

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA

LUCIANO COSTA GOMES XAVIER

DESENVOLVIMENTO DE FORMULAÇÃO CONTENDO MINOXIDIL PARA
PROMOÇÃO DO CRESCIMENTO DE PELOS DA SOBRANCELHA

BRASÍLIA 2022

LUCIANO COSTA GOMES XAVIER
FACULDADE DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

**DESENVOLVIMENTO DE FORMULAÇÃO CONTENDO MINOXIDIL PARA
CRESCIMENTO DA SOBRANCELHA**

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

Orientador (a): Prof^a. Dr^a. Tais Gratieri

Co-orientador (a): Dr. Breno Noronha Matos

BRASÍLIA - DISTRITO FEDERAL
2022

AGRADECIMENTOS

À **Universidade de Brasília** pela oportunidade de realizar mais um trabalho de aperfeiçoamento pessoal e em meus estudos.

Ao **Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas** da Universidade de Brasília pela oportunidade.

Ao grupo **LTMAC** também pela oportunidade de me integrar a equipe e também pelos ensinamentos ganhos.

Aos meus pais, **Francisca Marcôndia e Luciano Gomes**, que com grande amor e carinho me proporcionaram o meu desenvolvimento e são um dos principais motivos da minha felicidade e minhas referências.

À minha orientadora **Profa. Dra. Tais Gratieri** que foi quem me possibilitou essa oportunidade de crescimento, acreditou em mim ao me aceitar no grupo, pelo apoio e por tudo que pode proporcionar a mim e aos meus amigos e amigas do laboratório.

Ao **Prof. Dr. Guilherme Martins Gelfuso** que me apresentou à Profa. Dra. Tais Gratieri, me permitindo essa enriquecedora experiência.

À minha amiga **Laura Angotti**, agradeço com carinho por todo o suporte que me deu durante todo o meu trabalho.

À minha amiga **Dra. Geisa Nascimento Barbalho** por todo o seu grande e essencial apoio em todas as fases do meu mestrado, me auxiliando e apoiando.

À empresa **Via Carnes** que por meio da sua colaboração e grande ajuda pôde fornecer as peles necessárias ao trabalho.

À **Dra. Ludmila Alvim Gomes Pinho** meus sinceros agradecimentos pelo suporte que prestou de coração aberto nas várias questões e dúvidas durante a minha pesquisa.

À minha amiga **Dra. Seila Tolentino**, pelos seus conselhos, suporte e amizade no laboratório.

Ao **Dr. Felipe Q. Pires** pela ajuda em um dos principais pontos matemáticos da minha pesquisa.

À **Dra. Ana Luiza Lima do Nascimento** pela disposição e ajuda com vários equipamentos e dúvidas.

RESUMO

XAVIER, L. Desenvolvimento de formulação contendo minoxidil para promoção do crescimento de pelos da sobrancelha. Brasília, 2022. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas). Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade de Brasília, Brasília, 2022.

O objetivo deste trabalho foi desenvolver de uma formulação otimizada sem solventes para entrega de minoxidil (MXS) nas sobrancelhas com escorrimento reduzido. Atualmente, há um crescente interesse em produtos inovadores especializados no tratamento da queda de pelos das sobrancelhas com menores efeitos adversos e sem escorrimento para melhorar a adesão ao tratamento. O poloxamer 407 (PLX) e a hidroxipropilmetilcelulose (HPMC) foram combinados em diferentes concentrações (15, 16 e 17% para PLX e 0,4, 0,8 e 1,2% para HPMC) juntamente com MXS. A caracterização foi avaliada pelos testes de ponto de transição sol/gel, viscosidade a 25°C, distância de escorrimento em pele de orelha suína e peso de gota. Através desses dados, uma formulação otimizada (FO) e uma formulação de comparação (FC) foram selecionadas por análise de resposta de superfície (ASR). O perfil de liberação e a permeação cutânea do MXS foi avaliada pelo modelo de células de difusão de Franz estática por 12 horas. A permeação cutânea vertical em células de Saarbruecken modificadas avaliou a permeação total da pele (dividida em três áreas: superior, média (área de aplicação do gel) e inferior por 12 horas. O HPMC adicionado ao PLX melhorou as características da formulação. Pelo SRA foi selecionado uma FO (PLX 16% e HPMC 0,4%). O perfil de liberação de FO mostrou liberação similar a solução de MXS junto a FC (PLX 4% e HPMC 0,7%) e sem diferença entre as camadas da pele na permeação estática entre as formulações ($p < 0,05$). No entanto, na penetração vertical, a FO demonstrou entrega de MXS localizada no ponto de contato, mostrando diferença entre a área média e as outras duas áreas ($p < 0,05$) resultante da penetração radial, enquanto o FC fluiu e penetrou além da área de interesse com grande quantidade na área inferior. A formulação otimizada mostrou excelente eficiência na entrega de MXS ao local de interesse (terço médio). Portanto, a formulação obtida aumentou sua fixação

quando em contato com a pele, permitindo um tratamento mais fácil, seguro e sem escorrimento.

ABSTRACT

XAVIER, L. Development of a minoxidil formulation to promote eyebrow hair growth. Brasília, 2022. Dissertation (Master's Degree in Pharmaceutical Sciences). Faculty of Health Sciences, University of Brasília, Brasília, 2022.

The objective of this work was to develop an optimized formulation without solvents for delivery of minoxidil (MXS) to the eyebrows with reduced run-off. Currently, there is growing interest in innovative products specializing in the treatment of eyebrow hair loss with fewer adverse effects and no sagging to improve treatment adherence. Poloxamer 407 (PLX) and hydroxypropylmethylcellulose (HPMC) were combined at different concentrations (15, 16 and 17% for PLX and 0.4, 0.8 and 1.2% for HPMC) together with MXS. The characterization was evaluated by the tests of sol/gel transition point, viscosity at 25°C, swine ear skin run-off distance and drop weight. Through these data, an optimized formulation (FO) and a comparison formulation (FC) were selected by surface response analysis (ASR). The release profile and skin permeation of MXS was evaluated by the Franz static diffusion cell model for 12 hours. Vertical skin permeation in modified Saarbruecken cells evaluated the total skin permeation (divided into three areas: upper, middle (area of application of the gel) and lower for 12 hours. HPMC added to PLX improved the characteristics of the formulation. By SRA One FO (PLX 16% and HPMC 0.4%) was selected. The FO release profile showed a release similar to the MXS solution together with FC (PLX 4% and HPMC 0.7%) and no difference between the layers of the skin in the static permeation between the formulations ($p < 0.05$), however, in the vertical penetration, the FO demonstrated localized delivery of MXS at the point of contact, showing a difference between the average area and the other two areas ($p < 0, 05$) resulting from radial penetration, while FC flowed and penetrated beyond the area of interest with a large amount in the lower area. The optimized formulation showed excellent efficiency in delivering MXS to the site of interest (middle third). Therefore, the obtained formulation increased its fixation when in contact with the skin and, allowing for an easier, safer, and no-slip treatment.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Corte transversal ilustrando as camadas da pele

Figura 2: Estrutura anatômica da pele e seus apêndices

Figura 3: Esquema das camadas do folículo piloso e histologia do folículo piloso

Figura 4: Anatomia axial da pálpebra e sobrancelha

Figura 5: Diferentes arqueamentos da sobrancelha e diferentes proporções de sobrancelhas sugeridas por cirurgiões e artistas.

Figura 6: Padrão de classificação dos tipos mais comuns de queda em homens de acordo com Hamilton-Norwood

Figura 7: Sulfatação do minoxidil catalisada por sulfotransferase.

Figura 8: Estrutura química do poloxamer.

Figura 9: Estrutura química do HPMC

Figura 10: modelos virtuais das peças da permeação vertical.

Figura 11: modelos virtual e impresso das peças da permeação vertical.

Figura 12: Base de ângulo regulável junto a uma plataforma para o apoio da pele de orelha de porco. Acima, um pipetador de vidro de 5mL acoplado a uma pêra e segurado por um suporte.

Figura 13: Células de Franz.

Figura 14: Representação das áreas de corte da pele.

Figura 15: Representação da difusão lateral ao longo do estrato córneo.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Classificação da irritação provocada por interação com a HEC-CAM.

Tabela 2. Pontuação atribuída para cada sinal indicativo de irritação em função do tempo no teste de irritação in vitro em modelo HET-CAM

Tabela 3. Classificação das formulações quanto ao grau de irritação de acordo com a pontuação atribuída (P) nos sinais de irritação segundo o teste de irritação in vitro em modelo HET-CAM

Tabela 4: Grupo dos homopolímeros com a porcentagem de poloxamer e HPMC analisados para caracterização.

Tabela 5: Grupo dos polímeros binários com a porcentagem de poloxamer e HPMC analisados para caracterização.

Tabela 6: Resultados do peso de gota em miligramas (mg) para cada formulação analisada em balança analítica.

Tabela 7. Distância de escorrimento em milímetros (mm) nos tempos 1, 5 e 10 minutos das formulações com poloxamer, HPMC e as formulações binárias caracterizadas.

Tabela 8: $T_{sol/gel}$ (°C) das formulações termo sensíveis homopoliméricas e bifásicas obtidos por análise de rampa de temperatura.

Tabela 9: Tabela demonstrando a viscosidade de cada amostra analisada pelo teste de viscosidade dinâmica feito a 25°C.

Tabela 10: Resultado do teste HET-CAM com a formulação PLX 16% HPMC 0,4% MXS 2 e PLX 4% HPMC 0,7 % MXS 2%.

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência
CAM	Membrana corioalantoide
HPMC	Hidroxipropilmetilcelulose
PEG-400	Polietilenoglicol 400
G'	Módulo elástico
G''	Módulo viscoso
η'	Viscosidade dinâmica
(m/m)	Massa/massa
RVL	Região viscoelástica linear
T_{sol/gel}	Temperatura de transição solução/gel
UV/Vis	Ultravioleta visível
ABS	Acrolitrila Butadieno Estireno
mm	Milímetros

SUMÁRIO

1.	Introdução.....	1
2.	Objetivos.....	3
2.1.	Objetivo geral.....	3
2.2.	Objetivo específicos.....	3
3.	Revisão da Literatura.....	4
3.1.1.	Pele.....	4
3.2.	Pelo e suas estrutura.....	6
3.3.	Sobrancelha.....	9
3.3.1.	Estética nas sobrancelhas.....	10
3.4.	Queda capilar.....	12
3.5.	O Minoxidil.....	13
3.6.	Polímeros termossensíveis e mucoadesivos.....	15
4.	Materiais e métodos.....	18
4.1.	Materiais.....	18
4.1.1.	Pele de orelha de suíno.....	18
4.1.2.	Células 3D para permeação vertical.....	19
4.2.	Método analítico para quantificação do Minoxidil Sulfato.....	20
4.2.1.	Curva de calibração:.....	20
4.3.	Método de recuperação do MXS da pele.....	21
4.4.	Obtenção e caracterização do gel contendo o MXS.....	21
4.4.1.	Teste de peso de gota.....	21
4.4.2.	Teste de escorrimento.....	22
4.4.3.	Análise de viscosidade e temperatura de transição $T_{sol/gel}$ das formulações	23

4.5.	Análise de superfície de resposta.....	25
4.6.	Estudos de irritabilidade <i>in vitro</i>	25
4.7.	Perfil de Liberação <i>in vitro</i>	26
4.8.	Estudo de permeação estática.....	27
4.8.1.	Quantificação de MXS retido no estrato córneo (EC), folículo piloso (FP) e pele remanescente (PR).....	27
4.9.	Estudo de permeação vertical.....	28
4.10.	Análise estatística.....	29
5.	Resultados e discussão.....	30
5.1.	Método analítico para quantificação do MXS.....	30
5.1.1.	Curva de calibração.....	30
5.2.	Caracterização e otimização do gel.....	31
5.2.1.	Teste de peso de gota.....	32
5.2.2.	Teste de escorrimento de gota em pele de porco.....	35
5.2.3.	Análise reológica.....	39
5.3.	Estudos de irritabilidade <i>in vitro</i> (HET – CAM).....	45
5.4.	Estudos <i>in vitro</i> de liberação.....	47
5.5.	Permeação estática.....	48
5.6.	Permeação Vertical.....	50
6.	Conclusão.....	53
7.	Referências bibliográficas.....	54

1. Introdução

A queda capilar ou alopecia afeta cerca de 50 a 80% dos homens com mais de 50 anos (Krug and Alves-dos-Santos 2008) enquanto em mulheres a incidência chega aos 55% acima de 70 anos (Bertoli et al. 2020), e além disto, 60% dos doentes têm os primeiros sinais da doença antes dos 20 anos (Rivitti 2005). Essa afecção se caracteriza pelo aumento da frequência da queda dos fios e pode ser qualificada como ausência, rarefação ou queda de pelos e cabelos de caráter transitório ou definitivo, que pode atingir uma determinada região ou o corpo todo (FREITAS and COHEN 2018). Pode ser classificada em alopecia areata, alopecia quimioterápica e, alopecia androgênica, dependendo das causas de seu aparecimento, que podem ser relacionadas a fatores genéticos e hormonais (Gelfuso et al. 2011). A *mandrosi*, termo designado à queda dos fios das sobrancelhas, é do tipo não cicatricial de alopecia areata que pode ser de causas autoimunes, infecciosa, parasitária, traumas, nutrição e etc que pode ser tratada com sulfato de minoxidil (Kumar and Karthikeyan 2012).

O tratamento tradicional contra a alopecia androgênica é feito aplicando-se uma formulação contendo o fármaco minoxidil (MX), classicamente usado na forma de solução hidroalcoólica. O MX, um pró-fármaco, é convertido pela enzima sulfotransferase em Minoxidil Sulfato (MXS) e atua nos folículos capilares ativando canais de potássio ATPase e melhora na irrigação sanguínea local por estímulo do fator de crescimento vascular. Tem ação no aumento da fase de crescimento capilar, a fase anagênica, e redução da telógena, fase de “pausa” e queda do crescimento dos pelos (York et al. 2020).

Outros tratamentos focam na inibição dos receptores dos hormônios andrógenos, como é o caso do flutamida (Paradisi et al. 2011), ou a latanosprosta e a bimatoprosta, que inicialmente eram usados no crescimento dos cílios e estão em estudo para outras regiões (Suchonwanit and Thammarucha 2020; X. G. Xu and Chen 2018). Há também os tratamentos alternativos, como por exemplo o plasma rico em plaquetas e o laser terapêutico de baixa intensidade, que aumentam a capacidade de regeneração local e por conseguinte crescimento dos pelos (Ahluwalia and Fabi 2019). Há também tratamentos cosméticos que camuflam a

perda capilar, como é o caso do uso de tatuagem ou até mesmo maquiagem, além de também haver a possibilidade de recuperação dos fios com o transplante capilar (Audickaite, Alam, and Jimenez 2020).

Ainda que haja variedade nas terapias capilares, vários desafios surgem quanto ao tratamento como: a condição da doença, que pode ser idiopática ou relacionada a fatores adjacentes como doenças genéticas ou físicas, alguns medicamentos, ou alterações nos níveis hormonais (Suchonwanit and Thammarucha 2020). Relacionada à aplicação de formulações géis na área facial, sobretudo nas sobrancelhas, é necessário que o produto tenha o mínimo de pegajosidade e permita aplicação rápida. Junto, não haver adição de solventes, apresentar boa retenção de água, além da presença de um fármaco com boa solubilidade e baixa concentração (Benson and Watkinson 2012).

Ao considerar os obstáculos observados e a baixa permeação das formulações clássicas contendo o MX, neste trabalho busca-se o desenvolvimento de uma formulação inovadora que reduza o número de aplicações e, conseqüentemente, aumente a adesão dos pacientes ao tratamento. Logo, uma formulação que (i) permita a liberação contínua e localizada, (ii) assegure que a concentração terapêutica atinja o local de ação e (iii) forneça segurança na aplicação em uma região altamente inclinada, como as sobrancelhas, sem escorrimento. Assim, a proposta deste trabalho é utilizar uma formulação semissólida termossensível como estratégia para fixá-la nas sobrancelhas e direcionar o MXS, molécula responsável pela ação capilar, ao local de ação.

2. Objetivos

2.1. Objetivo geral

Este trabalho tem o objetivo de desenvolver formulações semissólidas sem o uso de solventes orgânicos contendo sulfato de minoxidil para o tratamento da queda de pelos das sobrancelhas.

2.2. Objetivo específicos

- Desenvolvimento de uma nova formulação a base de poloxamer 407 (PLX) e hidroxipropilmetilcelulose (HPMC) contendo sulfato de minoxidil resistente ao escorrimento.
- Caracterização das formulações;
- Avaliação do perfil de liberação *in vitro* das formulações desenvolvidas;
- Realização de estudos de permeação passiva *in vitro* em pele de suíno intacta;
- Avaliar a segurança da formulação através do teste de HET- CAM;
- Validar novo modelo de estudo da permeação passiva *in vitro* vertical utilizando o modelo Saarbruecken modificado;
- Avaliar o perfil de liberação *in vitro* das formulações.

3. Revisão da Literatura

3.1.1. Pele

Os tratamentos farmacológicos de pele focados em disfunções tópicas buscam a entrega de fármacos de forma local e controlada. Essa via de administração traz vantagens em relação a outras formas de aplicação (como a parenteral e a oral) por ter redução da toxicidade e controle na entrega dos ativos. Esta via, porém, traz desafios relacionados à entrega dos fármacos em um determinado tempo, devido à complexidade de suas barreiras químicas, físicas e microbianas (K. Akomeah 2010).

A pele é constituída por três diferentes camadas (epiderme, derme e hipoderme) (**Figura 1**) e seus apêndices (folículo piloso, glândulas sudoríparas e sebáceas). Esse conjunto tem função vital na manutenção da homeostasia corporal por ter capacidade de regulação na temperatura, proteção bacteriana, choques térmicos e substâncias químicas.

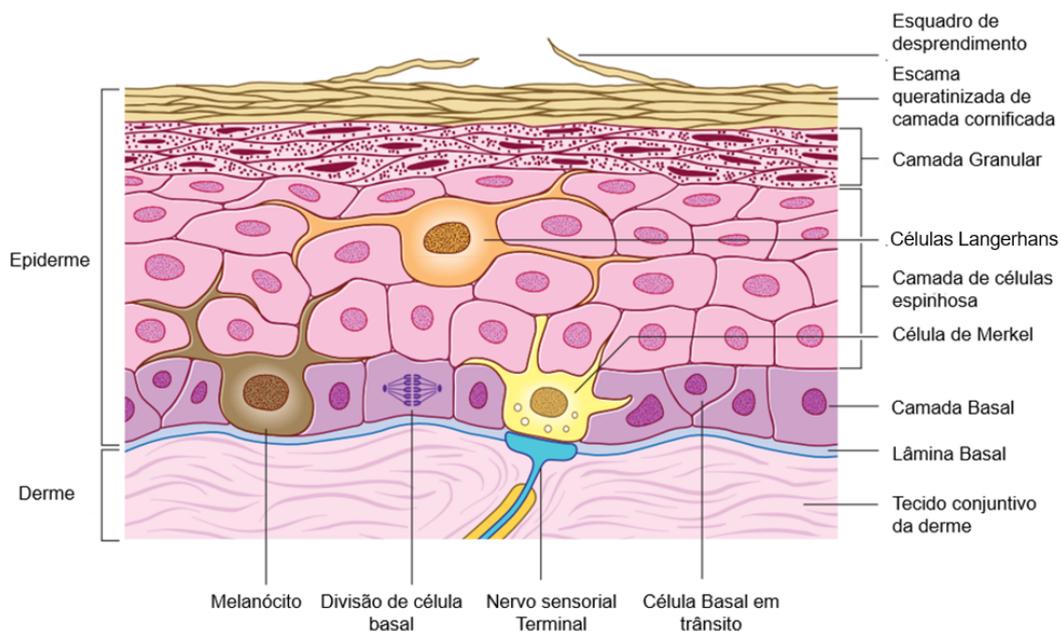


Figura 1: Corte transversal ilustrando as camadas da pele: epiderme, derme e hipoderme (Standing 2016).

A epiderme é a camada mais externa da pele. Sua função primária é a defesa contra a entrada de substâncias xenobióticas e microrganismos, também auxiliando na regulação da perda de água. A sua composição celular envolve o estrato córneo, a camada granulosa, a camada espinhosa e a camada basal. O estrato córneo é descrito como uma estrutura de várias camadas do tipo parede de “tijolos” em uma matriz de lipídeos intercelulares e os desmossomos (complexos estruturais de adesão e transporte celular), que atuam como fixadores ou rebites entre os corneócitos. Essas células não possuem núcleo e são preenchidas com queratina e lipídios nesta camada. Também apresentam um envelope cornificado constituído de uma estrutura polimérica conjunta de proteína/lipídio. A estrutura é um envelope proteico que dá as características biomecânicas dos corneócitos, que é importante para formação normal do estrato córneo e conseqüentemente para formação da barreira (Benson and Watkinson 2012). Já a camada granulosa possui células com grânulos visíveis de queratina em seu interior. A camada espinhosa, por sua vez, é denominada desta forma por apresentar os desmossomos mais evidentes. Essas células se originam da camada profunda chamada junção derme-epiderme por um processo de maturação e crescimento ascendente que é denominado queratinização (Berlin, Cohen, and Goldberg 2006; Leslie baumann, Saghari e Weisberg 2009). Entremedio às células da epiderme há os complexos de lipídios e grânulos lamelares, responsáveis por formar uma barreira contra evaporação de água mantendo a pele hidratada e auxiliando na defesa contra a entrada de substâncias exógenas (LESLIE BAUMANN, SAGHARI, and WEISBERG 2009; Nguyen et al. 2018a).

A derme é constituída de tecido conectivo que forma a maior parte da espessura e suporte da pele, além de sua microvascularização irrigar a camada basal da epiderme e nervos sensitivos (Standring 2016).

A hipoderme (ou tecido subcutâneo) é a camada mais profunda da pele composta por adipócitos (células com função de armazenamento de gordura). Essa camada proporciona proteção contra impactos, isolamento térmico e também tem papel nutricional e estrutural na derme (Joodaki and Panzer 2018).

A pele como órgão mais acessível e extenso do corpo humano, é vastamente utilizada como rota de permeação de agentes terapêuticos localizados. No entanto, para que tenham efeito, é preciso transpor as barreiras da pele por diferentes vias de difusão: via transcelular, via intracelular ou pelos apêndices, como as glândulas sudoríparas e os folículos pilosos na Figura 2 (Fang et al. 2014; Nguyen et al. 2018a).

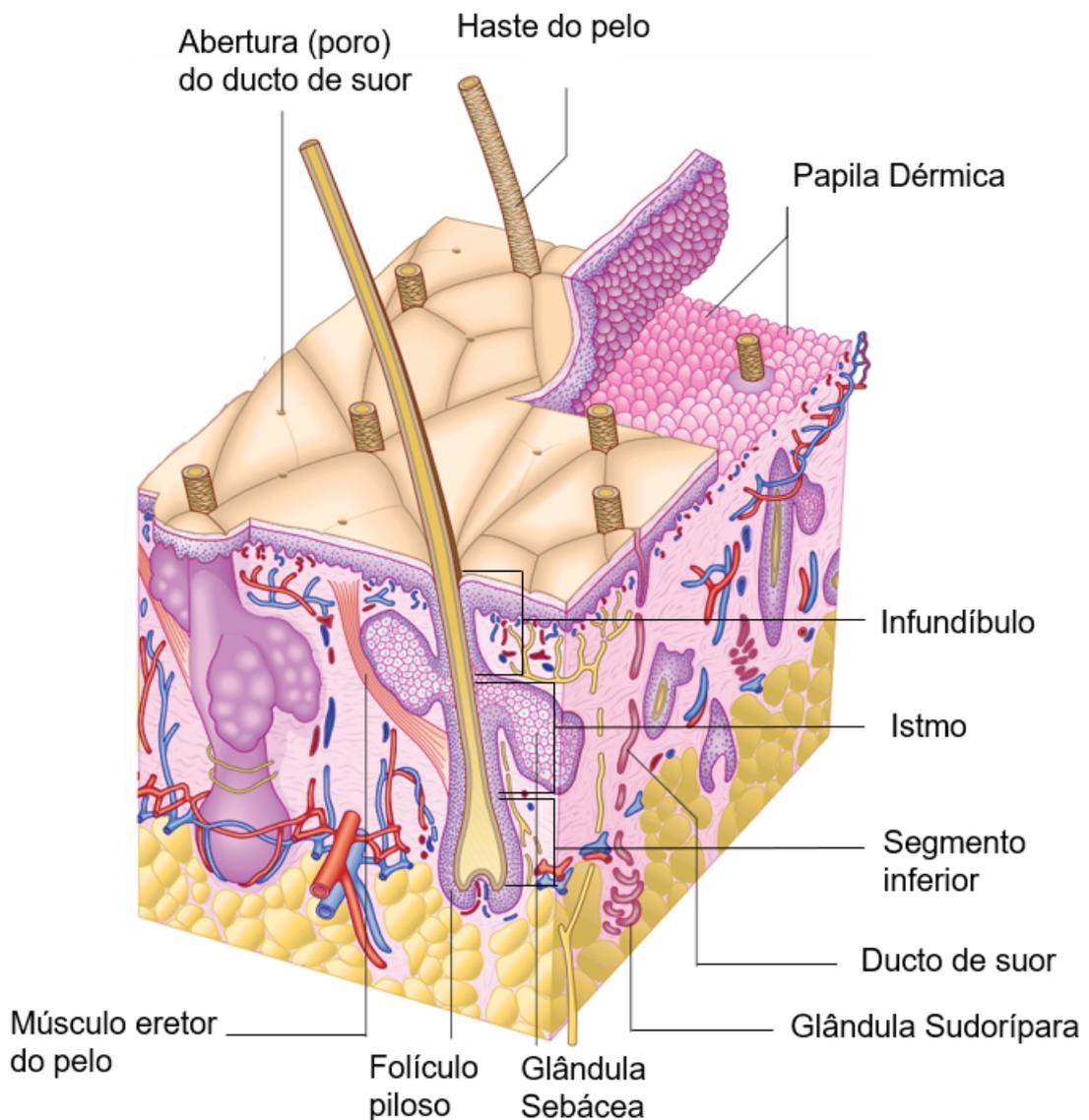


Figura 2: Estrutura anômica da pele e seus apêndices (Standring 2016).

3.2. Pelo e suas estruturas

Os folículos pilosos são apêndices da pele que se distribuem por quase todas as regiões do corpo, sendo ausentes nas regiões palmoplantares, lábio e orifícios urogenitais. São responsáveis pela formação de estruturas queratinizadas e pigmentadas, os pelos. O crescimento, a distribuição, a cor e a textura deles são influenciados por hormônios sexuais que tem papel fundamental na comunicação social, sexual. Os folículos também, propiciam um local de armazenamento de ativos por longo período quando comparado ao estrato córneo, tornando-os vantajosos nos tratamentos que buscam uma liberação controlada (Brown and Krishnamurthy 2020; Fang et al. 2014; Standring 2016).

A estrutura anatômica folicular divide-se em três segmentos: o infundíbulo, istmo e o segmento inferior (Fig. 2). O infundíbulo, ou canal da papila dérmica, é o segmento mais externo que vai da epiderme até a abertura da glândula sebácea; o istmo é o segmento que vai até o início do bulbo. Este canal é marcado pela inserção do músculo eretor do pelo. Já o segmento inferior corresponde à parte profunda do folículo que se estende até o bulbo (Fig. 3). Esta região, o bulbo, é alimentada pela papila dérmica, local de fornecimento do fluxo sanguíneo. A característica da papila é ser invaginada, no sentido ascendente, e revestida por um invólucro de células progenitoras responsáveis pela regeneração da papila dérmica e pela capacidade cicatricial (Brown and Krishnamurthy 2020; Martel and Badri 2019).

Dentre as estruturas adjacentes ao folículo piloso, há o músculo eretor constituído por um músculo liso ligado ao folículo e à derme, responsável por levantar o pelo, quando ativado. Já a glândula sebácea, uma glândula holócrina, libera uma complexa mistura de lipídeos como triglicerídeos, ceras e ácidos graxos livres chamados de sebo. Constitui-se de esqualeno, ésteres de glicerol, cera, colesterol e ácidos graxos, sendo os mais característicos são os ésteres de cera. O sebo tem papel de proteção, lubrificação e manutenção do pH, em torno de 5 (Benson and Watkinson 2012). Essa mistura também tem papel fotoprotetor, antimicrobiano e antioxidantes, que estão solubilizados em gordura com atividade pró e anti-inflamatória, permitindo a sua melhor regulação (Picardo et al. 2009).

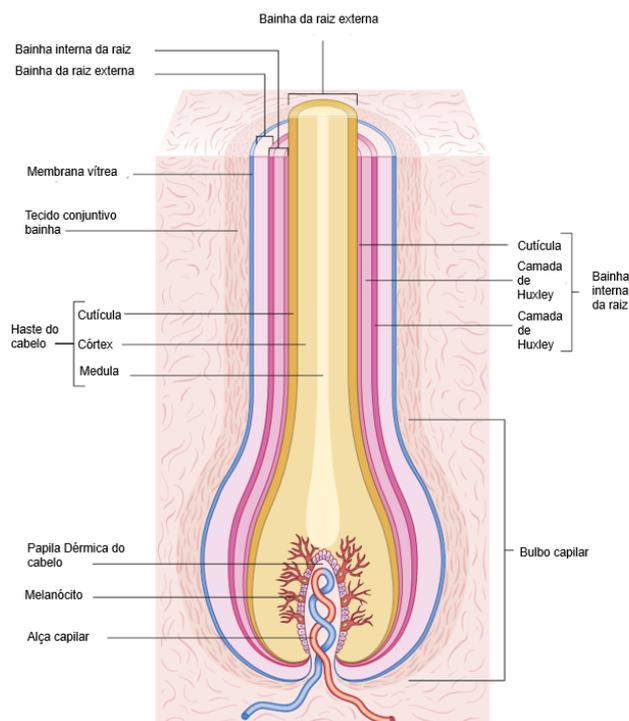
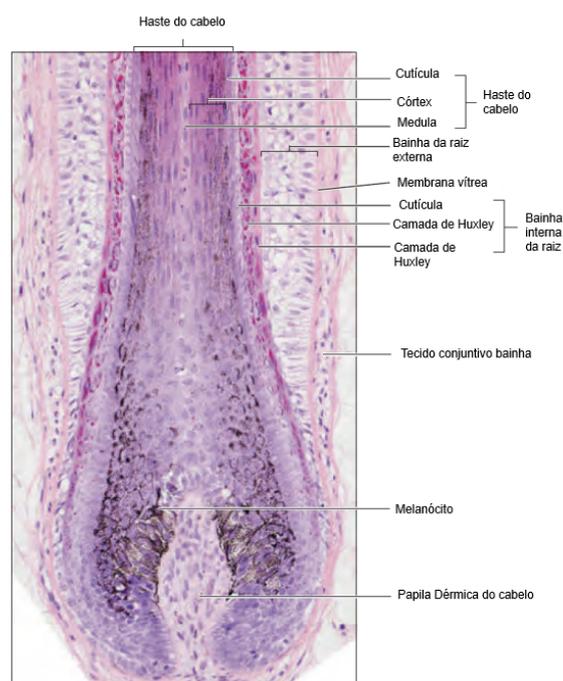
A**B**

Figura 3: A) esquema das camadas do folículo piloso. B) histologia do folículo piloso (Standingring 2016).

O crescimento dos pelos segue um processo cíclico dividido em três principais fases: anágena, catágena e telógena. Na primeira fase (anágena), há a proliferação e diferenciação das diferentes linhagens celulares constitutivos do pelo e as bainhas de suporte. São elas: bainha interna da raiz e a camada complementar na parte externa (Harland 2018). A catágena corresponde ao período de transição do crescimento capilar mais curto, com duração de cerca de 2 a 3 semanas. Ela se caracteriza por um processo apoptótico na matriz e nas bainhas interna e externa. O processo resulta no encurtamento dos dois terços inferiores e consequente

aproximação do bulge com o bulbo. Esse estágio é necessário para a manutenção do ciclo completo do crescimento do pelo (Martel and Badri 2019; Siamak Houschyar et al. 2020). Na última fase, a telógena, esse crescimento cessa, caracterizando-se por mecanismos de manutenção, isto é, a sensibilização das células ao estímulo de crescimento para a fase anágena (Geyfman et al. 2015).

3.3. Sobrancelha

As sobrancelhas são um aglomerado de pelos terminais curtos, grossos e dispostos obliquamente à borda óssea e com ausência de músculo eretor (Fig. 5). Os músculos que são responsáveis pela sua movimentação são, occipital, orbicular dos olhos, corrugador do supercílio, prócero e a almofada de gordura retro orbicular (Bhupendra C. Patel and Raman Malhotra. 2020). Outros pelos possuem as mesmas características: escalpo, cílios, pubianos, axilares e da barba. São maiores (com exceção das sobrancelhas), mais grossos e fortemente pigmentados (Buffoli et al. 2014; Standring 2016).

Em seu contexto social, as sobrancelhas são um dos elementos utilizados na interpretação das emoções: a orientação da sobrancelha, o formato da boca ou mesmo direção do olhar formam a integração necessária para sinalizar um sentimento. Também está relacionada a um elemento social de beleza (Marchi and Newen 2015). As sobrancelhas têm influência na simetria quando analisada em conjunto com outras regiões do rosto (testa, pálpebras e até as bochechas). Analisar o conjunto facial auxilia na obtenção da melhor simetria do rosto e na correção de assimetrias, como é o caso da ptose, por exemplo (Bhupendra C. Patel and Raman Malhotra. 2020).

O formato das sobrancelhas também varia conforme o sexo do indivíduo. As masculinas são mais horizontais com uma leve curvatura lateral, enquanto as femininas têm uma curvatura na parte medial e lateral. Ambas têm a parte medial localizada a 1 cm acima da parte superior do orbicular (Bhupendra C. Patel and Raman Malhotra. 2020).

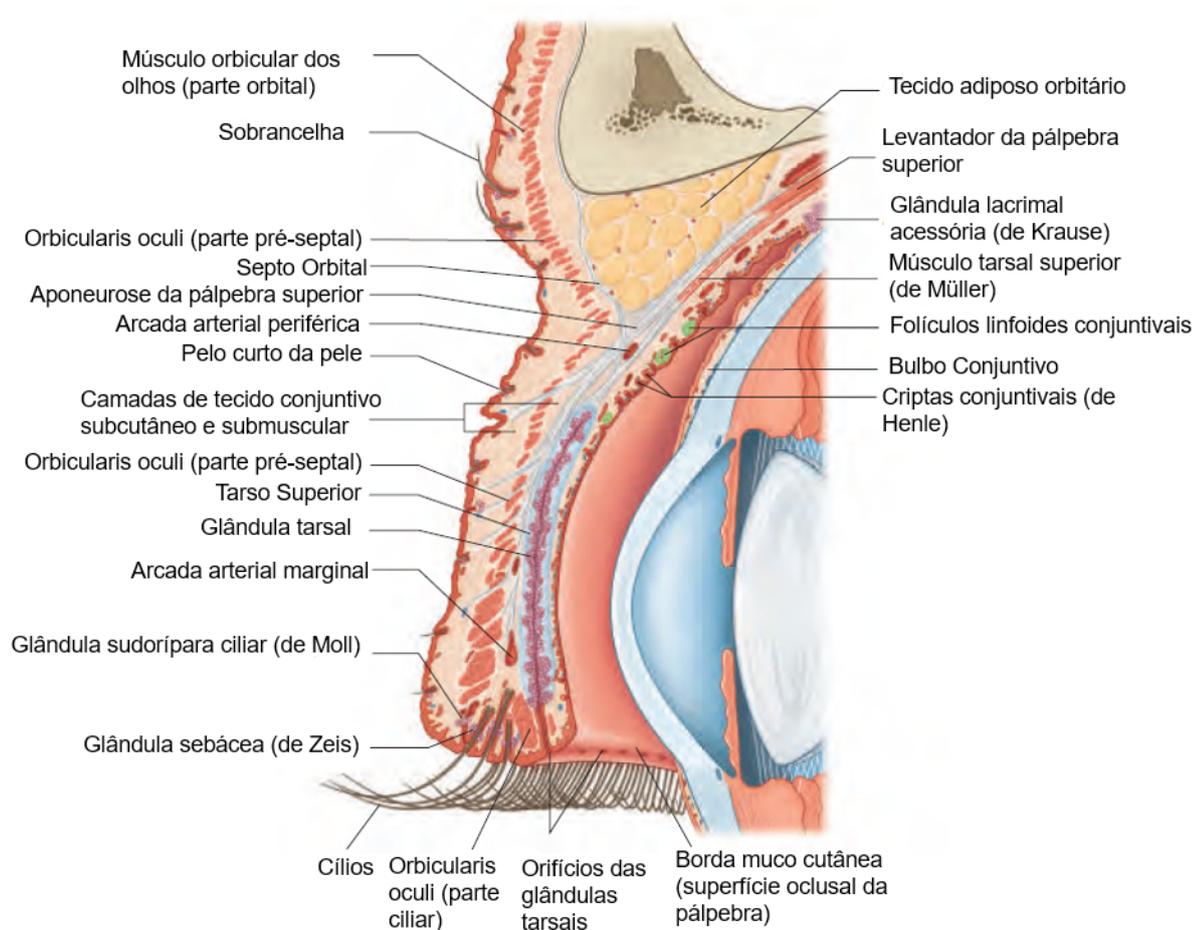


Figura 4: Anatomia axial da pálpebra e sobrancelha (Standring 2016).

3.3.1. Estética nas sobrancelhas

As sobrancelhas desempenham papel central na beleza facial. Por isso, suas formas sofreram mudanças conforme a época. Para entender as preferências com relação aos tipos de sobrancelhas, foi feito um levantamento na edição de moda britânica. O resultado da pesquisa indicou a tendência para o tipo arqueado e suas variações (figura 6 A), seguido pelo modelo “Anastasia”, “Hwang” e “Schreiber” (Fig. 6) (Hwang and Yoo 2016).

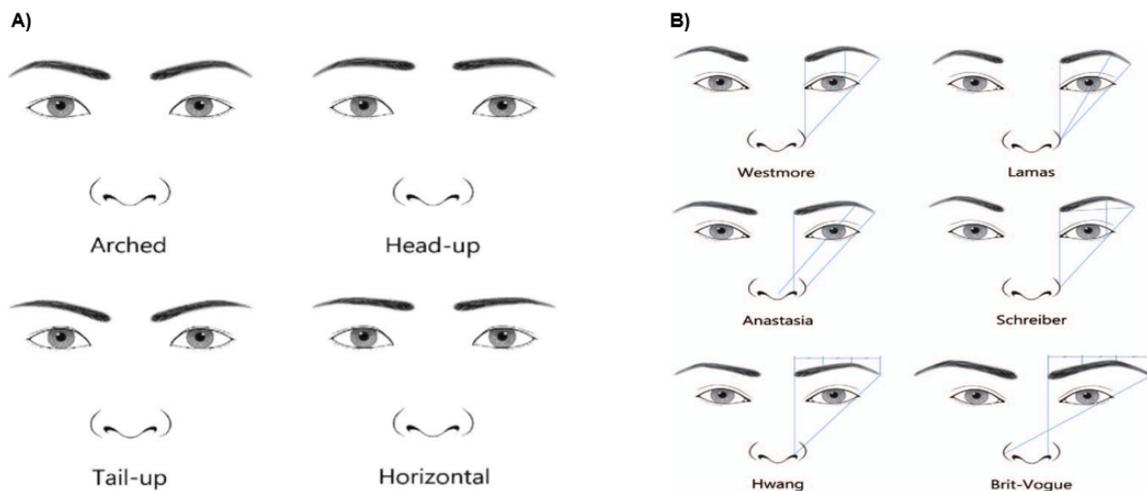


Figura 5: (A) Diferentes arqueamentos da sobrancelha e (B) diferentes proporções de sobrancelhas sugeridas por cirurgiões e artistas (Hwang and Yoo 2016).

As modificações das sobrancelhas se tornaram algo recorrente como alternativa para melhorar a forma e para mascarar problemas estéticos. Dentre os quais destacam-se quedas dos fios, queimaduras, cicatrizes por remoção de carcinoma por meio dos cosméticos permanentes. Assim fica evidente a importância de desenvolver novos meios cosméticos para suavização dessas afecções e melhorar os existentes. Um exemplo são as tatuagens que podem corrigir assimetrias, alongar, encurtar, clarear ou preencher causando efeitos de suavização, encurtamento ou atenuar algum aspecto do rosto. Há também a cirurgia estética para o rejuvenescimento periorbital em que os pacientes têm maior preferência por um resultado natural. Outra possibilidade é a modificar a posição das sobrancelhas pela ação da toxina botulínica, que ao aplicar este produto é possível reduzir o tônus de repouso do músculo causando efeitos como, por exemplo, a abertura da glabella, que é esteticamente mais desejável (Marchi and Newen 2015). A alta importância social e cultural das sobrancelhas traz a necessidade de melhores e mais precisos procedimentos para o tratamento ou modificação. Visto que é uma área altamente exposta e que afeta, além da beleza, a auto estima pessoal.

3.4. Queda capilar

A queda capilar é um sintoma inestético de uma ou mais fontes que ocorre de forma comum em homens e mulheres. É um fator de alto impacto em diversas áreas da vida pessoal e social de homens e mulheres, que afeta diversos pelos (Williamson, Gonzalez, and Finlay 2001).

A alopecia androgênica, também chamada de calvície masculina, é um processo de miniaturização do folículo capilar com um padrão de distribuição da queda correspondendo a escala de Hamilton-Norwood (Figura 6). Tem origem em fatores poli genéticos e hereditários nos homens e nas mulheres, tornando-os predispostos. Nos homens, o número de receptores andrógenos e de enzimas é mais elevado e os torna mais predispostos com relação às mulheres. Este é o caso da 5-alfa-redutase, que é 3.5 vezes mais presente nos folículos frontais masculinos (Blume-Peytavi et al. 2011; Heilmann et al. 2013). Já em mulheres, estudos indicam que a alopecia androgênica tem fatores causadores diferentes da masculina. Relata-se que a alopecia atinge apenas um terço das mulheres com níveis anormais de andrógenos (Futterweit et al. 1988; Starace et al. 2020).

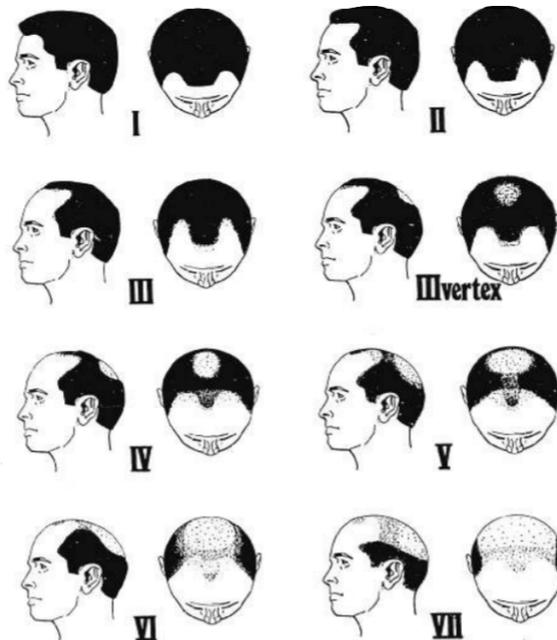


Figura 6: Padrão de classificação dos tipos mais comuns de queda capilar em homens de acordo com Hamilton-Norwood (Norwood 1975).

As sobrancelhas, apesar de não serem sensíveis aos hormônios andrógenos (Buffoli et al. 2014), podem ser atingidas por diversas outras afecções: mandrose, doenças autoimune, endocrinopatias, dermatoses secundárias, agentes exógenos, traumas e hipotricose (Velez, Khera, and English 2007). A Hipotricose da sobrancelha traz considerável preocupação no impacto pessoal e social. A causa é idiopática e pode ser provocada por diversos fatores como traumas, medicamentos ou inclusive doença sistêmica (Stoehr et al. 2019). Apesar disso, há estudos que mostram bons resultados na recuperação dos fios e uma satisfação comprovada por parte dos participantes (S. Lee et al. 2014).

3.5. O Minoxidil

O minoxidil (MXD) foi primeiramente utilizado como um potente fármaco vasodilatador que reduz a resistência periférica dos vasos e produz uma queda na pressão arterial (DrugBank). É um pró fármaco derivado de pirimidina, seu efeito principal vem do produto da sulfatação (minoxidil sulfato (MXS)) por enzimas sulfotransferases (Figura 6) presentes em diversas regiões no corpo humano e em especial na bainha externa do folículo piloso (Suchonwanit, Thammarucha, and Leerunyakul 2019), que é local de interesse para o tratamento de crescimento capilar tópicos.

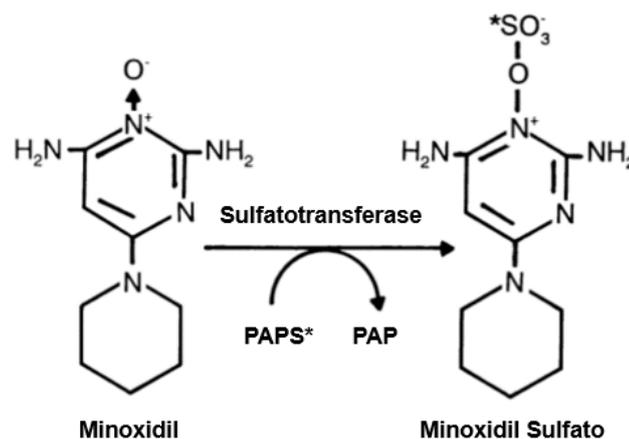


Figura 7: Sulfatação do minoxidil catalisada por sulfotransferase. PAPS * representa [35S] -3% - fosfoadenosina-5% -fosfosulfato e PAP representa 3% -fosfoadenosina-5% -fosfato (Anderson, Kudlacek, and Clemens 1998).

O mecanismo de ação do Minoxidil envolve: (I) abertura dos canais de potássio K(ATP), que, de acordo com a teoria sugerida por Xu et al, estimula o crescimento capilar (D. Xu et al. 1999); (II) estímulo do crescimento das células da papila dérmica por ação nas vias de regulação da cinase (signal-regulated kinase – ERK) e Akt com efeito no aumento da sobrevivência das células; e (III) aumento da concentração de proteínas anti-apoptóticas. Além disso, foi observado ter efeito nas células-tronco do tecido adiposo causando um estímulo parácrino que estimula a transição da fase telógena para anágena (Choi et al. 2018; Han et al. 2004).

Além de tratar as complicações mais comuns como alopecia androgenética e queda de cabelo de padrão feminino, o MXS trata off-label a alopecia areata, alopecia cicatricial centrífuga central, alopecia induzida por quimioterapia, alopecia frontal fibrosante, moniletrix, síndrome do cabelo anágeno solto e eflúvio telógeno, inclusive também há formas de uso envolvendo a melhora da aparência como o crescimento de sobrancelhas e aumento da barba (Suchonwanit, Thammarucha, and Leerunyakul 2019). Por outro lado, as formulações comerciais mais comuns compostas por propilenoglicol, álcool, MX e água, ainda que sejam efetivas no tratamento, podem causar irritações como dermatite de contato ou exacerbação da dermatite seborreica. A principal causa de alergia nas pessoas é a alta concentração de seus excipientes (propilenoglicol e álcool) (Friedman et al. 2002). O uso de concentrações de 2 a 5% geralmente é indicado para evitar quadros alérgicos. É recomendada, portanto, aplicação 2 vezes ao dia para mulheres, na concentração de 2%; e 5% uma vez ao dia para homens. Dessa forma há melhor adesão ao tratamento (Suchonwanit and Thammarucha 2020) Ainda assim, o problema persiste embora em menor grau: o tratamento causa alergias e ineficiência na entrega prolongada.

Outros exemplos de fármacos que podem aumentar o crescimento são a bimatoprost e a latanoprost. A bimatoprost, um análogo sintético da prostaglandina, é utilizada no crescimento de cílios e tem sido estudada no tratamento de sobrancelhas (FDA and Cder 2012; Suchonwanit and Thammarucha 2020). Contudo, diversos efeitos adversos como hipertensão ocular foram observados no seu uso a concentrações de 0,03% e significativamente menores em

0,01%. Porém, para melhor entendimento dessa suposição, são necessários mais testes com a concentração 0,01%, ainda que considerada efetiva (Cohen 2010). Já a latanoprost, um análogo à prostaglandina F2 alfa inicialmente utilizado para o tratamento tópico de glaucoma ou hipertensão ocular tinha como efeito adverso o alongamento e escurecimento dos cílios, assim como aumento do número de fios. Foi observado que a sua concentração a 0,1% aumentava significativamente a densidade capilar e a pigmentação (Costa 2017; X. G. Xu and Chen 2018).

3.6. Polímeros termossensíveis e mucoadesivos

Hidrogéis são redes formadas pela reticulação de polímeros hidrofílicos. Este processo é resultado de uma estrutura tri-dimensional formada por ligações cruzadas e entumescida devido a sua alta capacidade de absorção de água (Jagur-Grodzinski 2010). Essa formação tridimensional permite às moléculas de diferentes tamanhos a movimentação para dentro e para fora da estrutura, o que permite seu possível uso como sistema de liberação de diversos fármacos (Anumolu et al. 2009). Podem ser classificados como sintéticos ou naturais, de acordo com a sua origem; como copolímeros (PLX 407) ou multipolímeros pela sua composição polimérica; pela sua reticulação física ou química; ou pela carga elétrica de sua rede (não iônica, iônica, anfóterica, zwitteriônica) (Dutkiewicz, Chiu, and Urban 2017).

Os hidrogéis frequentemente possuem dois componentes centrais, o veículo líquido aquoso e o agente gelificante responsável pela formação da matriz (Vlaia et al. 2016). Um tipo de sistema composto por hidrogel são os de gelificação *in situ*. Este é definido pela sua característica de transição sol para um gel semissólido em resposta ao estímulo físico/fisiológico de aumento de temperatura (Soliman et al. 2019). Além da sua origem, esses polímeros também são classificados de acordo com o tipo de estímulo que disparam mudanças na estrutura. São em três principais grupos: por estímulo fisiológico, que é o caso dos géis termossensíveis, ultrassom, luz ou estresse mecânico; por estímulo químico (pH, por exemplo); e o biológico (enzima e biomoléculas) (Almeida et al. 2013).

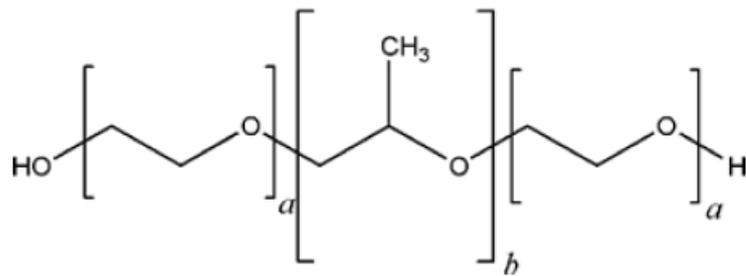


Figura 8: Estrutura química do poloxamer.

O PLX, um hidrogel, é um tensoativo sintético, não tóxico, anfifílico, não iônico e um copolímero de bloco (polioxietileno-poli-oxipropileno-polioxietileno; PEO_n–PPO_n–PEO_n) (Figura 8) sensível a temperatura. Apresentam estruturas hidrofílicas e hidrofóbicas em quantidades balanceadas. Estas estruturas apresentam o colapso ou alongamento estrutural frente quando próximas do ponto crítico da solução (mudança de fase sol para gel), que gera ajustes das interações hidrofílicas e hidrofóbicas da cadeia polimérica. Este comportamento resulta em mudanças no volume e na viscosidade do hidrogel (Bajpai et al. 2008). Uma solução com o PLX, por exemplo, em concentrações a partir de 15% apresentam a transição de fase quando atinge temperaturas próximas a 36 °C (Almeida et al. 2013, 2014). Além de sua vantagem de aumento de viscosidade frente a um estímulo, esse polímero também é quimicamente estável mesmo na presença de ácidos, alcaloides e até íons metálicos, tornando-os atrativos para entrega de fármacos. Entretanto, sistemas contendo somente o PLX possuem pouca resistência mecânica devido baixa resistência ao cisalhamento (Abou-Shamat et al. 2019). Portanto, a mistura do PLX com outro polímero é uma forma atrativa de somar sua característica a outros polímeros.

A mistura do PLX com outros polímeros para melhorar das suas características formando uma mistura binária tem sido usada para atingir diversos objetivos como melhorar a sua resistência mecânica ou para aplicações biomédicas focada na mucoadesão (da Silva, Cook, and Bruschi 2020; de Souza Ferreira et al. 2017). O HPMC (Figura 9), um polímero sintético, biodegradável, não-iônico, não

irritante, não tóxico e hidrossolúvel está disponível em diversos graus e tamanho que difere em viscosidade e extensão de substituição. Uma outra característica especial do HPMC é o comportamento de gelificação termorreversível quando em altas temperaturas (50-90°C), se liquefazendo quando resfriado. Também é estável em uma ampla faixa de pH (3-11) (Vlaia et al. 2016).

O HPMC é bem tolerado em formulações para pele e mucosa, além de apresentar características mucadesiva e bioadesiva, aderindo bem em pele, mucosa e feridas. A sua adição em formulações também melhora algumas características reológicas das fórmulas, aumentando a viscosidade, dureza e compressibilidade das concentrações de 0,4 a 1,5% (Gratieri et al. 2010; Pandey et al. 2017; Vlaia et al. 2016), trazendo incremento na sua espalhabilidade e entrega de fármacos também (Vlaia et al. 2016).

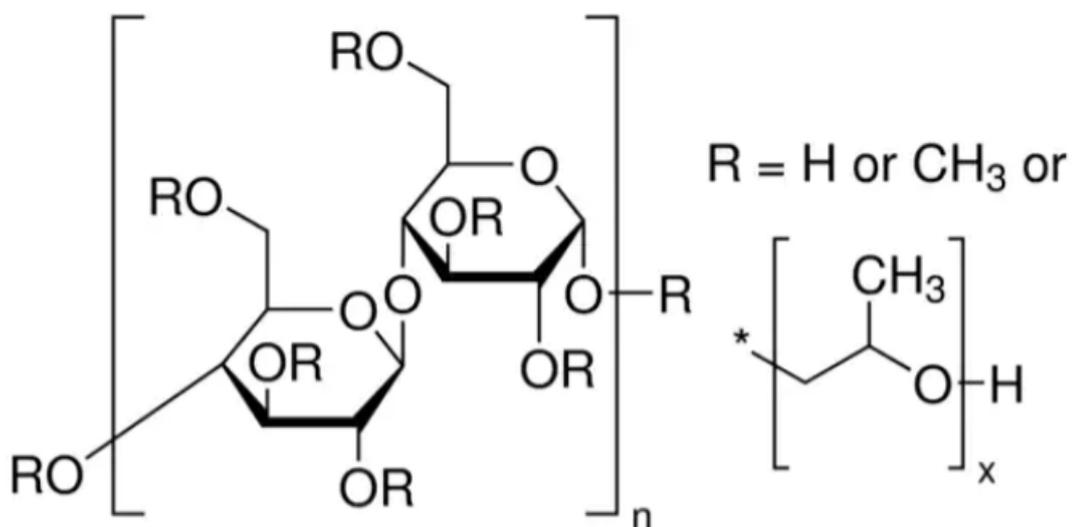


Figura 9: Estrutura química do HPMC

4. Materiais e métodos

4.1. Materiais

O MXS utilizado neste trabalho foi gentilmente cedido pela Galena Química Ltda. (Campinas, Brasil). Solventes como metanol e acetonitrila grau HPLC foram obtidos da Tedia Brazil Ltda. (Rio de Janeiro, Brasil). Para ajuste de pH foi utilizado hidróxido de sódio (Dinâmica Química Contemporânea São Paulo, Brasil). No tampão fosfato foram utilizados fosfato de sódio na forma monobásica e dibásica (Vetec, Rio de Janeiro, Brasil) e cloreto de sódio (Serva, Rio de Janeiro, Brasil). A cola de cianoacrilato usada para o tape stripping diferencial foi obtida da Loctite (São Paulo, Brasil) e a membrana de acetato de celulose (PM 12000 a 4000 Da) usado nos testes *in vitro* de liberação, da Fisherbrand (Leicestershire, UK). Todas as análises foram realizadas com água ultra purificada (Millipore, Illkirch-Graffenstaden, França). Affinisol™ (hidroxipropilmetilcelulose - HPMC) e polietilenoglicol 400 (PEG) foram obtidos da Dinâmica (São Paulo, Brasil), o Poloxamer 407 foi obtido pela Sigma-Aldrich. O filamento comercial acrilonitrila butadieno estireno (ABS) natural para impressão 3D de 1.75 mm foram obtidos pela 3Dfila (Belo Horizonte, Brasil). As células de Saarbruecken modificado foram impressas na impressora Voolt 3D model Gi3 (São Paulo, Brasil) e desenhadas graficamente e fatiados com as versões gratuitas dos softwares Tinkercad® (Autodesk® Inc, San Rafael, CA, EUA) e Slic3r® (Roma, Itália), respectivamente. A seladora a vacuo cetro 0,08Mpa foi utilizada para armazenar as peles de orelha de porco.

4.1.1. Pele de orelha de suíno

As orelhas de suínos, gentilmente cedidas pela Via Carnes (Formosa, Brasil), utilizadas no estudo de permeação e escorrimento foram obtidas logo após o abate sem que tenham passado pelo processo de escalda. A pele da porção externa são as utilizadas nos experimentos. O processo separação consiste na cuidadosa retirada da pele com o auxílio de um bisturi e tesoura para logo ser limpa e armazenada a vácuo. O tempo de armazenamento em embalagem a vácuo no freezer a -4°C é de no máximo 2 meses antes do seu uso.

4.1.2. Células 3D para permeação vertical

As células de permeação vertical foram desenvolvidas e modificadas a partir do modelo de célula de Saarbruecken em aplicativo web para projetos 3D – Tinkercad da empresa Autodesk. As peças foram impressas na impressora 3D Voolt 3D model Gi3 a base do polímero ABS natural da Volt3D. A célula desenvolvida foi dividida em 3 partes: superior, inferior e *templates*, demonstrado nas Figura 10. Na superior (Fig.10 A) há uma área interna de 9 cm², onde a pele é exposta; a parte inferior (Fig.10 B) é constituída de uma área interna de 9 cm² e profundidade de 4mm, que é destinada ao papel filtro, utilizado para sustentar e manter a hidratação utilizando uma solução tampão fosfato a 0,01 M, pH 7,4; os templates (Fig.10 C) limitam a área de aplicação na pele, demonstrado na Fig.10 E. A peça montada é representada na Fig. 10 E e F, e na Fig. 10 F representa o gel após a $T_{sol/gel}$.

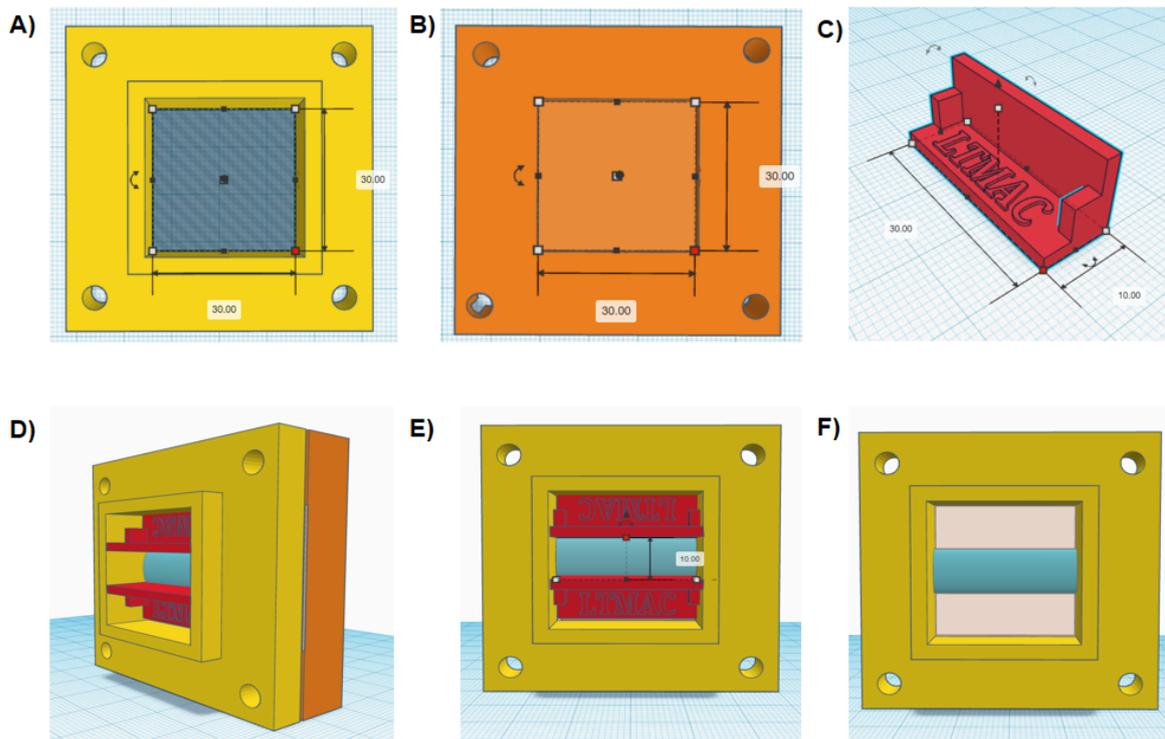


Figura 10: modelos virtuais das peças da permeação vertical.

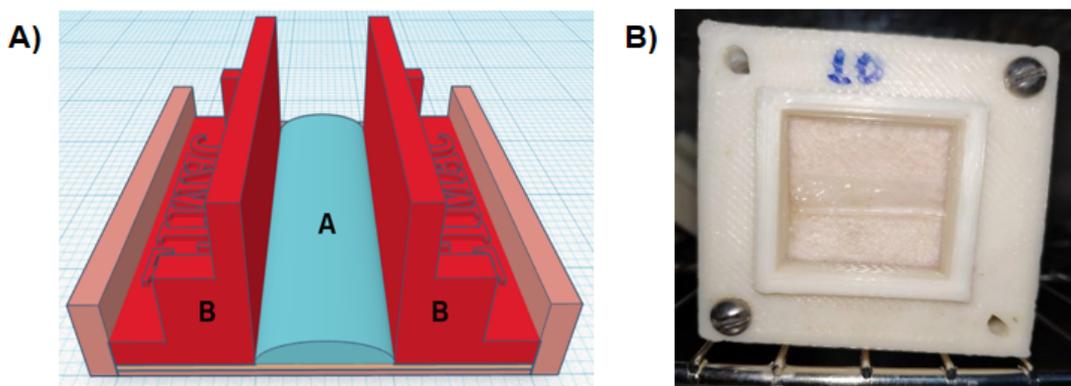


Figura 11: modelos virtual e impresso das peças da permeação vertical.

4.2. Método analítico para quantificação do Minoxidil Sulfato

Para a quantificação do MXS foi utilizada Cromatografia Líquida Cromatógrafo Líquido de Alta Eficiência (CLAE), no equipamento Shimadzu LC 20-AD, composto por um injetor automático (modelo 9SIL-20AD), forno (modelo CTO-20AS), e duas bombas (modelo LC 20-AT), acoplados a um detector espectrofotométrico (modelo SPD-M20A) e a um computador equipado com o programa de análise cromatográfica Shimadzu LC. Utilizou-se coluna de fase reversa C18 (150 mm x 4,6 mm) e fase móvel composta por uma mistura de Água: Acetonitrila (80:20) (v/v). A vazão foi de 1 mL/min, o volume de injeção das amostras foi de 50µL, temperatura do forno é de 40° C e comprimento de onda em 285 nm (Gelfuso et al. 2011). O método utilizado foi previamente validado por Matos et al. 2015

4.2.1. Curva de calibração:

Para verificar a linearidade do método uma curva analítica foi construída a partir de uma solução padrão na concentração 100 µg/mL, previamente preparada pela diluição de 10 mg do fármaco em 100 mL de metanol. A partir desta foram realizadas 5 diluições em triplicata, obtendo-se as seguintes concentrações: 1, 5, 10, 20, 30 µg/mL. A curva de calibração foi construída relacionando-se a área do pico após a injeção do padrão em relação a concentração do MXS. A análise estatística dos dados foi obtida pelo método de regressão linear no formato $y = ax + b$ onde foi

construída uma reta onde (a) corresponde ao coeficiente angular e (b) coeficiente linear. As faixas lineares foram calculadas com o coeficiente de correlação linear (r) de acordo com os parâmetros mínimos aceitáveis de $r = 0,990$ (ANVISA - Resolução nº166 2017).

4.3. Método de recuperação do MXS da pele

A recuperação do MXS foi realizada com 24 horas de agitação magnética em metanol na temperatura ambiente. Tanto na permeação estática referente à extração do fármaco do folículo piloso, pele remanescente e extrato córneo quanto para a permeação vertical com uso de pele total cortada em pequenos pedaços.

4.4. Obtenção e caracterização do gel contendo o MXS

O MXS foi adicionado em todas as formulações. Os polímeros utilizados foram o hidroxipropilmetilcelulose (HPMC) e o poloxamer 407 (PLX) nas seguintes concentrações: 0,4; 0,8; e 1,2% para HPMC e 15, 16 e 17% para PLX. O preparo de todas as formulações foi feito na seguinte ordem: solubilização do conservante ácido benzóico em banho ultrassônico, solubilização do MXS a 2% e do polietilenoglicol por agitação magnética, deposição do PLX 407 sob o líquido e armazenado a 4° C por 12 horas na geladeira. O HPMC, como último componente, foi solubilizado utilizando agitação magnética de 4 horas até se obter uma solução transparente.

4.4.1. Teste de peso de gota

O teste de peso de gota foi conduzido utilizando uma pipeta de 5 mL acoplado a uma pêssego de sucção e fixada por um suporte acima de uma balança analítica. Foram utilizados os mesmos géis do teste de escorrimento para verificar a uniformidade do peso da gota. A medição foi feita com 10 replicatas gotejadas em cima de papel manteiga na balança ajustada.

4.4.2. Teste de escorrimento

Neste teste foi medida a distância percorrida por uma gota após o gotejamento em pele de orelha de porco aquecida até 32° C em estufa, e medida

fora dela em três tempos. Para melhor avaliar a distância do escorrimento as formulações foram impregnadas com 1 mg de corante azul de metileno para auxiliar na visualização. A distância do escorrimento foi obtida pela distância percorrida pelas gotas nos tempos 1, 5 e 10 minutos. As mediadas foram obtidas com o auxílio de um paquímetro digital na escala de milímetros (mm).

O sistema utiliza dois suportes (Figuras 12) para que a pele fique posicionada a 45° em relação a base. Acima da pele, uma pipeta de 5 mL acoplado a uma pêra foi posicionado a uma distância de 1 cm e preenchido com 2 mL de cada formulação. As gotas foram liberadas ao abrir a válvula de ar e gotejadas 10 vezes de forma horizontal ao longo da pele.



Figura 12: Base de ângulo regulável junto a uma plataforma para o apoio da pele de orelha de porco. Acima, um pipetador de vidro de 5mL acoplado a uma pêra e segurado por um suporte.

4.4.3. Análise de viscosidade e temperatura de transição T_{sol/gel} das formulações

As análises reológicas das formulações foram avaliadas utilizando um reômetro Carri-Med DHR-2 da TA Instruments com geometria de cone-placa (40 mm de diâmetro e 1° de inclinação em relação à placa com gap de 25 µm). Cada amostra foi cuidadosamente aplicada à placa inferior assegurando o mínimo cisalhamento e permitindo um tempo de repouso (relaxamento da tensão introduzida antes da análise) de 5 minutos antes de cada determinação.

Os ensaios foram feitos com o auxílio de um dispositivo “Peltier”, conforme protocolo anteriores utilizados em grupos de pesquisa da UnB (Gratieri et al. 2010). O valor da região de viscoelasticidade linear (RVL) foi utilizado nos experimentos de temperatura de transição solução/gel (T_{sol/gel}) e viscosidade. Essa região é determinada para cada fórmula através do aumento da tensão oscilatória em uma frequência fixa em que a tensão e a deformação são diretamente proporcionais e o módulo elástico (G') permanece constante. Dentro dessa região pode ser escolhida qualquer valor de gama (deformação). Foi definido em 10e-2 para que o gama seja < 1, garantindo uma menor deformação para qualquer amostra dentro dessa RLV.

A temperatura de transição solução/gel (T_{sol/gel}) de soluções hidrofílicas de PLX (15, 16 e 17%) assim como o gel binário PLX/HPMC nas concentrações de 15, 16 e 17% e 0.4, 0.8 e 1.2% m/m foi realizada por meio de uma rampa de temperatura de 15° C a 50° C com aumento de 5° C/min e a frequência variando de 0,1 a 10 Hz, com Gap de 25 µm entre o cone e a placa. O ponto de T_{sol/gel} foi determinado no ponto de cruzamento do módulo G' e G''. Para a análise da viscosidade, foi medida a taxa de cisalhamento constante com uma varredura de frequência de 10Hz a 10⁻³Hz para medir a sua viscosidade dinâmica η'.

4.5. Análise de superfície de resposta

Para análise de superfície de respostas das formulações desenvolvidas foram analisadas utilizando o programa Design–Expert (versão 13.1), selecionando o subtipo randomizado, do “design” tipo I-ótico e modelo quadrático. Os fatores utilizados foram as concentrações dos polímeros PLX 407 e HPMC com três respostas para a análise: temperatura de transição sol-gel em triplicata, distância do escorrimento da gota, viscosidade da formulação a 32°C.

4.6. Estudos de irritabilidade *in vitro*

A irritação da pele promovida pelo gel contendo PLX 407, HPMC, polietileno glicol, ácido benzoico e MXS foram avaliados *in vitro* utilizando a membrana corioalantoide (CAM) do ovo de galinha como modelo experimental.

Para realizar o teste os ovos de galinha embrionados foram colocados cuidadosamente na posição vertical sob um becker, com a porção mais larga, onde é localizada a câmara de ar (Mazzuco 2008), voltada para cima. Com o auxílio de uma pinça foi feito um pequeno furo para expor a membrana e hidratá-la com solução salina. A CAM tem como característica visualizar a transparência e vasos sanguíneos.

Logo após a hidratação e retirada do excedente de solução salina, são depositados 300 µL da formulação diretamente sobre a CAM. Após 20 segundos da aplicação, as formulações foram lavadas com solução salina para retirada da formulação e logo analisadas visualmente por 5 min. Nesse tempo, foram analisados os sinais de irritação: coagulação sanguínea, hiperemia e hemorragia (Tabela 1).

Tabela 1: Classificação da irritação provocada por interação com a HET-CAM.

Hiperemia	Aparecimento de capilares não antes visualizados, ou com o aumento da intensidade de cor;
Hemorragia	Extravasamento de sangue no meio;
Coagulação	É detectada pelo aparecimento de espécies de manchas rosadas sob a membrana. Esse evento é derivado da agregação de plaquetas ou pela agregação de proteínas, que confere à amostra um aspecto esbranquiçado.

As duas formulações foram testadas em triplicata. Como controle positivo de irritação a CAM foi exposta a uma solução de NaOH 1M. Para o controle negativo utilizou-se solução salina, pH 7,4.

A pontuação em função do tempo de aparecimento de cada um dos sinais de irritação foi verificada de acordo com a Tabela 2, classificando-as.

Tabela 2. Pontuação atribuída para cada sinal indicativo de irritação em função do tempo no teste de irritação *in vitro* em modelo HET-CAM (Luepke 1985).

	$t < 20 \text{ s}$	$30 \text{ s} \leq t \leq 3 \text{ min}$	$3 \text{ min} < t \leq 5 \text{ min}$
Hiperemia	5	3	1
Hemorragia	7	5	3
Coagulação	9	7	5

Tabela 3. Classificação das formulações quanto ao grau de irritação de acordo com a pontuação atribuída (P) nos sinais de irritação segundo o teste de irritação *in vitro* em modelo HET-CAM (Luepke 1985).

Pontuação atribuída à amostra	Classificação quanto ao grau de irritação
$P \leq 1$	Praticamente não irritante
$1 < P \leq 5$	Ligeiramente irritante
$5 < P \leq 9$	Moderadamente irritante
$P > 9$	Irritante

4.7. Perfil de Liberação *in vitro*

Os ensaios de liberação *in vitro* foram realizados para avaliar a cinética de liberação das fórmulas PLX 16% e HPMC 0.4% em comparação com PLX 4% e HPMC 0,7%. O ensaio *in vitro* foi realizado utilizando-se células de difusão de Franz modificadas e membranas sintéticas hidrofílicas de acetato de celulose. O meio receptor foi preenchido com 15 mL de solução tampão fosfato a 0,01 M, pH 7,4. Foram realizadas coletas de 1 mL dentro do período de 12 horas com intervalos uma hora e logo resposto com o mesmo volume. No compartimento doador foram

adicionados 1mL de cada formulação (PLX 16% HPMC 0.4% e PLX 7% HPMC 0.7%) e como controle foi utilizado a solução aquosa de MXS 2%._

4.8. Estudo de permeação estática

A célula de difusão de Franz foi montada com a pele da orelha de porco separando o compartimento doador do compartimento receptor. No doador foram adicionadas 1 mL de cada formulação e no receptor foram adicionadas 15 mL de solução tampão fosfato a 0,01 M, pH 7,4. O sistema foi mantido a uma temperatura de aproximadamente 32° C sob agitação magnética dentro do meio receptor de 500 rpm por 12 horas. Foram feitas coletas de 1 mL a cada 3 horas do meio receptor para verificar se havia presença de MXS e repostado com o mesmo volume. Todas as amostras foram analisadas por CLAE.



Figura 13: Células de Franz.

4.8.1. Quantificação de MXS retido no estrato córneo (EC), folículo piloso (FP) e pele remanescente (PR).

Após 12 horas, a quantidade de MXS que permaneceu retida nas camadas do estrato córneo (EC), folículo piloso (FP) e pele remanescente (PR) foi determinada e diferenciada utilizando *tape-stripping* diferencial (Matos et al. 2015). Ao final de cada experimento de permeação, a pele de porco foi retirada da célula de difusão, esticada e presa sobre um suporte de isopor. O EC foi removido utilizando 15

pedaços fita adesiva 3M, sendo aplicada e retirada da pele em um único movimento. A coleta do FP foi realizada aplicando 2 gotas de cola de cianoacrilato sobre a pele e pressionando levemente durante 5 minutos até que a cola estivesse totalmente seca. As fitas do EC e FP assim como a PR foram então cortadas em pequenos pedaços e transferidos para um frasco contendo 5 mL de metanol. Seu conteúdo foi filtrado em filtros hidrofóbico com porosidade de 0,45 μm e analisado por CLAE.

4.9. Estudo de permeação vertical

O estudo foi conduzido em célula de penetração de Saarbruecken modificado. Neste modelo a pele foi cortada em uma área de 4x4 cm^2 e posicionadas na porção inferior da peça (Fig. 10 B) e fixada pela peça superior (Fig. 10 A) para firmar a pele, delimitando uma área de 3x3 cm^2 de exposição. As peças foram parafusadas e então foram colocados *templates* para divisão da área interior em superior, médio e inferior (Fig. 10 E).

As células montadas foram previamente aquecidas a uma temperatura de 32° C em estufa. Inicialmente, foram depositados 400 μL de cada gel de forma horizontal e imediatamente posicionadas em um ângulo de aproximadamente 15°, para evitar a contaminação da área superior. Os *templates* foram então removidos após 5 min de aquecimento e as células posicionadas verticalmente para interação de 12 horas. Após esse período, as peles foram removidas e lavadas até a completa remoção do gel e retirado o excesso de água com auxílio de papel.

As peles preparadas para extração foram divididas em 3 partes iguais de 3 cm^2 diferenciando parte superior, média e inferior (Fig 13). A pele total foi então cortada em pequenos pedaços e colocadas em frascos com 5 mL de metanol com agitação magnética de 500 rpm por 24 horas. Seu conteúdo foi filtrado em filtros com porosidade de 0,45 μm e analisado por CLAE.

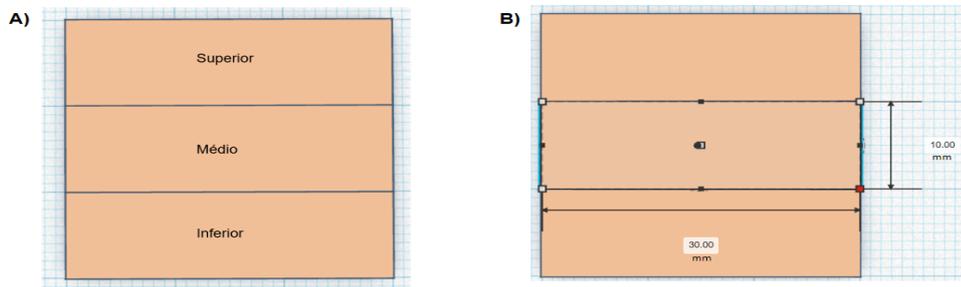


Figura 14: Representação das áreas de corte da pele. O região média é a zona de interação entre pele e gel feito pelo programa AutoDesk Tinkercad.

4.10. Análise estatística

A análise estatística foi realizada em todas as amostras foram feitas usando o GraphPad Prism 9 (GraphPad Inc., San Diego, CA, USA). Os resultados com comportamento paramétrico foram comparados usando o ANOVA one-way seguido pelo post-test de Tukey. Os resultados não-paramétricos, por outro lado, foram avaliados pelo teste de Kruskal-Wallis seguido pelo Dunn 's post-test. O nível de significância (p) foi fixado em 0,05.

5. Resultados e discussão

Este trabalho teve por objetivo desenvolver um produto inovador para o tratamento amplo da sobrancelha, envolvendo estética funcional e até de proporcionar o tratamento de afecções de origem patológica, como a alopecia. A estratégia envolveu utilizar o MXS como ativo para o estímulo do crescimento do pelo associado ao copolímero poloxamer como fator principal de fixação do gel no local de interesse e o não escorrimento da formulação. Associado ao PLX está o HPMC, um polímero sintético à base de celulose, que proporciona melhora na fórmula por mudanças positivas nos fatores de escorrimento, viscosidade e na temperatura de transição sol-gel.

5.1. Método analítico para quantificação do MXS

5.1.1. Curva de calibração

A curva de calibração avalia a adequabilidade do sistema para a realização de análises de quantificação de MXS. A curva analisada na faixa de concentração de 1,0 a 30,0 µg/mL apresentou um comportamento linear e coeficiente de correlação acima de 0,990 (1,000) e com equação da reta $y=110984x - 64279$. Demonstrando adequabilidade do sistema para a realização das análises.

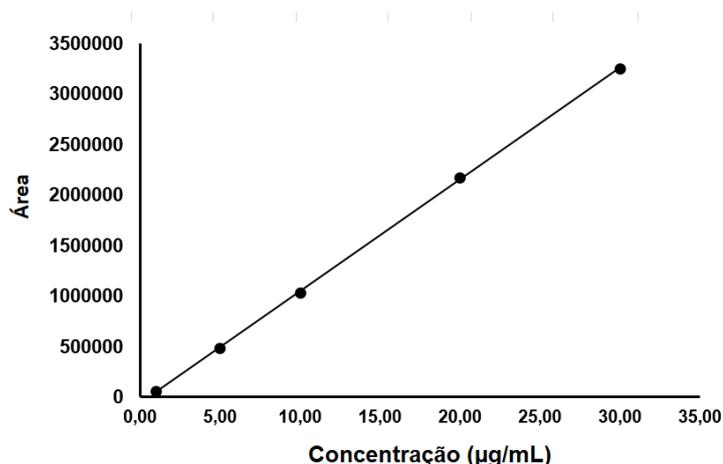


Gráfico 1. Curva analítica com a média da área de pico de cada concentração obtida pela análise do MXS por CLAE, utilizando solvente metanol, comprovando a linearidade do método. Equação

da reta $y = 110984x - 64279$ e $R^2 = 0,9999$.

5.2. Caracterização e otimização do gel

Os géis de PLX e HPMC foram caracterizadas físico-quimicamente nas concentrações descritas na Tabela 4. A escolha do PLX foi realizada baseada na sua característica de $T_{sol/gel}$ frente ao aumento de temperatura e aumento da fixação, enquanto o HPMC apresenta melhorias nas características mecânicas da formulação (da Silva, Cook, and Bruschi 2020). Os resultados obtidos foram utilizados para seleção de uma formulação otimizada a partir da análise de superfície de resposta.

Para avaliação do desempenho das misturas assim como selecionar uma formulação otimizada (FO) e uma formulação de comparação (FC), os homopolímero (Tabela 4) e os binários (Tabela 5) foram caracterizados pelos seguintes teste: peso de gota, que verifica a homogeneidade da gota com os polímeros misturados ou não; escorrimento da gota em pele de porco aquecida, que demonstra a distância percorrida ao se gotejar as fórmulas em numa inclinação de 45°; o $T_{sol/gel}$ constata a temperatura de transição para estar adequada ao local de aplicação; e por fim, a viscosidade, que avalia este parâmetro em temperatura ambiente (25°C) assim como a alterações geradas pela mistura dos polímeros.

Em seguida, os dados de caracterização foram utilizados para estudar a influência de cada polímero através da análise de superfície de resposta (ASR) assim como determinar uma FO e outra FC. A ASR foi feita com desenho otimização no modelo quadrático e subtipo randomizado com 150 corridas. Para seleção da FO e FC foram definidos critérios de seleção de acordo com o objetivo de cada fórmula escolhida. As respostas obtidas para peso da gota, escorrimento, viscosidade e $T_{sol/gel}$ foram analisadas usando o software Design Expert 13.0 (Stat-Ease, Minneapolis, MN, EUA).

A FO (PLX 16% HPMC 0,4%) foi selecionado priorizando o mínimo escorrimento, maior $T_{sol/gel}$ e viscosidade e peso de gota dentro do intervalo mínimo e máximo obtidos na caracterização, visto que seu objetivo é a fixação na sobrancelha. Já a FC (PLX 4% HPMC 0,7%) teve como critérios a minimização do

peso da gota, maior escorrimento, $T_{sol/gel}$ e viscosidade dentro do intervalos mínimos e máximo obtidos para demonstrar o efeito oposto a FO.

Tabela 4: Grupo dos homopolímeros com a porcentagem de poloxamer e HPMC analisados para caracterização.

(A) PLX 15%	(D) HPMC 0,4%
(B) PLX 16%	(E) HPMC 0,8%
(C) PLX 17%	(F) HPMC 1,2%

Tabela 5: Grupo dos polímeros binários com a porcentagem de poloxamer e HPMC analisados para caracterização.

(G) PLX 15% HPMC 0,4%	(J) PLX 16% HPMC 0,4%	(M) PLX 17% HPMC 0,4%
(H) PLX 15% HPMC 0,8%	(K) PLX 16% HPMC 0,8%	(N) PLX 17% HPMC 0,8%
(I) PLX 15% HPMC 1,2%	(L) PLX 16% HPMC 1,2%	(O) PLX 17% HPMC 1,2%

5.2.1. Teste de peso de gota

O peso da gota foi avaliado observando a influência do aumento da concentração polimérica nas fórmulas binárias e nos homopolímeros para averiguar a uniformidade das gotas a serem estudadas no teste de escorrimento.

Entre os homopolímeros houve diferenças estatísticas entre todas as concentrações de PLX e HPMC (Tabela 6 A-C e D-F), explicado pela diferença de concentração de cada polímero. Já entre o PLX (Tabela 6 A-C) houve diferença estatística entre a fórmula A (P15) com B-C (P16 e P17), e também entre a fórmula B (P16) e C (P17), demonstrando 1% deste copolímero é o suficiente para haver diferença estatística no peso da gota medido pela média dos resultados.

Já entre os binários, nas fórmulas P15H12, P16H12 e P17H12 (Tabela 6 I, L e O), há aumento do peso com o aumento da concentração de PLX de forma estatisticamente significativa. Enquanto o aumento da concentração HPMC apresentou diferença estatística na redução do peso da gota (Tabela 6 G-L), mas sem influência quando o PLX está na concentração de 17% (Tabela 6 M-O). Estes

dados junto à superfície de resposta obtida indicam que o aumento da concentração do HPMC eleva o peso da gota ainda que com pouco impacto (Gráfico 2).

Tabela 6: Resultados do peso de gota em miligramas (mg) para cada formulação analisada em balança analítica.

FORMULAÇÃO		Peso (mg)
(A) PLX 15%	P15	0,027 ± 0,002
(B) PLX 16%	P16	0,028 ± 0,003
(C) PLX 17%	P17	0,026 ± 0,002
(D) HPMC 0,4%	H04	0,044 ± 0,009
(E) HPMC 0,8%	H08	0,047 ± 0,004
(F) HPMC 1,2%	H12	0,055 ± 0,017
(G) PLX 15% HPMC 0,4%	P15H04	0,026 ± 0,002
(H) PLX 15% HPMC 0,8%	P15H08	0,027 ± 0,001
(I) PLX 15% HPMC 1,2%	P15H12	0,023 ± 0,002
(J) PLX 16% HPMC 0,4%	P16H04	0,028 ± 0,002
(K) PLX 16% HPMC 0,8%	P16H08	0,024 ± 0,001
(L) PLX 16% HPMC 1,2%	P16H12	0,025 ± 0,002
(M) PLX 17% HPMC 0,4%	P17H04	0,026 ± 0,002
(N) PLX 17% HPMC 0,8%	P17H08	0,026 ± 0,002
(O) PLX 17% HPMC 1,2%	P17H12	0,027 ± 0,002

Naturalmente, o peso gerado pelo HPMC está associado a fatores como a densidade (1.2 g/cm³ (AffinisolTM)) maior em relação ao PLX (0.50 g/cm³ (Kolliphor® 2020)), concentração assim como viscosidade (van Santvliet and Ludwig 1999), sendo o HPMC menos viscoso devido às baixas concentrações neste estudo (Tabela 6 D-F). Em estudo de Da Silva; Cook; Bruschi, 2020, o HPMC apresentou aumento no índice de consistência (k), índice relacionado a resistência à deformação e viscosidade. Esse fator traz benefícios ao PLX, que apresenta aumento do k tanto em 5° C quanto em 25° C. A redução do peso pelo HPMC pode estar associada a maior densidade, índice k, e viscosidade.

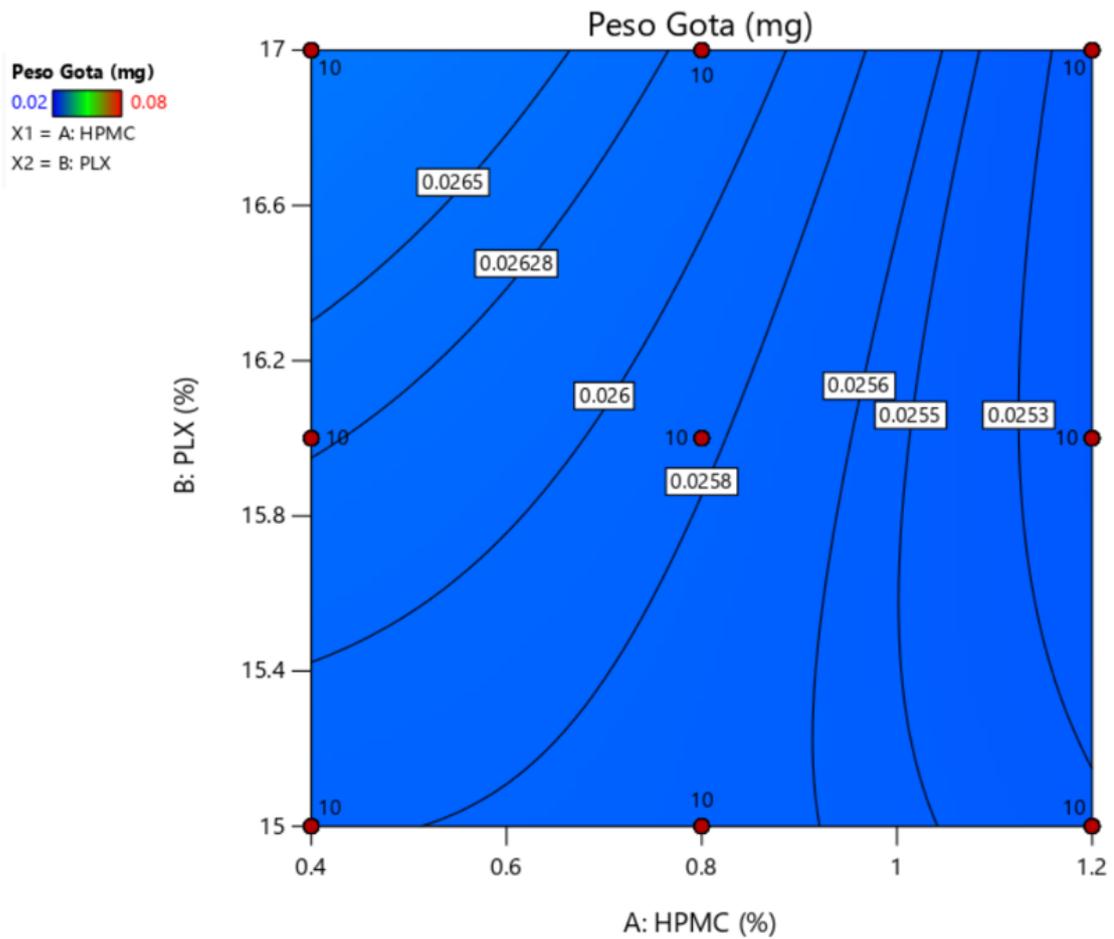


Gráfico 2: superfície de resposta do tipo “sela” com ordem de processo quadrático. O gráfico demonstra dentro do valor máximo e mínimo dos valores obtidos pela caracterização, por uma escala de cor (canto superior esquerdo), a influência de cada polímero no peso da gota. É visto que a variação de concentração de cada polímero pouco influência no peso. É possível verificar a influência através da equação de predição abaixo onde o HPMC tem valor de 0,013 enquanto o PLX tem valor de -0,002.

Equação de predição: $\text{Peso Gota} = +0.039 + 0.013\text{HPMC} - 0.002\text{PLX} - 0.001\text{PLX} \cdot \text{HPMC} - 0.001\text{HPMC}^2 - 0.0001\text{PLX}^2$.

5.2.2. Teste de escorrimento de gota em pele de porco

A fim de determinar a particularidade de cada formulação no escorrimento, foi analisada a distância percorrida pela gota de acordo com a concentração de cada polímero dentro em tempos pré-determinado: 1 min, 5 min e 10 min em 10 replicatas. O tempo inicial de avaliação foi baseado no tempo de gelificação, que é de aproximadamente 31 ± 3 segundos (Patel et al. 2019).

Foi observado que, ao comparar os homopolímeros com os géis binários, o HPMC (H) possui influência significativa na redução da distância em relação ao PLX (P). Houve diferença significativa principalmente entre P15 (Tabela 7 A) com P16H08 e P17H04 (Tabela 7 K e M) em todos os tempos, havendo diferença com P17H08 (Tabela 7 N) somente no primeiro tempo (1min). Enquanto o P17H12 (Tabela 7 O) se diferenciou de P15 no tempo 1 e 5 min. Em 10 min de P17H12, o P15 se diferenciou nos tempos 5 e 10min de seu escorrimento. Já a FC, demonstrou diferenças estatísticas da P15 apenas nos tempos 5 e 10 min, demonstrando que o escorrimento da FC continuou enquanto a P15 se manteve.

Já com relação a P16 (Tabela 7 B), houve um menor número de diferenças significantes. P16 (1, 5 e 10min) apresentou diferença estatística com P17H04 (Tabela 7 M) em 1 e 5 e 10 min. Em relação a P17 (Tabela 7 C), este demonstrou diferença significativa somente com P15 (Tabela 7 A). O resultado demonstrou que P15 se diferencia com quase todos os tempos de P17, com exceção de 1min de P15. Em relação à FC, houve diferenças estatísticas em em todos os tempos de P16 e P17, escorrendo mais.

Em relação a H04, H08 e H12 (Tabela 7 D-F) houve diferença estatística com a maioria das formulações binárias. A formulação H04 apresentou diferença estatisticamente significativa com as formulações P16H08, P17H04, P17H12 (Tabela 7 K, M e O) em todos os tempos, exceto com P17H08 (Tabela 7 N) no tempo de 10min. A formulação H08 (Tabela 7 E) apresentou maior escorrimento com diferença estatística em 1min com relação a maioria das fórmulas, exceto pela P16H04 (Tabela 7 J). No tempo de 5 min de H8, a formulação que não apresentou diferença somente com P15H04 (Tabela 7 G). Ademais, no tempo de 10 min, não

houve diferença somente com P15H04 e P16H04 (Tabela 7 G e J). Já em relação a H12, houve diferença estatística com P15H12, P16H08, P17H04 e P17H12 (Tabela 7 I, K, M e O) em todos os tempos. Porém, a formulação P17H08 (Tabela 7 N) demonstrou diferença no tempo 1min e 5min, enquanto a fórmula P16H04 (Tabela 7 J) demonstrou no tempo 5 min. Já comparando a FC (Tabela 7 O) com as demais concentrações de HPMC, foi visto que não houve diferença estatística, implicando que o gel de escolha se comporta de forma semelhante às formulações que mais escorreram.

Nas análises entre os géis binário, houve uma diferença estatística entre: P15H04 com e P17H04 (Tabela 7 G e M) em 5 e 10min; o P15H08 e P16H08 (Tabela 7 H e K) apresentou diferença em todos os tempos; enquanto o P15H12 somente apontou diferença estatística com P16H12 em 1min (Tabela 7 I e L);o P16H04 apresentou diferença com P16H08 e P16H12 em todos os tempos (Tabela 7 J, K e L) e com P17H04 em 1 e 10 min (Tabela 7 M); em P16H08, este apresentou diferença com P17H08 somente em 10 min (Tabela 7 K e N); com P16H12 foi exposta a diferença somente com P17H12 no tempos 5 e 10min (Tabela 7 L e O); por fim, o P17H04, apresentou diferença no tempo 5 e 10 com P17H08 (Tabela 7 M e N). Em relação a FC, está se diferenciou em todos os tempos com as formulações com PLX 16 e 17% (Tabela 7 J-O), já com relação aos géis binários de P15H04-12 (Tabela 7 G-I) no tempo de 1 min, as formulações P15H04 e P15H08 (Tabela 7 G e H) não se diferenciam. No tempo de 5 e 10 min a FC se diferenciou de P15H08-12 em todos os tempos (Tabela 7 H e I), exceto pela fórmula P15H04 (Tabela 7 G), em todos os tempos.

Tabela 7. Distância de escorrimento em milímetros (mm) nos tempos 1, 5 e 10 minutos das formulações com poloxamer, HPMC e as formulações binárias caracterizadas. Símbolos da diferença estatística: a – PLX 15% 1 min; b - PLX 15% 5min; c - PLX 15% 10 min; d – PLX 16% 1min; e - PLX 16% 5min; f - PLX 16% 10 min.

FORMULAÇÃO		1 MIN (mm)	5MIN (mm)	10MIN (mm)
(A)	PLX 15% P15	12,52 ± 4,85	12,77 ± 5,01	12,83 ± 4,87
(B)	PLX 16% P16	7,96 ± 0,95	8,15 ± 1,09	8,25 ± 1,05
(C)	PLX 17% P17	6,26 ± 0,60	6,46 ± 0,68	6,44 ± 0,71
(D)	HPMC 0,4% H04	12,62 ± 5,27	12,92 ± 5,29	15,11 ± 8,36
(E)	HPMC 0,8% H08	23,50 ± 6,50	25,79 ± 8,82	28,58 ± 8,44
(F)	HPMC 1,2% H12	14,36 ± 4,69	15,30 ± 5,32	16,09 ± 5,88
(G)	PLX 15% HPMC 0,4% P15H04	7,17 ± 1,73	7,62 ± 1,57	7,71 ± 1,58
(H)	PLX 15% HPMC 0,8% P15H08	6,93 ± 0,66	7,07 ± 1,57	7,10 ± 0,68
(I)	PLX 15% HPMC 1,2% P15H12	6,60 ± 0,87	6,76 ± 0,96	6,78 ± 0,92
(J)	PLX 16% HPMC 0,4% P16H04	7,22 ± 1,12	7,00 ± 1,11	7,49 ± 1,02
(K)	PLX 16% HPMC 0,8% P16H08	6,17 ± 0,35	7,00 ± 0,49	6,27 ± 0,35
(L)	PLX 16% HPMC 1,2% P16H12	7,22 ± 1,12	7,30 ± 1,06	7,49 ± 1,02
(M)	PLX 17% HPMC 0,4% P17H04	5,79 ± 0,58	5,83 ± 0,58	6,10 ± 0,64
(N)	PLX 17% HPMC 0,8% P17H08	6,47 ± 0,66	6,70 ± 0,66	7,07 ± 0,69
(O)	PLX 17% HPMC 1,2% P17H12	6,135 ± 0,29	6,329 ± 0,20	6,44 ± 0,31
(P)	PLX 4% HPMC 0,7% P04H07	15,79 ± 2,55	18,78 ± 3,24	18,91 ± 3,64

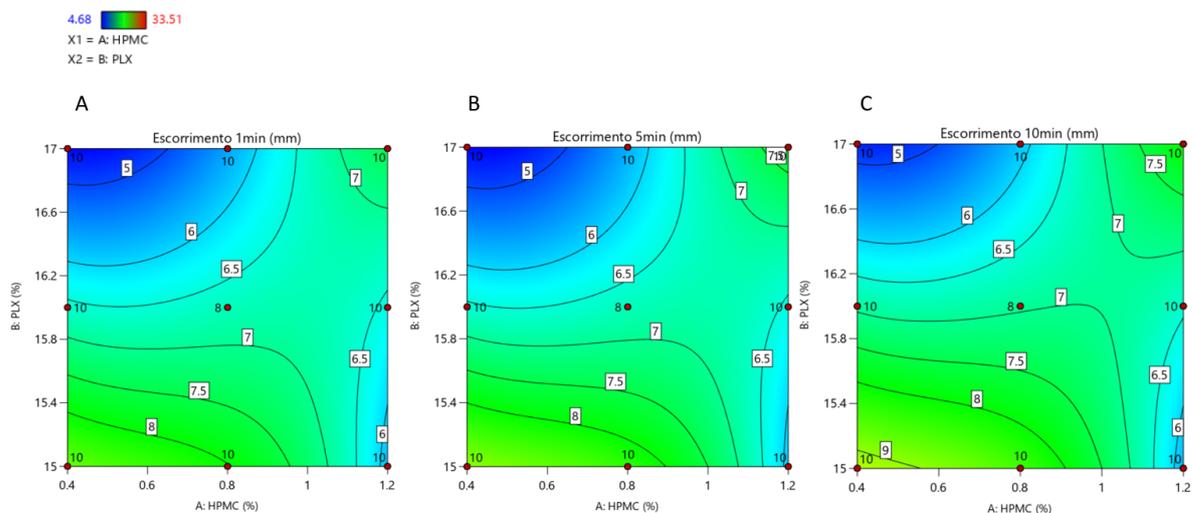


Gráfico 3: Gráfico de superfície de resposta do tipo “sela” com ordem de processo cúbico. O gráfico demonstra, dentro do valor máximo e mínimo obtido pela caracterização, a influência de cada polímero por uma escala de cores (canto superior esquerdo). Pode ser observado nos gráficos junto às equações que há um leve aumento da influência do HPMC no escorrimento conforme o decorrer do tempo. A equação de predição também representa essa influência.

Equação Gráfico A: Escorrimento 1min= $- 12.32586 + 79.85173 \text{ HPMC} + 6.76162 \text{ PLX} - 9.47102 \text{ HPMC} \cdot \text{PLX} - 38.92233 \text{ HPMC}^2 - 0.478265 \text{ PLX}^2 + 3.46625 \text{ HPMC}^2 \cdot \text{PLX} + 0.235882 \text{ HPMC} \cdot \text{PLX}^2 - 7.40768 \text{ HPMC}^3 + 0.008675 \text{ PLX}^3$.

Equação Gráfico B: Escorrimento 5 min= $- 16.93065 + 95.77942 \text{ HPMC} - 10.91776 \text{ HPMC} \cdot \text{PLX} - 47.71373 \text{ HPMC}^2 - 0.833631 \text{ PLX}^2 + 4.08830 \text{ HPMC}^2 \cdot \text{PLX} + 0.261219 \text{ HPMC} \cdot \text{PLX}^2 - 7.92182 \text{ HPMC}^3 + 0.019194 \text{ PLX}^3$.

Equação Gráfico C: Escorrimento 10min= $- 17.93333 + 107.50795 \text{ HPMC} + 8.43044 \text{ PLX} - 11.74828 \text{ HPMC} \cdot \text{PLX} - 57.27057 \text{ HPMC}^2 - 0.624389 \text{ PLX}^2 + 4.55668 \text{ HPMC}^2 \cdot \text{PLX} + 0.272179 \text{ HPMC} \cdot \text{PLX}^2 - 7.04547 \text{ HPMC}^3 + 0.012713 \text{ PLX}^3$.

No gráfico de superfície de resposta (Gráfico 3), correspondendo aos dados da Tabela 7 acima descritos, onde as diferenças estatísticas sugerem que as formulações com concentração de PLX em 17% são semelhantes, apesar da mudança na concentração de HPMC, já sofrendo maior escorrimento conforme a redução da concentração de PLX. A influência do HPMC é consideravelmente maior a partir de 0,8%, assim como sugere o gráfico 3.

5.2.3. Análise reológica

Na reologia, um gel é definido como um material cujo módulo de armazenamento (G') é consideravelmente maior que o módulo de perda (G'') em uma larga faixa de frequência, resultando em um pequeno ângulo de fase δ ($\tan \delta = G''/G'$) (Almdal et al. 1993). A (VRL) Região Viscoelástica Linear é o primeiro passo para determinar a temperatura de transição do gel. Esta região pode ser definida em qualquer ponto que esteja na região constante para se fazer as análises de temperatura de gelificação e viscosidade.

Este teste gera um aumento da tensão oscilatória com uma frequência fixa na amostra, demonstrando a região onde a tensão e a deformação foram diretamente proporcionais e o módulo de estocagem, ou elástico (G'), permanece constante (Gratieri et al. 2010). Deve-se determinar essa região para amostras que têm comportamento de fluidos e sólidos ao mesmo tempo. Assim, o gama (deformação) foi definido em 10^{-2} , garantindo que não haverá grandes deformações na amostra devido ao gama estar < 1 . Essa região pode ser observada no gráfico abaixo:

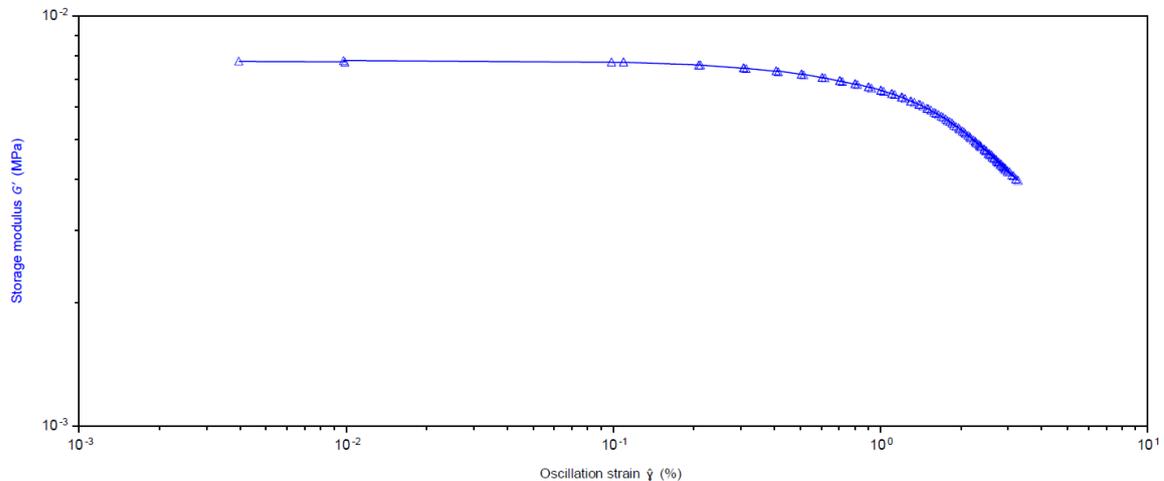


Gráfico 4: Determinação da Região viscoelástica linear (10^{-3} a 10^{-1}), realizado na temperatura máxima de 50°C e frequência fixa de 10Hz.

O gel otimizado (Plx 16% HPMC 0.4%) apresentou média de transição sol-gel em $30,4^\circ\text{C}$. Esta faixa é desejável devido a temperatura média da testa e pálpebras estarem em torno de $34.5 \pm 0.6^\circ\text{C}$ (D. H. Lee et al. 2019), garantindo que o gel estará na forma de gel assim que for aplicado nas sobrelhas e eliminando o escorrimento.

5.2.3.1. Teste de rampa de temperatura

A $T_{\text{sol/gel}}$ foi definida pelo crossover onde o G' é igual à G'' reflete na propriedade viscoelástica (Dumortier et al. 1991). Os dados foram analisados comparando os módulos (G') módulo de armazenamento e módulo de perda (G'') (Gráfico 5) em relação à temperatura (eixo X) e a $\tan(\delta)$.

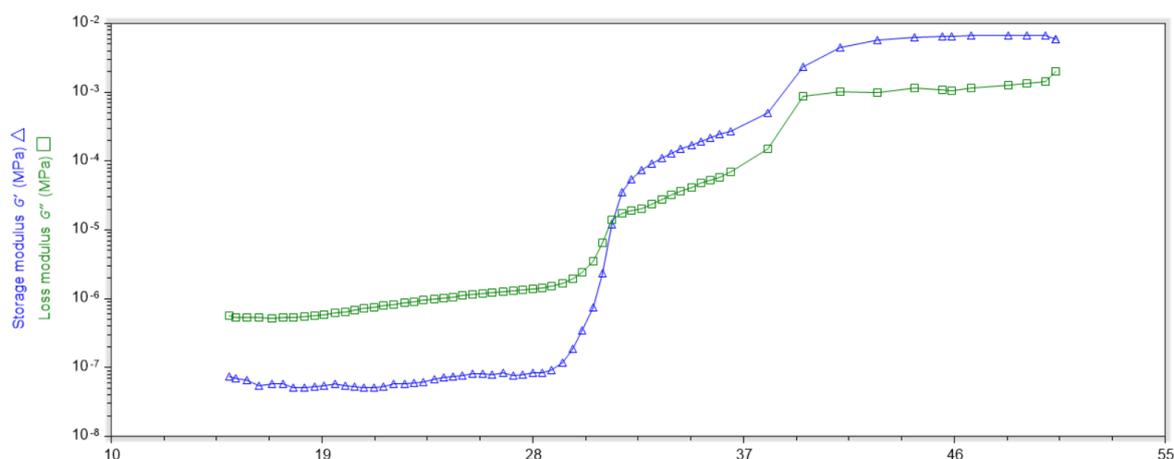


Gráfico 5: Exemplo do ponto transição da solução PLX 16% HPMC 0,4%. A $T_{\text{sol/gel}}$, cruzamento do G' e G'' , ocorrendo na temperatura 31,35°C, representando o momento de gelificação com o aumento do módulo G' com aquecimento de 5°C/min.

A rampa de temperatura é uma ferramenta que auxilia no entendimento das características de um gel *in situ* nas temperaturas do ambiente e fisiológicas, que são determinadas pelas propriedades dinâmicas elásticas (módulo elástico (G')) e viscosa (ou módulo dissipativo (G'')). O G' alto representa a capacidade do material de não se deformar frente a uma força de cisalhamento devido a sua capacidade de absorver energia (Gratieri et al. 2010; Li et al. 2020).

O comportamento reológico da formulação é crítico para dosamento da gota, tempo de transição, dose liberada do fármaco, segurança e eficácia. Assim como influencia na adesão do paciente e conforto da aplicação (Krtalić et al. 2018). A formulação para aplicação nas sobrancelhas deve facilitar a aplicação em gota. Para isto é necessário, na temperatura ambiente, que o G'' seja superior ao G' e

permitindo fluidez e o inverso para que proporcione fixação sem um escorrimento considerável (Gratieri et al. 2010).

Tabela 8: T_{sol/gel} (°C) das formulações termo sensíveis homopoliméricas e bifásicas obtidos por análise de rampa de temperatura.

FORMULAÇÕES	T _{sol/gel} (°C)
(A) PLX 15%	33,61 ± 2,0
(B) PLX 16%	31,39 ± 2,5
(C) PLX 17%	28,97 ± 3,7
(G) PLX 15% HPMC 0.4%	27,73 ± 7,6
(H) PLX 15% HPMC 0.8%	25,62 ± 7,3
(I) PLX 15% HPMC 1,2%	25,45 ± 5,1
(J) PLX 16% HPMC 0.4%	30,37 ± 4,5
(K) PLX 16% HPMC 0.8%	28,53 ± 3,7
(L) PLX 16% HPMC 1,2%	24,45 ± 1,1
(M) PLX 17% HPMC 0.4%	26,84 ± 7,4
(N) PLX 17% HPMC 0.8%	26,35 ± 0,2
(O) PLX 17% HPMC 1,2%	23,25 ± 8,5

As formulações demonstram diferença estatística com a amostra PLX 15% (A) em relação ao PLX 16% HPMC 1,2% (L) e PLX 17% HPMC 1,2% (O). As demais não apresentaram diferença estatística. Apesar disto, pode ser visto que há uma influência mínima na mistura do PLX com o HPMC onde o HPMC reduziu a temperatura de transição média. A influência do HPMC em formulações contendo polímeros termo sensíveis, ainda que pouco estudado, resulta no aumento da sua temperatura de gelificação conforme o aumento da concentração (da Silva, Cook, and Bruschi 2020). Há também o fato de que maiores concentrações poliméricas se tornarem mais propensas a se sobreporem, assim a gelificação de frações de volume crítico pode ser alcançada em temperaturas mais baixas (Weaver et al. 2016), fato que pode ser visto conforme o aumento de HPMC (Gráfico 6).

estresse. Além disso, o aumento da viscosidade após a transição de temperatura traz mais benefícios ao tratamento devido a alto aumento de viscosidade quando em contato com a pele.

A viscosidade das formulações binárias e do PLX homopolimérico foi investigada a 25°C por oscilação de frequência (Gráfico 7) para buscar a melhor formulação (otimizada) para aplicação nas sobrancelhas. Nas formulações binárias o HPMC aumentou de forma estatisticamente significativa a viscosidade dinâmica, principalmente quando o PLX está em 15% (concentração mais baixa) e também quando o HPMC está em 1,2%. Quando em 0,4% de HPMC, todas as concentrações demonstraram diferenças estatísticas entre si (Tabela 9 G, J e M). O aumento de PLX nesta concentração de HPMC demonstrou diferença estatística, demonstrando o efeito da combinação. Foram observadas poucas diferenças estatísticas quando o HPMC se encontra em 0,8%, aparecendo essas diferenças quando com o HPMC em 1,2%. Assim sendo, os dados estatísticos corroboram com o gráfico 8, onde a maior mudança proporcionada pelo HPMC ocorre quando o PLX está em 15%, sendo menos influente quando o PLX está em 16% e ainda menor quando em 17%, sendo o PLX o fator principal.

Ainda assim, as formulações homopoliméricas de PLX comparadas aos géis binários não demonstram diferença estatisticamente significativa. Levando a entender que na viscosidade o HPMC tem pouca influência.

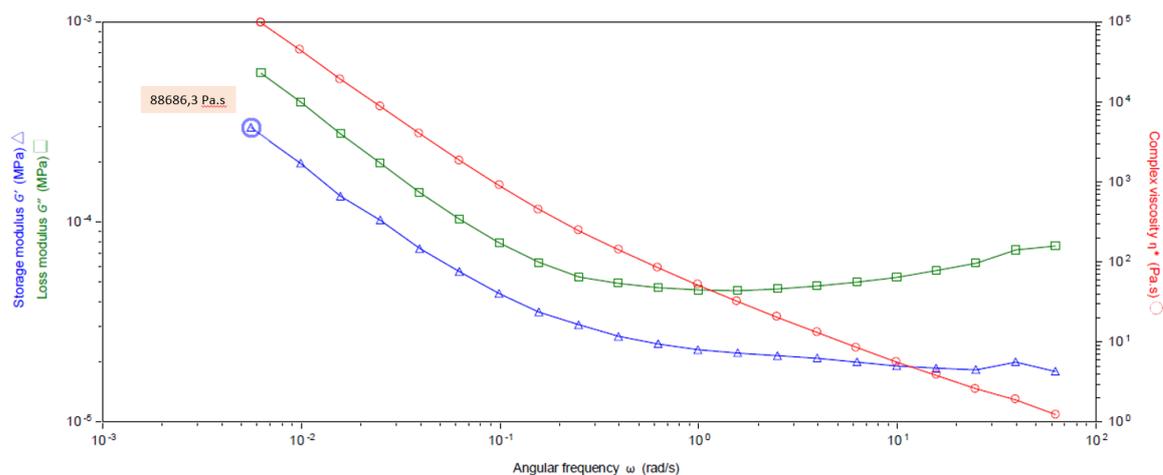


Gráfico 7: O gráfico apresenta oscilação de frequência realizado a 25°C. O strain utilizado foi de 0,1% em frequência oscilado de 10 a 10⁻³ Hz. O ponto marcado no gráfico representa onde se encontra o resultado de viscosidade dinâmica.

Tabela 9: Tabela demonstrando a viscosidade de cada amostra analisada pelo teste de viscosidade dinâmica feito a 25°C.

FORMULAÇÕES		Viscosidade dinâmica η' (Pa.s)
(A) PLX 15%	P15	70559,8 ± 3276,3
(B) PLX 16%	P16	92731,3 ± 4319,4
(C) PLX 17%	P17	84659,9 ± 4239,2
(G) PLX 15% HPMC 0.4%	P15H04	89993,1 ± 10430,3
(H) PLX 15% HPMC 0.8%	P15H08	91966,4 ± 3144,9
(I) PLX 15% HPMC 1,2%	P15H12	113818,9 ± 14266,5
(J) PLX 16% HPMC 0.4%	P16H04	81970,97 ± 10012,67
(K) PLX 16% HPMC 0.8%	P16H08	90917,0 ± 14762,9
(L) PLX 16% HPMC 1,2%	P16H12	84616,7 ± 30821,3
(M) PLX 17% HPMC 0.4%	P17H04	98664,5 ± 1249,9
(N) PLX 17% HPMC 0.8%	P17H08	86571,5 ± 17235,3
(O) PLX 17% HPMC 1,2%	P17H12	125363,6 ± 47896,5
(P) PLX 4% HPMC 0,7%	P04H07	1653,705 ± 626,6

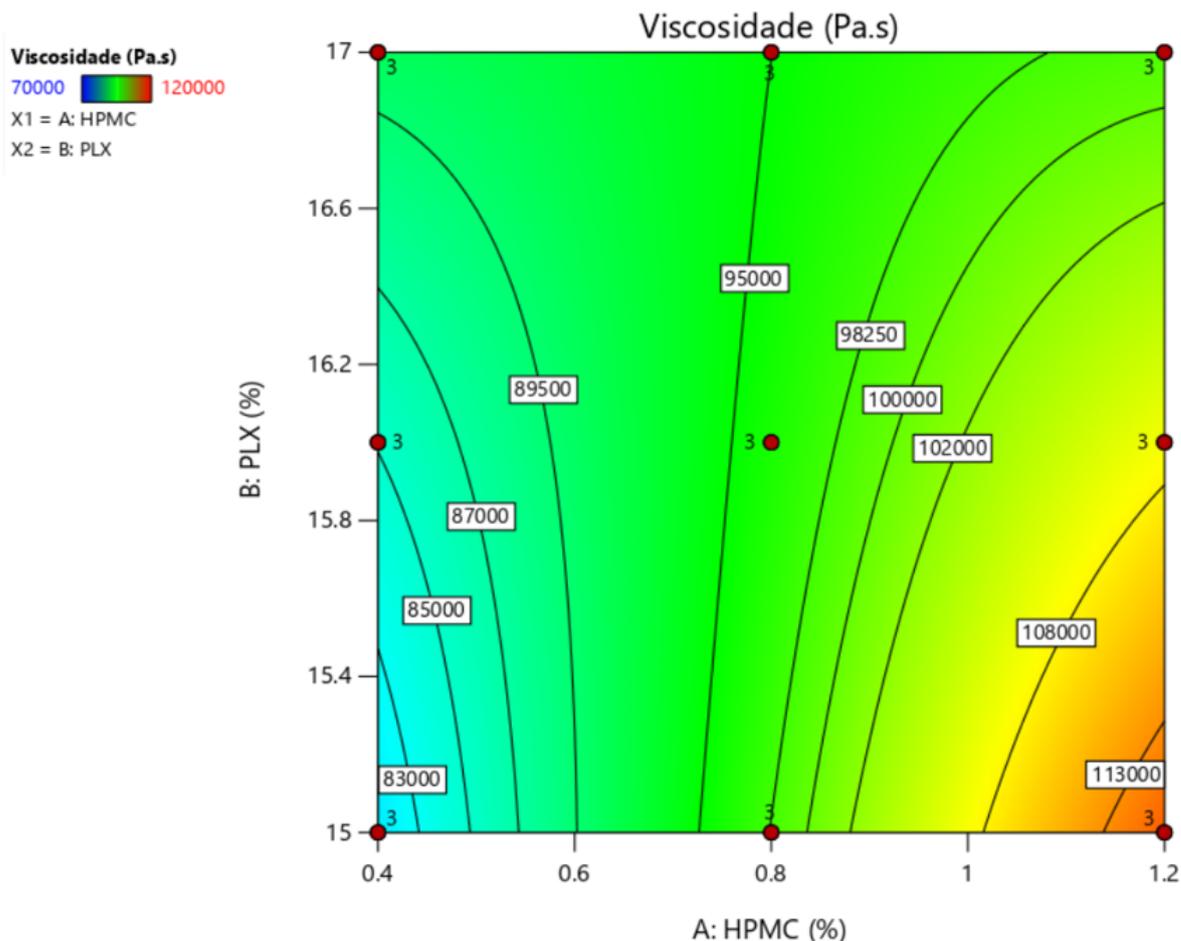


Gráfico 8: gráfico do tipo “sela” representando a influência de cada polímero na formulação. É possível analisar a transição da cor azul clara para vermelho são as zonas onde a concentração de HPMC tem mais influência na formulação.

Equação: $Viscosidade = 17904.02510 - 66892.96722 \text{ HPMC} + 12469.25939 \text{ PLX} + 21220.42964 \text{ HPMC} \cdot \text{PLX} + 69909.98051 \text{ HPMC}^2 - 1267.65485 \text{ HPMC}^2 \cdot \text{PLX} - 1096.90655 \text{ HPMC} \cdot \text{PLX}^2 - 21027.65226 \text{ HPMC}^3 + 57.28990 \text{ PLX}^3$.

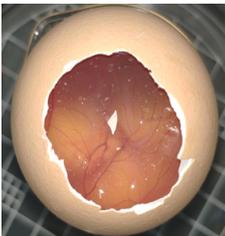
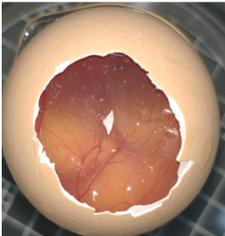
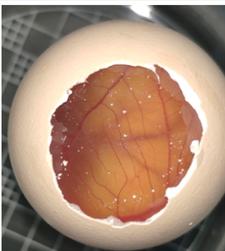
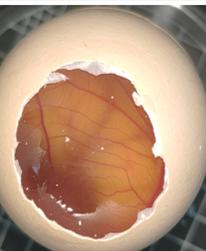
5.3. Estudos de irritabilidade *in vitro* (HET – CAM)

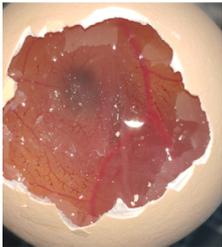
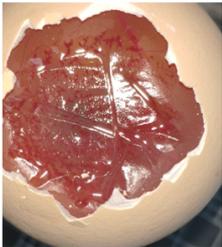
O HET-CAM (Hen's Egg Test - Chorioallantoic Membrane) ou Teste do Ovo de Galinha - Membrana Corioalantóica, é estudado como método alternativo ao teste de draize ocular (Gilani et al. 2022; Worth and Cronin 2001). Atualmente, a autoridade regulatória brasileira ANVISA (Agência Brasileira de Vigilância Sanitária) assim como de alguns países membros da Comunidade Europeia aceitam o teste

HET-CAM como método de desenvolvimento para produtos cosméticos (Liebsch and Spielmann 2002).

Este teste avalia o potencial irritativo de forma tempo dependente observando se há toxicidade vascular (hemorragia, hiperemia e coagulação) durante 5 min (Gratieri et al. 2010). Os resultados podem ser vistos na tabela 14 abaixo:

Tabela 10: Resultado do teste HET-CAM com a formulação PLX 16% HPMC 0,4% MXS 2 e PLX 4% HPMC 0,7 % MXS 2%. As imagens são representadas em 20 segundos, 3 minutos e 5 minutos. No controle positivo (NaOH 1 M) observa-se hemorragia e hiperemia, no controle negativo com solução salina a 0,9% não se observa nenhuma irritabilidade.

Amostras	20 seg.	3 min.	5 min.	Índice de irritação
Controle Negativo				Praticamente não irritante
PLX 16% HPMC 0,4% MXS 2%				Praticamente não irritante
PLX 4% HPMC 0,7% MXS 2%				Praticamente não irritante

Amostras	20 seg.	3 min.	5 min.	Índice de irritação
Controle positivo				Irritante

Os ovos foram observados nos tempos: 20 segundos, 3 minutos e 5 minutos. O teste negativo não apresentou mudança na membrana, enquanto o controle positivo apresentou hemorragias, hiperemia e coagulação.

A formulação de escolha (PLX 16% HPMC 0,4%) e comparação (PLX 4% HPMC 0,7%) apresentadas na tabela acima foram classificadas como praticamente não irritantes. O HPMC já foi visto em outros estudos como não irritante, não-iônico, não-tóxico (Gilani et al. 2022) e com boa capacidade de absorção de água e espessante na formulação (Tundisi et al. 2021). O PLX já foi visto em outras formulações como não irritante (Gratieri et al. 2010).

5.4. Estudos *in vitro* de liberação

O estudo de liberação foi realizado para avaliar o perfil da cinética de liberação do MXS nas formulações derivadas da ASR. Esse processo se refere a migração do ativo no sistema polimérico para o meio de liberação (Langer 1990) em comparação a um controle de solução aquosa contendo MXS a 2%.

O resultado pode ser verificado no gráfico 9 que representa a porcentagem de fármaco que foi recuperado no compartimento receptor em relação à quantidade presente no doador.

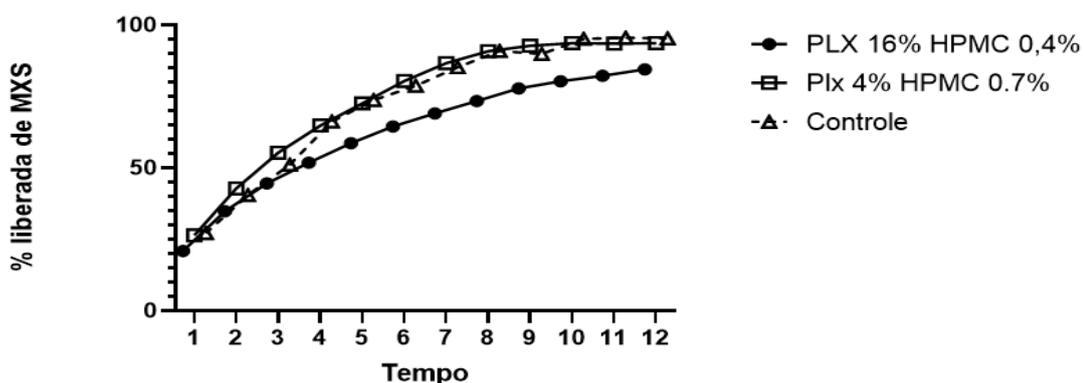


Gráfico 9: Perfil de liberação da formulação PLX 16% HPMC 0,4% (Tabela XX(Caracterização) J) e da formulação de comparação PLX 4% HPMC 0,7 (Tabela XX(Caracterização) J) e controle sendo a solução aquosa de MXS na mesma concentração.

As formulações PLX 16% HPMC 0,4% e PLX 4% HPMC 0,7% não apresentaram diferença estatística em comparação ao controle. Apesar disso, houve diferença na quantidade total entregue por haver uma maior concentração dos polímeros no PLX 16% HPMC 0,4%, ainda que não tenha tido diferença estatística (Gráfico 9).

5.5. Permeação estática

Para verificar a penetração do MXS em pele íntegra foram realizados experimentos de permeação passiva. As amostras ficaram em contato com a pele por 12 horas, então, foram processadas e o fármaco quantificado. Os resultados estão representados no gráfico 10 abaixo:

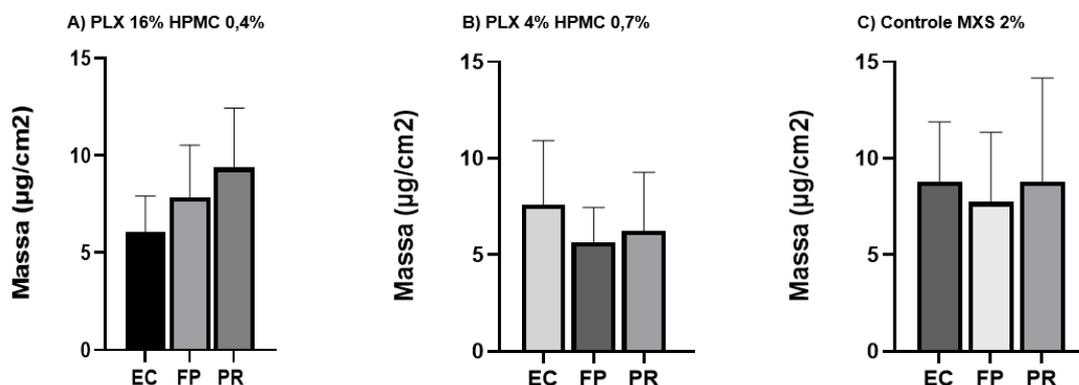


Gráfico 10: Quantidade penetrada em mg/cm² de MXS em pele intacta após 12 horas com

formulação PLX 16% HPMC 0,4 % (gráfico A), PLX 4% HPMC 0,7% (Gráfico B) e o controle em solução com MXS a 2% (Gráfico C). A diferença estatística ($p < 0,05$). EC: estrato córneo; FP: folículo piloso; PR: pele remanescente.

Os estudos de permeação utilizando a célula de Franz modificada junto a pele de orelha de porco é bem difundida por avaliar a permeação de vários fármacos através da pele. A pele da orelha de porco é escolhida por ter similaridade estrutural com a pele humana em termos de densidade folicular; estruturas como células de Langerhans, epitélio estratificado, queratinizado e com múltiplas camadas; além da espessura e arranjo das fibras de colágeno serem similares, proporcionando alto grau de similaridade (Neupane et al. 2020).

A quantidade de MXS penetrada nas camadas da pele (estrato córneo, folículo piloso e pele remanescente) foi mensurada com auxílio da técnica de *tape stripping* diferencial (Teichmann et al. 2005). Além disto, para averiguar se houve permeação para o meio receptor (tampão fosfato a 0,01M, pH 7,4), foram feitas coletas a cada 3 horas ao longo de 12 horas. Não houve detecção do MXS, demonstrando que formulação tem somente ação tópica, ficando retida nas camadas da pele.

Nas formulações avaliadas (PLX 16% HPMC 0,4 % (A), PLX 4% HPMC 0,7% (B) e solução com MXS a 2% (C)) houve diferença estatística ($p < 0,05$) entre a massa recuperada do estrato córneo da amostra A ($6,38 \pm 2,25 \mu\text{g}/\text{cm}^2$), comparado com o estrato córneo da amostra C ($8,80 \pm 2,98 \mu\text{g}/\text{cm}^2$) (Gráfico 10). O MXS se distribui em todas as camadas da pele de forma similar, indicando que não houve diminuição da penetração devido ao aumento da viscosidade frente a temperatura do experimento ($\cong 32^\circ \text{C}$). Este fato pode ser atribuído ao fármaco estar livre tanto nas amostras estudadas quanto está no controle. Também é possível afirmar que o PLX 16% HPMC 0,4% apresenta entrega do MXS em quantidade similar ao controle e podendo ficar mais tempo em contato com o local de ação.

5.6. Permeação Vertical

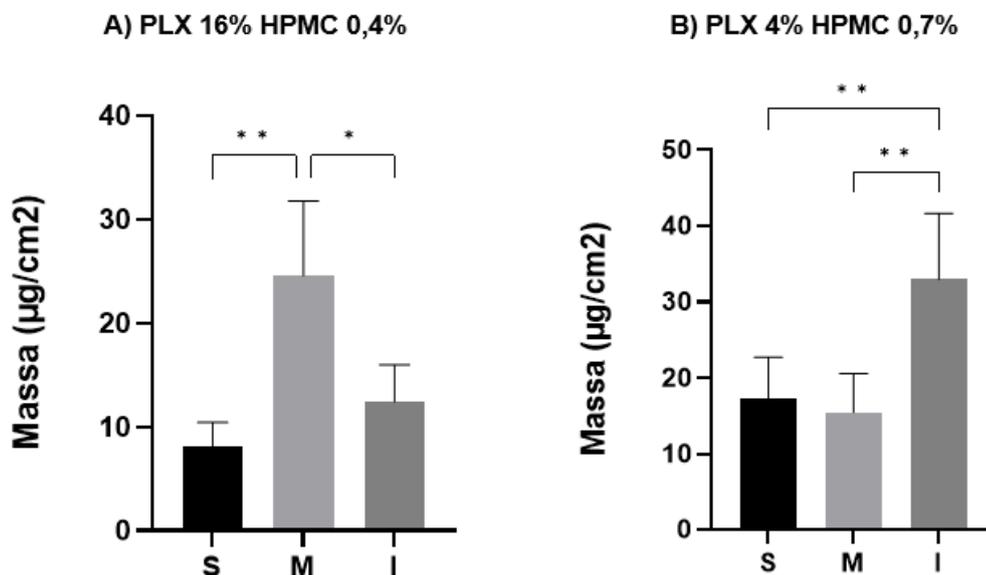


Gráfico 11: Quantidade penetrada em mg/cm² de MXS em pele total no teste de penetração vertical após 12 hora com formulação PLX 16% HPMC 0,4 % MXS 2% (A), PLX 4% HPMC 0,7% (B) com MXS a 2%. A diferença estatística (p<0,05) está demonstrada por "**". Porções da pele total representada por: S: superior; M: médio; I: inferior.

Já é conhecido a capacidade dos fármacos de se difundir vertical e horizontalmente, ainda pouco investigada. Essa difusão pode ocorrer na superfície do estrato córneo, ao longo da bicamada lipídica entre as várias camadas, canais lipolíticos e entre os corneócitos (Figura 15). O estudo desse comportamento auxilia no melhor entendimento do real comportamento do produto em terapias, visto que os estudos usuais de penetração limitam a área de aplicação. A difusão lateral do presente estudo analisou tanto a quantidade de MXS difundido adjacente ao local de interação quanto o seu comportamento ao se posicionar a pele verticalmente, simulando a aplicação nas sobrelhas.

Para entendimento do comportamento do MXS é necessário levar em consideração fatores como o tempo de interação, peso molecular, solubilidade na superfície da pele (LogP) (ou coeficiente de partição), entre outros. Dado que o peso molecular do MXS ser de 289.31 g/mol, este tem a tendência se difundir

lateralmente em comparação a moléculas acima de 300 g/mol (Nguyen et al. 2018b; Schicksnus and Müller-Goymann 2004). Os resultados apresentados no Gráfico 11 para o gel PLX 16% HPMC 0,4% demonstra maior concentração na porção inferior em relação ao superior, ainda que sem diferença estatística ($p < 0.05$), demonstra que o pouco escorrimento do gel não entrega o MXS além da área média (local de aplicação), tornando-o adequado a proposta deste trabalho. Ademais, também houve quantidade penetrada similar ao teste de permeação estática, demonstrando que não houve perda considerável de MXS pela difusão lateral como mencionado por Schicksnus and Müller-Goymann, 2004. Este estudo demonstrou que após atingir a concentração máxima do ibuprofeno na região de aplicação uma redistribuição ocorreu, reduzindo a concentração da área central e aumentando as das áreas próximas em função do tempo (Schicksnus and Müller-Goymann 2004). Complementar a esse estudo, (Carol M. Gee et al. 2014), demonstrou com a mesma substância que em um curto período de tempo há grande difusão lateral e pouca penetração nos primeiros minutos, e, após 6 horas, houve redução da distância e aumento da penetração.

Em contrapartida do comportamento do primeiro gel, o PLX 4% HPMC 0,7%, que apresentou alto escorrimento (Tabela 7) e baixa viscosidade (Gráfico 4), manifestou alta concentração de MXS na área inferior em relação às demais áreas, demonstrando diferença estatística ($p < 0,05$). Este resultado afirma que a capacidade de fixação do gel PLX 16% HPMC 0,4 % é um fator predominante na entrega local.

A solubilidade do MXS, outro importante fator, pode ser explicado pelo seu LogP de 1,24 (DrugBank n.d.). Esse pode justificar a penetração em todas as camadas como representado no Gráfico 11. Ainda assim, é importante salientar que a difusão também ocorre na camada lipídica da pele se aprofundando de camada a camada ao longo dos canais lipídicos, adjacente aos corneócitos (Law and Maibach 2020) (Figura 15). Levando em conta que o valor de logP ideal para difusão lateral é de 3,51, o valor do MXS pode ser considerado bom para se espalhar e penetrar (Gee et al. 2012).

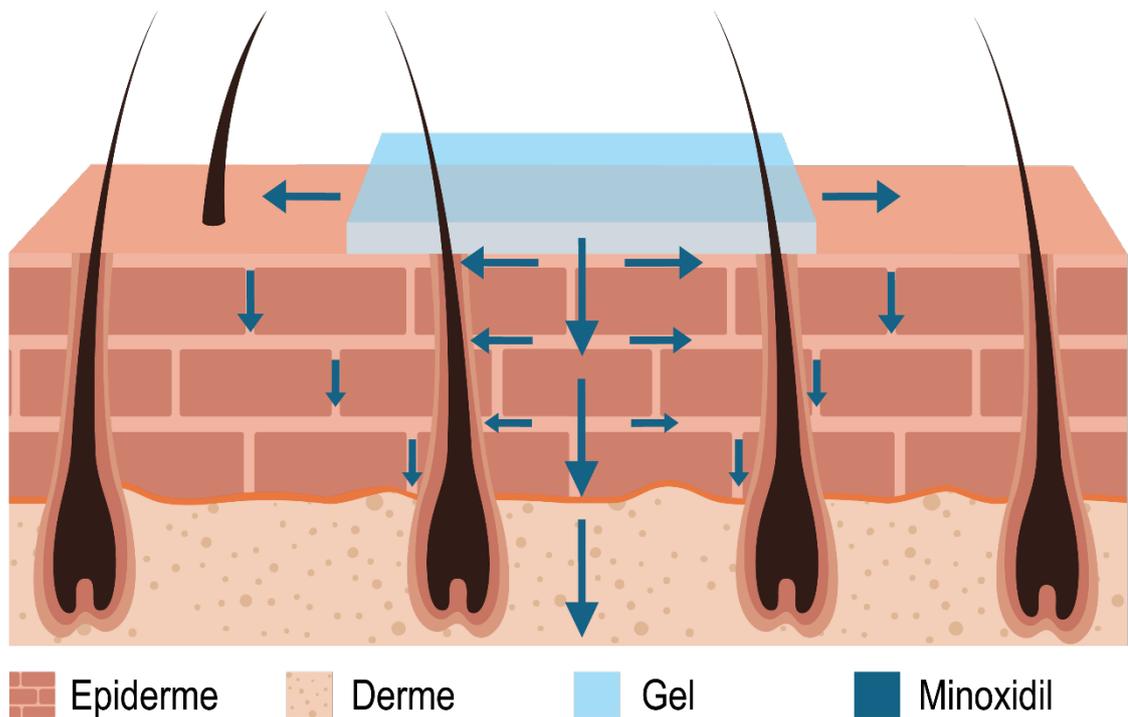


Figura 15: Representação ilustrativa da difusão lateral ao longo do estrato córneo. No modelo, é possível visualizar que a difusão lateral ocorre tanto na superfície quanto entremeio às camadas do estrato córneo (Software: Adobe Illustrator).

Junto aos fatores de influência acima citados há também a topografia superficial da pele, composição da formulação e viscosidade. As topografias das sobrancelhas apresentam vasta quantidade de folículos, que podem servir de reservatório, prolongando o efeito no local desejado (Jacobi et al. 2011). Associando local de aplicação há a composição e viscosidade das fórmulas contendo PLX e HPMC. A presença do propileno glicol na formulação propicia maior penetração do que difusão, trazendo uma melhor no efeito local pela entrega do MXS junto a alta viscosidade da formulação, que também reduz a difusão (Gore, Picard, and Savary 2020; Law and Maibach 2020). Dito isto, a quantidade de fórmula aplicada nos modelos (400 μ L) pode ser representativa na quantidade de MXS penetrada e difundida quando aplicada em toda a área das sobrancelhas (Law and Maibach 2020). Ademais, devido ao modelo vertical representar uma condição real de aplicação, é inviável a utilização da solução com MXS a 2%. Deste modo, pode-se afirmar que o objetivo foi cumprido, dado a quantidade entregue na permeação estática ser similar ao controle e também a permeação vertical.

6. Conclusão

A formulação otimizada sem solvente mostrou excelente eficiência na entrega de MXS ao local de interesse, aumentando a fixação quando em contato com a pele, permitindo um tratamento mais fácil, seguro, sem escorrimento e promissor para a terapia tópica para a perda de pelos das sobrancelhas.

Levando em consideração os obstáculos observados, e a baixa permeação e adesão das formulações clássicas contendo o MX a formulação otimizada cumpriu bem o propósito de se fixar e entregar o MXS nas várias camadas da pele. Logo, a FO permite uma liberação contínua, localizada e segurança em uma região altamente inclinada como as sobrancelhas, sem escorrimento. Isto permite melhor adesão ao tratamento por não irritar a pele. A proposta desse trabalho de utilizar uma formulação semissólida termo sensível como estratégia para fixar a formulação nas sobrancelhas e direcionar o MXS ao local de ação foi cumprida. Ademais, devido ao modelo vertical representar uma condição real de aplicação, é inviável a utilização da solução com MXS a 2%.

A perspectiva para esta formulação é de ser tornar um facilitador de tratamento de queda da sobrancelha, mas não se limitando a ela. É possível utilizar essa formulação em outras regiões altamente inclinadas como a barba ou mesmo no escalpo. Por ser uma formulação hidrofílica e livre de solventes, além de ser constituída principalmente de água, eventos irritativos podem ser menos frequentes.

7. Referências bibliográficas

- Abou-Shamat, Mohamad A., Jesus Calvo-Castro, Jacqueline L. Stair, and Michael T. Cook. 2019. "Modifying the Properties of Thermogelling Poloxamer 407 Solutions through Covalent Modification and the Use of Polymer Additives." *Macromolecular Chemistry and Physics* 220(16).
- Affinisol™. "AFFINISOL™ HPMC HME For Hot Melt Extrusion."
- Ahluwalia, Jusleen, and Sabrina G. Fabi. 2019. "The Psychological and Aesthetic Impact of Age-Related Hair Changes in Females." *Journal of Cosmetic Dermatology* 18(4): 1161–69.
- Almdal, Kristoffer, Jeppe Dyre, Søren Hvidt, and Ole Kramer. 1993. "What Is a 'Gel'?" *Makromolekulare Chemie. Macromolecular Symposia* 76(1): 49–51. <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/masy.19930760107> (June 18, 2022).
- Almeida, Hugo, Maria Helena Amaral, Paulo Lobão, and José Manuel Sousa Lobo. 2014. "In Situ Gelling Systems: A Strategy to Improve the Bioavailability of Ophthalmic Pharmaceutical Formulations." *Drug Discovery Today* 19(4): 400–412.
- Almeida, Hugo, Maria Helena Amaral, Paulo Lobão, and José Manuel Sousa Lobo. 2013. "Applications of Poloxamers in Ophthalmic Pharmaceutical Formulations: An Overview." *Expert Opinion on Drug Delivery* 10(9): 1223–37.
- Anderson, Robert J., Patrick E. Kudlacek, and Dahn L. Clemens. 1998. "Sulfation of Minoxidil by Multiple Human Cytosolic Sulfotransferases." In *Chemico-Biological Interactions*, , 53–67. <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0009279797001208> (November 2, 2020).
- Anumolu, Siva Naga S. et al. 2009. "Design and Evaluation of Novel Fast Forming Pilocarpine-Loaded Ocular Hydrogels for Sustained Pharmacological Response." *Journal of controlled release: official journal of the Controlled*

- Release Society* 137(2): 152–59. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19341773/> (July 14, 2022).
- ANVISA - *Resolução N166 2017*. 2017. http://antigo.anvisa.gov.br/documents/10181/2721567/RDC_166_2017_COM_P.pdf/d5fb92b3-6c6b-4130-8670-4e3263763401 (June 12, 2022).
 - Audickaite, Aiste, Majid Alam, and Francisco Jimenez. 2020. “Eyebrow Hair Transplantation in Frontal Fibrosing Alopecia: Pitfalls of Short- and Long-Term Results.” *Dermatologic surgery: official publication for American Society for Dermatologic Surgery [et al.]* 46(7): 922–25. <https://journals.lww.com/10.1097/DSS.0000000000002207> (September 15, 2020).
 - Bajpai, A. K., Sandeep K. Shukla, Smitha Bhanu, and Sanjana Kankane. 2008. “Responsive Polymers in Controlled Drug Delivery.” *Progress in Polymer Science (Oxford)* 33(11): 1088–1118.
 - Benson, Heather A.E., and Adam C. Watkinson. 2012. *Transdermal and Topical Drug Delivery: Principles and Practice Transdermal and Topical Drug Delivery: Principles and Practice*.
 - Berlin, Alexander, Joel L. Cohen, and David J. Goldberg. 2006. “Calcium Hydroxylapatite for Facial Rejuvenation.” *Seminars in Cutaneous Medicine and Surgery* 25(3): 132–37.
 - Bertoli, Mia J. et al. 2020. “Female Pattern Hair Loss: A Comprehensive Review.” *Dermatologic Therapy* 33(6).
 - Bhupendra C. Patel, and Raman Malhotra. 2020. “Mid Forehead Brow Lift .” <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK535452/?report=classic> (October 3, 2020).
 - Blume-Peytavi, U. et al. 2011. “S1 Guideline for Diagnostic Evaluation in Androgenetic Alopecia in Men, Women and Adolescents.” *British Journal of Dermatology* 164(1): 5–15. <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1365-2133.2010.10011.x>.

- Brown, Thomas M., and Karthik Krishnamurthy. 2020. StatPearls *Histology, Hair and Follicle*. StatPearls Publishing. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30422524> (July 25, 2020).
- Buffoli, Barbara et al. 2014. "The Human Hair: From Anatomy to Physiology." *International Journal of Dermatology* 53(3): 331–41.
- Choi, Nahyun, Soyoung Shin, Sun Song, and Jong-Hyuk Sung. 2018. "Minoxidil Promotes Hair Growth through Stimulation of Growth Factor Release from Adipose-Derived Stem Cells." *International Journal of Molecular Sciences* 19(3): 691. www.mdpi.com/journal/ijms.
- Cohen, Joel L. 2010. "Enhancing the Growth of Natural Eyelashes: The Mechanism of Bimatoprost-Induced Eyelash Growth." *Dermatologic Surgery* 36(9): 1361–71. <https://journals.lww.com/00042728-201009000-00002>.
- Costa, A. 2017. 53 *Journal of Chemical Information and Modeling Tratado Internacional de Cosmecêuticos*. file:///C:/Users/User/Downloads/fvm939e.pdf.
- DrugBank. "Minoxidil Sulfate | DrugBank Online." <https://go.drugbank.com/salts/DBSALT002918> (July 26, 2022).
- Dumortier, G. et al. 1991. "Rheological Study of a Thermoreversible Morphine Gel." *Drug Development and Industrial Pharmacy* 17(9): 1255–65.
- Dutkiewicz, Ewelina P., Hsien-Yi Chiu, and Pawel L. Urban. 2017. "Probing Skin for Metabolites and Topical Drugs with Hydrogel Micropatches." *Analytical Chemistry* 89(5): 2664–70. <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/acs.analchem.6b04276>.
- Fang, Chia-Lang, Ibrahim A Aljuffali, Yi-Ching Li, and Jia-You Fang. 2014. "Delivery and Targeting of Nanoparticles into Hair Follicles." *Therapeutic Delivery* 5(9): 991–1006. <http://www.future-science.com/doi/10.4155/tde.14.61>.
- FDA, and Cder. 2012. *Latisse (Bimatoprost Ophthalmic) Solution Label*. www.fda.gov/medwatch. (September 27, 2020).

- FREITAS, Caio Antony Menezes, and Juliana Frezza Vieira COHEN. 2018. "Fisiopatologia de Alopecia Androgenética: Uma Revisão Da Literatura." *Saber Científico, Porto Velho*. [http://repositorio.saolucas.edu.br:8080/xmlui/bitstream/handle/123456789/2848/Caio%20Antony%20Menezes%20de%20Freitas%20-%20Fisiopatologia%20de%20alopecia%20androgen%C3%A9tica%20uma%20revis%C3%A3o%20de%20literatura.pdf?sequence=1&isAllowed=y#:~:text=Caio%20Antony%20Menezes%20de%20FREITAS1%3B%20Juliana%20Frezza%20Vieira%20COHEN1.&text=RESUMO%3A%20A%20alop%C3%A9cia%20androgen%C3%A9tica%20%C3%A9,por%C3%A9m%2C%20envolvendo%20v%C3%A1rios%20processos%20fisiopatol%C3%B3gicos](http://repositorio.saolucas.edu.br:8080/xmlui/bitstream/handle/123456789/2848/Caio%20Antony%20Menezes%20de%20Freitas%20-%20Fisiopatologia%20de%20alopecia%20androgen%C3%A9tica%20uma%20revis%C3%A3o%20de%20literatura.pdf?sequence=1&isAllowed=y#:~:text=Caio%20Antony%20Menezes%20de%20FREITAS1%3B%20Juliana%20Frezza%20Vieira%20COHEN1.&text=RESUMO%3A%20A%20alop%C3%A9cia%20androgen%C3%A9tica%20%C3%A9,por%C3%A9m%2C%20envolvendo%20v%C3%A1rios%20processos%20fisiopatol%C3%B3gicos.). (August 4, 2022).
- Friedman, Edward S., Paul M. Friedman, David E. Cohen, and Ken Washenik. 2002. "Allergic Contact Dermatitis to Topical Minoxidil Solution: Etiology and Treatment." *Journal of the American Academy of Dermatology* 46(2): 309–12. <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0190962202410067> (October 10, 2020).
- Futterweit, Walter, Andrea Dunaif, Hsu Chong Yeh, and Philip Kingsley. 1988. "The Prevalence of Hyperandrogenism in 109 Consecutive Female Patients with Diffuse Alopecia." *Journal of the American Academy of Dermatology* 19(5 Pt 1): 831–36. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/3192772/> (January 25, 2022).
- Gee, C. M., J. A. Nicolazzo, A. C. Watkinson, and B. C. Finnin. 2012. "Assessment of the Lateral Diffusion and Penetration of Topically Applied Drugs in Humans Using a Novel Concentric Tape Stripping Design." *Pharmaceutical Research* 29(8): 2035–46.
- Gelfuso, Guilherme Martins et al. 2011. "Chitosan Microparticles for Sustaining the Topical Delivery of Minoxidil Sulphate." *Journal of Microencapsulation* 28(7): 650–58. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21824068/> (June 12, 2022).
- Geyfman, Mikhail et al. 2015. "Resting No More: Re-Defining Telogen, the Maintenance Stage of the Hair Growth Cycle." *Biological Reviews* 90(4): 1179–96. <http://doi.wiley.com/10.1111/brv.12151>.

- Gore, Ecaterina, Céline Picard, and Géraldine Savary. 2020. "Complementary Approaches to Understand the Spreading Behavior on Skin of O/W Emulsions Containing Different Emollients." *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 193.
- Gratieri, Taís et al. 2010. "A Poloxamer/Chitosan in Situ Forming Gel with Prolonged Retention Time for Ocular Delivery." *European journal of pharmaceutics and biopharmaceutics: official journal of Arbeitsgemeinschaft fur Pharmazeutische Verfahrenstechnik e.V* 75(2): 186–93. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20188828/> (June 29, 2022).
- Han, Ji Hyun et al. 2004. "Effect of Minoxidil on Proliferation and Apoptosis in Dermal Papilla Cells of Human Hair Follicle." *Journal of Dermatological Science* 34(2): 91–98. <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0923181104000039> (September 14, 2020).
- Harland, Duane P. 2018. "Environment of the Anagen Follicle." In *Advances in Experimental Medicine and Biology*, Springer New York LLC, 97–108. http://link.springer.com/10.1007/978-981-10-8195-8_9 (August 7, 2020).
- Heilmann, S. et al. 2013. "Evidence for a Polygenic Contribution to Androgenetic Alopecia." *British Journal of Dermatology* 169(4): 927–30. <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/bjd.12443> (January 23, 2022).
- Hwang, Kun, and Seong Kyung Yoo. 2016. "Eyebrow Shapes over the Last Century." *Journal of Craniofacial Surgery* 27(8): 2181–84. <http://journals.lww.com/00001665-201611000-00063> (November 20, 2020).
- Jagur-Grodzinski, Joseph. 2010. "Polymeric Gels and Hydrogels for Biomedical and Pharmaceutical Applications." *Polymers for Advanced Technologies* 21(1): 27–47. <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/pat.1504> (July 14, 2022).
- Joodaki, Hamed, and Matthew B. Panzer. 2018. "Skin Mechanical Properties and Modeling: A Review." *Proceedings of the Institution of Mechanical Engineers, Part H: Journal of Engineering in Medicine* 232(4): 323–43.

- K. Akomeah, Franklin. 2010. "Topical Dermatological Drug Delivery: Quo Vadis?" *Current Drug Delivery* 7(4): 283–96.
- Kolliphor®. 2020. "Kolliphor® Poloxamer 407 Geismar." <https://pharma.basf.com/technicalinformation/30631538/kolliphor-p-407-geismar> (July 24, 2022).
- Krtalić, Iva et al. 2018. "D-Optimal Design in the Development of Rheologically Improved In Situ Forming Ophthalmic Gel." *Journal of Pharmaceutical Sciences* 107(6): 1562–71.
- Krug, Cristiane, and Isabel Alves-dos-Santos. 2008. "O Uso de Diferentes Métodos Para Amostragem Da Fauna de Abelhas (Hymenoptera: Apoidea), Um Estudo Em Floresta Ombrófila Mista Em Santa Catarina." *Neotropical Entomology* 37(3): 265–78. http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1519-566X2008000300005&lng=pt&nrm=iso&tlng=pt.
- Kumar, Annapurna, and Kaliaperumal Karthikeyan. 2012. "Madarosis: A Marker of Many Maladies." *International Journal of Trichology* 4(1): 3. [/pmc/articles/PMC3358936/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22111111/) (August 4, 2022).
- Law, Rebecca M., and Howard I. Maibach. 2020. "Lateral Spread and Percutaneous Penetration: An Overview." *International Journal of Pharmaceutics* 588.
- Lee, Dong Hun et al. 2019. "Regional Variation of Human Skin Surface Temperature." *Brief Report* 31(3): 349.
- Lee, Saridpong, Chuchai Tanglertsampan, Mingkwan Tanchotikul, and Nigun Worapunpong. 2014. "Minoxidil 2% Lotion for Eyebrow Enhancement: A Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled, Split-Face Comparative Study."
- LESLIE BAUMANN, SOGOL SAGHARI, and EDMUND WEISBERG. 2009. *2 Cosmetic Dermatology - PRINCIPLES AND PRACTICE*. 2nd ed. McGraw-Hill Companies.

- Li, Tingting et al. 2020. "Mucoadhesive in Situ Forming Gel for Oral Mucositis Pain Control." *International Journal of Pharmaceutics* 580.
- Luepke, N. P. 1985. "Hen's Egg Chorioallantoic Membrane Test for Irritation Potential." *Food and chemical toxicology: an international journal published for the British Industrial Biological Research Association* 23(2): 287–91. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/4040077/> (August 4, 2022).
- Marchi, Francesco, and Albert Newen. 2015. "Cognitive Penetrability and Emotion Recognition in Human Facial Expressions." *Frontiers in Psychology* 6. /pmc/articles/PMC4473593/?report=abstract (October 3, 2020).
- Martel, Julianna L., and Talel Badri. 2019. StatPearls *Anatomy, Hair Follicle*. StatPearls Publishing. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29261946> (July 25, 2020).
- Matos, Breno Noronha, Thaiene Avila Reis, Taís Gratieri, and Guilherme Martins Gelfuso. 2015. "Chitosan Nanoparticles for Targeting and Sustaining Minoxidil Sulphate Delivery to Hair Follicles." *International Journal of Biological Macromolecules* 75: 225–29. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2015.01.036>.
- Mazzuco, Helenice. 2008. "Ovo: Alimento Funcional, Perfeito à Saúde." (2): 12–16.
- "Minoxidil - DrugBank." <https://www.drugbank.ca/drugs/DB00350> (September 14, 2020).
- Nguyen, Hiep X., Ashana Puri, Sonalika Arup Bhattacharjee, and Ajay K. Banga. 2018a. "Qualitative and Quantitative Analysis of Lateral Diffusion of Drugs in Human Skin." *International Journal of Pharmaceutics* 544(1): 62–74. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2018.04.013>.
- ———. 2018b. "Qualitative and Quantitative Analysis of Lateral Diffusion of Drugs in Human Skin." *International journal of pharmaceutics* 544(1): 62–74. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29654897/> (July 26, 2022).

- Norwood, O'tar T. 1975. "Male Pattern Baldness: Classification and Incidence." *Southern medical journal* 68(11): 1359–65. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/1188424/> (January 25, 2022).
- Pandey, Preeti et al. 2017. "Formulation, Functional Evaluation and Ex Vivo Performance of Thermoresponsive Soluble Gels - A Platform for Therapeutic Delivery to Mucosal Sinus Tissue." *European Journal of Pharmaceutical Sciences* 96: 499–507.
- Paradisi, Roberto et al. 2011. "Prospective Cohort Study on the Effects and Tolerability of Flutamide in Patients with Female Pattern Hair Loss." *The Annals of pharmacotherapy* 45(4): 469–75. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21487083/> (June 26, 2022).
- Picardo, Mauro, Monica Ottaviani, Emanuela Camera, and Arianna Mastrofrancesco. 2009. "Sebaceous Gland Lipids." *Dermato-Endocrinology* 1(2): 68–71. [/pmc/articles/PMC2835893/?report=abstract](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21487083/) (August 7, 2020).
- Rivitti, Evandro A. 2005. "Alopecia Areata: A Revision and Update * Alopecia Areata: Revisão e Atualização *." *An Bras Dermatol* 80(1): 57–68.
- van Santvliet, L., and A. Ludwig. 1999. "Influence of the Physico-Chemical Properties of Ophthalmic Viscolysers on the Weight of Drops Dispensed from a Flexible Dropper Bottle." *European journal of pharmaceutical sciences: official journal of the European Federation for Pharmaceutical Sciences* 7(4): 339–45. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9971918/> (May 31, 2022).
- Schicksnus, G., and C.C. Müller-Goymann. 2004. "Lateral Diffusion of Ibuprofen in Human Skin during Permeation Studies." *Skin Pharmacology and Physiology* 17(2): 84–90. <https://www.karger.com/Article/FullText/76018>.
- Siamak Houschyar, Khosrow et al. 2020. "Molecular Mechanisms of Hair Growth and Regeneration: Current Understanding and Novel Paradigms." *Review Article Dermatology* 236: 271–80. [www.karger.com/drm](https://www.karger.com/Article/FullText/76018) (September 15, 2020).
- da Silva, Jéssica Bassi, Michael Thomas Cook, and Marcos Luciano Bruschi. 2020. "Thermoresponsive Systems Composed of Poloxamer 407 and HPMC

- or NaCMC: Mechanical, Rheological and Sol-Gel Transition Analysis.” *Carbohydrate Polymers* 240(March): 116268. <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0144861720304422> (November 9, 2020).
- Soliman, Karim A. et al. 2019. “Poloxamer-Based in Situ Gelling Thermoresponsive Systems for Ocular Drug Delivery Applications.” *Drug Discovery Today* 24(8): 1575–86.
 - de Souza Ferreira, Sabrina Barbosa et al. 2017. “Linear Correlation between Rheological, Mechanical and Mucoadhesive Properties of Polycarbophil Polymer Blends for Biomedical Applications.” *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials* 68: 265–75.
 - Standing, Susan. 2016. *Anatomy GRAY’S. The Anatomical Basis of Clinical Practice*. 41st ed. eds. Neel Anand et al.
 - Starace, Michela, Gloria Orlando, Aurora Alessandrini, and Bianca Maria Piraccini. 2020. “Female Androgenetic Alopecia: An Update on Diagnosis and Management.” *American Journal of Clinical Dermatology* 21(1): 69–84. <https://doi.org/10.1007/s40257-019-00479-x>.
 - Stoehr, Jenna R., Jennifer N. Choi, Maria Colavincenzo, and Stefan Vanderweil. 2019. “Off-Label Use of Topical Minoxidil in Alopecia: A Review.” *American Journal of Clinical Dermatology* 20(2): 237–50. <https://doi.org/10.1007/s40257-018-0409-y>.
 - Suchonwanit, Poonkiat, and Sasima Thammarucha. 2020. “Eyebrow Growth Pattern Analysis in Patients with Eyebrow Hypotrichosis after Receiving Topical Treatment: A Retrospective Study.” *Journal of Cosmetic Dermatology* 19(6): 1404–8. <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/jocd.13167> (July 23, 2020).
 - Suchonwanit, Poonkiat, Sasima Thammarucha, and Kanchana Leerunyakul. 2019. “Minoxidil and Its Use in Hair Disorders: A Review.” *Drug Design, Development and Therapy* Volume 13: 2777–86. [/pmc/articles/PMC6691938/?report=abstract](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/36691938/) (August 24, 2020).

- Teichmann, Alexa et al. 2005. "Differential Stripping: Determination of the Amount of Topically Applied Substances Penetrated into the Hair Follicles." *Journal of Investigative Dermatology* 125(2): 264–69.
- Velez, Nicole, Pooja Khera, and Joseph C English. 2007. "Eyebrow Loss." *American Journal of Clinical Dermatology* 8(6): 337–46. <http://www.bmj.com/cgi/doi/10.1136/bmj.325.7362.475>.
- Vlaia, Lavinia et al. 2016. "Cellulose-Derivatives-Based Hydrogels as Vehicles for Dermal and Transdermal Drug Delivery." *Emerging Concepts in Analysis and Applications of Hydrogels*.
- Weaver, Lucy G., Regine Stockmann, Almar Postma, and San H. Thang. 2016. "Multi-Responsive (Diethylene Glycol)Methyl Ether Methacrylate (DEGMA)-Based Copolymer Systems." *RSC Advances* 6(93): 90923–33. <https://pubs.rsc.org/en/content/articlehtml/2016/ra/c6ra14425j> (July 27, 2022).
- Williamson, D., M. Gonzalez, and A. Y. Finlay. 2001. "The Effect of Hair Loss in Quality of Life." *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology* 15(2): 137–39. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11495520/> (September 18, 2020).
- Xu, Dazhong, Ling Wang, Wei Dai, and Luo Lu. 1999. "A Requirement for K⁺-Channel Activity in Growth Factor-Mediated Extracellular Signal-Regulated Kinase Activation in Human Myeloblastic Leukemia ML-1 Cells." *Blood* 94(1): 139–45.
- Xu, Xue Gang, and Hong Duo Chen. 2018. "Prostanoids and Hair Follicles: Implications for Therapy of Hair Disorders." *Acta Dermato-Venereologica* 98(3): 318–23.
- York, Katherine, Nekma Meah, Bevin Bhojrul, and Rodney Sinclair. 2020. "A Review of the Treatment of Male Pattern Hair Loss." *Expert Opinion on Pharmacotherapy* 21(5): 603–12. <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/14656566.2020.1721463> (November 2, 2020).