOSE, O. et al. Evaluation of skin irritation potentials of different cosmetic products in Turkish market by reconstructed human epidermis model. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v. 98, n. July, p. 268–273, 2018.

KUMAR, R.; SINHA, V. R. Solid lipid nanoparticle: an efficient carrier for improved ocular permeation of voriconazole. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, v. 42, n. 12, p. 1956–1967, 2016.

KUMAR, R.; SINHA, V. R. Lipid Nanocarrier: an Efficient Approach Towards Ocular Delivery of Hydrophilic Drug (Valacyclovir). **AAPS PharmSciTech**, v. 18, n. 3, p. 884–894, 2017.

LADEMANN, J. et al. Nanoparticles – An efficient carrier for drug delivery into the hair follicles. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 66, n. 2, p. 159–164, maio 2007.

LADEMANN, J. et al. Hair follicles as a target structure for nanoparticles. **Journal of Innovative Optical Health Sciences**, v. 8, n. 4, p. 1–8, 2015.

LAUTERBACH, A.; MÜLLER-GOYMANN, C. C. Applications and limitations of lipid nanoparticles in dermal and transdermal drug delivery via the follicular route. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 97, p. 152–163, 2015.

LUEPKE, N. P. Hen’s egg chorioallantoic membrane test for irritation potential. **Food and Chemical Toxicology**, 1985.

LV, Z. et al. Study on melting and recrystallization of poly(butylene succinate) lamellar crystals via step heating differential scanning calorimetry. **Chinese Journal of Polymer Science**, v. 35, n. 12, p. 1552–1560, 8 dez. 2017.

MAKONI, P. A.; KASONGO, K. W.; WALKER, R. B. Short term stability testing of efavirenz-loaded solid lipid nanoparticle (SLN) and nanostructured lipid carrier (NLC) dispersions. **Pharmaceutics**, v. 11, n. 8, 2019.

MANABE, M. et al. Guidelines for the diagnosis and treatment of male-pattern and female-pattern hair loss, 2017 version. **Journal of Dermatology**, v. 45, n. 9, p. 1031–1043, 2018.

MANDAWGADE, S. D.; PATRAVALE, V. B. Development of SLNs from natural lipids: Application to topical delivery of tretinoin. **International Journal of Pharmaceutics**, 2008.

MANSBERGER, S. L.; CIOFFI, G. A. Eyelash formation secondary to treatment in a patient with alopecia. **Archives of Ophthalmology**, 2000.

MARTINEZ-JACOBO, L. et al. Genetic and molecular aspects of androgenetic alopecia. **Indian Journal of Dermatology, Venereology and Leprology**, v. 84, n. 3, p. 263–268, 2018.

MATHES, C. et al. Nanocarriers for optimizing the balance between interfollicular permeation and follicular uptake of topically applied clobetasol to minimize adverse effects. **Journal of Controlled Release**, v. 223, p. 207–214, fev. 2016.

MATOS, B. N. et al. Chitosan nanoparticles for targeting and sustaining minoxidil sulphate delivery to hair follicles. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 75, p. 225–229, 2015a.

MATOS, B. N. et al. Iontophoresis on minoxidil sulphate-loaded chitosan nanoparticles accelerates drug release, decreasing their targeting effect to hair follicles. **Quimica Nova**, v. 40, n. 2, p. 154–157, 2017.

MATOS, B. N. B. N. et al. Development and Validation of a Simple and Selective Analytical HPLC Method for the Quantification of Oxaliplatin. **Journal of Chemistry**, v. 2015, p. 1–6, 2015b.

MESSENGER, A. G.; RUNDEGREN, J. Minoxidil: mechanisms of action on hair growth. **British Journal of Dermatology**, v. 150, n. 2, p. 186–194, fev. 2004.

MIZUNO, H. et al. The great importance of normalization of LC–MS data for highly-accurate non-targeted metabolomics. **Biomedical Chromatography**, v. 31, n. 1, 2017.

MÜLLER, R. H.; RADTKE, M.; WISSING, S. A. **Solid lipid nanoparticles (SLN) and nanostructured lipid carriers (NLC) in cosmetic and dermatological preparations.** Advanced Drug Delivery Reviews. **Anais...**2002

NAPOLITANO, M. et al. **Allergic contact dermatitis probably caused by latanoprost during treatment for alopecia areata** **Contact Dermatitis**, 2019.

NATARAJAN, J. V. et al. Nanomedicine for glaucoma: Liposomes provide sustained release of latanoprost in the eye. **International Journal of Nanomedicine**, v. 7, p. 123–131, 2012.

O'TOOLE, L.; CAHILL, M.; O'BRIEN, C. Eyelid hypertrichosis associated with Latanoprost is reversible. **European Journal of Ophthalmology**, 2001.

OECD. Test Guideline No. 439 In Vitro Skin Irritation : Reconstructed Human Epidermis Test Method In Vitro. **OECD Guidelines for the Testing of Chemicals**, v. Section 4, n. 439, p. 1–25, 2019.

ÖHMAN, H.; VAHLQUIST, A. The pH gradient over the stratum corneum differs in X-linked recessive and autosomal dominant ichthyosis: A clue to the molecular origin of the “acid skin mantle”? **Journal of Investigative Dermatology**, 1998.

OLIVEIRA, A. C. S. et al. Latanoprost Loaded in Polymeric Nanocapsules for Effective Topical Treatment of Alopecia. **AAPS PharmSciTech**, v. 21, n. 8, p. 305, 5 nov. 2020a.

OLIVEIRA, A. G. L. et al. Ensaios da membrana córneo-alantoide (HET-CAM e CAM-TBS): alternativas para a avaliação toxicológica de produtos com baixo potencial de irritação ocular Chorioallantoic membrane assays (HET-CAM and CAM-TBS): alternative tests for performing toxicologic. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v. 71, n. 1, p. 153–159, 2012.

OLIVEIRA, P. M. et al. LC–MS bioanalytical method for simultaneous determination of latanoprost and minoxidil in the skin. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 187, p. 113373, ago. 2020b.

PADOIS, K. et al. Solid lipid nanoparticles suspension versus commercial solutions for dermal delivery of minoxidil. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 416, n. 1, p. 300–304, 2011.

PARDEIKE, J.; HOMMOSS, A.; MÜLLER, R. H. Lipid nanoparticles (SLN, NLC) in cosmetic and pharmaceutical dermal products. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 366, n. 1–2, p. 170–184, jan. 2009.

PARK, A. M.; KHAN, S.; RAWNSLEY, J. Hair Biology: Growth and Pigmentation. **Facial Plastic Surgery Clinics of North America**, v. 26, n. 4, p. 415–424, 2018.

PATEL, P.; PATEL, P.; GIRAM, P. Bioanalytical Method Development and Validation for Latanoprost Quantification in Pharmaceutical Ophthalmic Microemulsion Formulation by RP-HPLC. **Journal of Analytical & Bioanalytical Techniques**, v. 6, n. 6, 2015.

PATZELT, A. et al. Selective follicular targeting by modification of the particle sizes. **Journal of Controlled Release**, v. 150, n. 1, p. 45–48, 2011.

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

PEDROSA, T. DO N. et al. A new reconstructed human epidermis for in vitro skin irritation testing. **Toxicology in Vitro**, v. 42, n. January, p. 31–37, 2017.

PEREIRA, M. N. et al. Solid effervescent formulations as new approach for topical minoxidil delivery. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 96, p. 411–419, 2017.

- PEREIRA, M. N. et al. Nanotechnology advances for hair loss. **Therapeutic Delivery**, v. 9, n. 8, p. 593–604, 2018.
- PEREIRA, M. N. et al. Nanostructured lipid carriers for hair follicle-targeted delivery of clindamycin and rifampicin to hidradenitis suppurativa treatment. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 197, n. July 2020, p. 111448, jan. 2021.
- PIRES, F. Q. et al. Use of mixture design in drug-excipient compatibility determinations: Thymol nanoparticles case study. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 137, p. 196–203, abr. 2017.
- PIRES, F. Q. et al. Lipid nanoparticles as carriers of cyclodextrin inclusion complexes: A promising approach for cutaneous delivery of a volatile essential oil. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 182, n. April, p. 110382, out. 2019.
- PROW, T. W. et al. **Nanoparticles and microparticles for skin drug delivery** *Advanced Drug Delivery Reviews*, 2011.
- PURI, A. et al. Lipid-based nanoparticles as pharmaceutical drug carriers: From concepts to clinic. **Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems**, v. 26, n. 6, p. 523–580, 2009.
- QIU, L. et al. Encapsulation of oxaliplatin in nanostructured lipid carriers- preparation , physicochemical characterization and in vitro evaluation. **Asian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 7, n. 5, p. 352–358, 2012.
- QUINTÃO, W. DE S. C. **DESENVOLVIMENTO, CARACTERIZAÇÃO E AVALIAÇÃO IN VITRO DE NANOEMULSÕES O/A A PARTIR DE EXTRATOS DE BROSIMUM GAUDICHAUDII (MAMA-CADELA) COMO ALTERNATIVA PARA O TRATAMENTO TÓPICO DE VITILIGO**. [s.l.] Universidade de Brasília, 2018.
- RADTKE, M. et al. Ratchet effect for nanoparticle transport in hair follicles. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, 2017.
- REIS, T. A. et al. Simple and Selective HPLC-UV/Vis Bioanalytical Method to Determine Aluminum Phthalocyanine Chloride in Skin Permeation Studies. **Journal of Analytical Methods in Chemistry**, v. 2018, 2018.
- RIBANI, M. et al. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Quimica Nova**, v. 27, n. 5, p. 771–780, 2004.
- RODRIGUEZ-ALLER, M. et al. New prostaglandin analog formulation for glaucoma treatment containing cyclodextrins for improved stability, solubility and ocular tolerance. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 95, p. 203–214, 2015.
- ROGERS, N. E.; AVRAM, M. R. **Medical treatments for male and female pattern hair loss** *Journal of the American Academy of Dermatology*, 2008.
- ROSSI, A. et al. Multi-therapies in androgenetic alopecia: review and clinical experiences. **Dermatologic Therapy**, v. 29, n. 6, p. 424–432, 2016.

RUELA, A. L. M. et al. Evaluation of skin absorption of drugs from topical and transdermal formulations. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 52, n. 3, p. 527–544, set. 2016.

SAID, M. A.; MEHTA, A. **The Impact of 5 α -Reductase Inhibitor Use for Male Pattern Hair Loss on Men's Health** *Current Urology Reports*, 2018.

SANTOS, G. A. et al. The role of formulation and follicular pathway in voriconazole cutaneous delivery from liposomes and nanostructured lipid carriers. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 170, n. April, p. 341–346, 2018.

SARGENT, M. **Guide to achieving reliable quantitative LC-MS measurements**. [s.l.: s.n.].

SASAKI, S.; HOZUMI, Y.; KONDO, S. Influence of prostaglandin F 2α and its analogues on hair regrowth and follicular melanogenesis in a murine model. **Experimental Dermatology**, v. 14, n. 5, p. 323–328, 2005.

SCHMID-WENDTNER, M. H.; KORTING, H. C. The pH of the skin surface and its impact on the barrier function. **Skin Pharmacology and Physiology**, v. 19, n. 6, p. 296–302, 2006.

SCHNEIDER, L. A. et al. **Influence of pH on wound-healing: A new perspective for wound-therapy?** *Archives of Dermatological Research*, 2007.

SELVAMUTHUKUMAR, S.; VELMURUGAN, R. Nanostructured Lipid Carriers: A potential drug carrier for cancer chemotherapy. **Lipids in Health and Disease**, v. 11, n. 1, p. 1–8, 2012.

SHAH, K. et al. Solid lipid nanoparticles (SLN) of tretinoin: Potential in topical delivery. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 345, n. 1–2, p. 163–171, 10 dez. 2007.

SHAKER, D. S. et al. Nanoemulsion: A review on mechanisms for the transdermal delivery of hydrophobic and hydrophilic drugs. **Scientia Pharmaceutica**, v. 87, n. 3, 2019.

SHARMA, G. et al. Nanostructured lipid carriers: A new paradigm in topical delivery for dermal and transdermal applications. **Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems**, v. 34, n. 4, p. 355–386, 2017.

SHORTER, K. et al. Human hair follicles contain two forms of ATP- sensitive potassium channels, only one of which is sensitive to minoxidil. **The FASEB Journal**, v. 22, n. 6, p. 1725–1736, 2008.

SILVA, L. A. D. et al. Clobetasol-loaded nanostructured lipid carriers for epidermal targeting. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 68, n. 6, p. 742–750, 2016.

SKOOG, D. A. et al. Fundamentos de Química Analítica. **Fundamentos de Química Analítica**, 2005.

SOUTO, E. B. et al. Development of a controlled release formulation based on SLN and NLC for topical clotrimazole delivery. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 278,

n. 1, p. 71–77, 2004.

STJERNSCHANTZ, J. W. From PGF2 α -isopropyl ester to latanoprost: A review of the development of xalatan: The proctor lecture. **Investigative Ophthalmology and Visual Science**, v. 42, n. 6, p. 1134–1145, 2001.

STOEHR, J. R. et al. Off-Label Use of Topical Minoxidil in Alopecia: A Review. **American Journal of Clinical Dermatology**, v. 20, n. 2, p. 237–250, 2019.

STOLZ, J.; ALM, A. Latanoprost in the treatment of glaucoma. **Clinical Ophthalmology**, v. 24, n. 3, p. 1967, set. 2014.

TESSEMA, E. N. et al. Development and validation of LC/APCI-MS method for the quantification of oat ceramides in skin permeation studies. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 410, n. 20, p. 4775–4785, 2018.

TOLENTINO, S. et al. The influence of sebaceous content on the performance of nanosystems designed for the treatment of follicular diseases. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**, v. 59, n. May, p. 101895, out. 2020.

TOLENTINO, S. et al. Targeted clindamycin delivery to pilosebaceous units by chitosan or hyaluronic acid nanoparticles for improved topical treatment of acne vulgaris. **Carbohydrate Polymers**, v. 253, n. June 2020, p. 117295, 2021.

TRÜEB, R. M. **Is androgenetic alopecia a photoaggravated dermatosis?** *Dermatology*, 2003.

UNO, H. et al. Effect of latanoprost on hair growth in the bald scalp of the stump-tailed macaque: A pilot study. **Acta Dermato-Venereologica**, v. 82, n. 1, p. 7–12, 2002.

UPRIT, S. et al. Preparation and characterization of minoxidil loaded nanostructured lipid carrier gel for effective treatment of alopecia. **Saudi Pharmaceutical Journal**, v. 21, n. 4, p. 379–385, 2013.

USHIROBIRA, C. Y. et al. Dutasteride nanocapsules for hair follicle targeting: Effect of chitosan-coating and physical stimulus. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 151, p. 56–61, 2020.

VAIRO, C. et al. Preclinical safety of topically administered nanostructure lipid carriers (NLC) for wound healing application: biodistribution and toxicity studies. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 569, n. April, p. 118484, 2019.

VALENTE DUARTE DE SOUSA, I. C.; TOSTI, A. New investigational drugs for androgenetic alopecia. **Expert Opinion on Investigational Drugs**, v. 22, n. 5, p. 573–589, 2013.

VAN MEERLOO, J.; KASPERS, G. J. L.; CLOOS, J. Cell Sensitivity Assays: The MTT Assay. **Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)**, v. 731, p. 237–245, 2011.

VOGT, A.; BLUME-PEYTAVI, U. Selective hair therapy: Bringing science to the fiction. **Experimental Dermatology**, 2014.

VYAS, A.; KUMAR SONKER, A.; GIDWANI, B. **Carrier-based drug delivery system for treatment of acne** *The Scientific World Journal*, 2014.

WALASH, M.; EL-SHAHENY, R. Fast separation and quantification of three anti-glaucoma drugs by high-performance liquid chromatography UV detection. **Journal of Food and Drug Analysis**, v. 24, n. 2, 2016.

WAND, M. Latanoprost and hyperpigmentation of eyelashes. **Archives of Ophthalmology**, 1997.

WANG, W. et al. Preparation and Characterization of Minoxidil Loaded Nanostructured Lipid Carriers. **AAPS PharmSciTech**, v. 18, n. 2, p. 509–516, 2017.

WARGNIEZ, W. et al. Inter-laboratory skin distribution study of 4-n-butyl resorcinol: The importance of liquid chromatography/mass spectrometry (HPLC–MS/MS) bioanalytical validation. **Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences**, v. 1060, p. 416–423, 2017.

WELSS, T.; BASKETTER, D. A.; SCHRÖDER, K. R. In vitro skin irritation: Facts and future. State of the art review of mechanisms and models. **Toxicology in Vitro**, v. 18, n. 3, p. 231–243, 2004.

WESTER, R. C. et al. Minoxidil stimulates cutaneous blood flow in human balding scalps: Pharmacodynamics by laser Doppler velocimetry and photopulse plethysmography. **Journal of Investigative Dermatology**, 1984.

WHITTING, D. A. **Hair Growth and Disorders**. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2008.

WILLE, K. et al. Coupled chromatographic and mass-spectrometric techniques for the analysis of emerging pollutants in the aquatic environment. **TrAC - Trends in Analytical Chemistry**, v. 35, p. 87–108, 2012.

WONG, C. S.; MACLEOD, S. L. JEM Spotlight: Recent advances in analysis of pharmaceuticals in the aquatic environment. **Journal of Environmental Monitoring**, v. 11, n. 5, p. 923–936, 2009.

ZALFA, Z. A. et al. In Vitro Modulation of Proliferation and Melanization of S91 Melanoma cells by Prostaglandins. **Cancer Research**, 1987.

ZAMMATARO, A. et al. Development and validation of a liquid chromatography/electrospray ionization tandem mass spectrometry method for the quantification of latanoprost free acid in rabbit aqueous humor and ciliary body. **Journal of Mass Spectrometry**, v. 46, n. 11, p. 1168–1174, 2011.

ZHOU, W. et al. Rapid determination of hexapeptides by hydrophilic interaction LC-MS/MS for in vitro skin-penetration studies. **Bioanalysis**, v. 5, n. 11, p. 1353–1362, 2013.