

BRENO NORONHA MATOS

**DESENVOLVIMENTO DE UMA FORMULAÇÃO TÓPICA CONTENDO
NANOPARTÍCULAS DE QUITOSANA COMO ESTRATÉGIA PARA AUMENTAR A
PENETRAÇÃO FOLICULAR DO MINOXIDIL SULFATO NO TRATAMENTO DA
ALOPECIA ANDROGÊNICA**

BRASÍLIA

2014

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

Desenvolvimento de uma formulação tópica contendo nanopartículas de quitosana como estratégia para aumentar a penetração folicular de minoxidil sulfato no tratamento da alopecia androgênica

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da UnB para obtenção do Título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Área de Concentração: Medicamentos e Cosméticos.

Orientado: Breno Noronha Matos

Orientador: Prof. Dr. Guilherme M. Gelfuso

Brasília, Distrito Federal – 2014

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

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Central da Universidade de Brasília. Acervo 1014867.

Matos, Breno Noronha.
M433d Desenvolvimento de uma formulação tópica contendo nanopartículas de quitosana como estratégia para aumentar a penetração folicular de minoxidil sulfato no tratamento da alopecia androgênica / Breno Noronha Matos. -- 2014. ix, 58 f. : il. ; 30 cm.

Dissertação (mestrado) - Universidade de Brasília, Faculdade de Ciências da Saúde, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, 2014.

Inclui bibliografia.

Orientação: Guilherme Martins Gelfuso.

1. Calvície - Tratamento. 2. Medicamentos. I. Gelfuso, Guilherme Martins. II. Título.

CDU 615.1

Breno Noronha Matos

Desenvolvimento de uma formulação tópica contendo nanopartículas de quitosana como estratégia para aumentar a penetração folicular de minoxidil sulfato no tratamento da alopecia androgênica.

Aprovada em 24 de fevereiro de 2014.

Banca Examinadora

Prof. Dr. Guilherme Martins Gelfuso – Universidade de Brasília

Prof.^a Dr.^a Taís Gratieri – Universidade de Brasília

Prof.^a Dr.^a Zulmira Guerrero Marques Lacava – Universidade de Brasília

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Helena e Claudio, por todo suporte, incentivo, e principalmente apoio incondicional em todas as minhas decisões.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Guilherme Gelfuso, que sempre incentivou nossa independência e poder de decisão, porém sempre presente em cada decisão e orientando de maneira sábia, paciente e educada.

Às minhas tias pesquisadoras, Eliane, Elza e Élide que sempre foram um exemplo a ser seguido. À minha madrinha, Eleusa, meus amigos e irmãos, que sempre me ouviram e aconselharam em momentos difíceis.

A todos os técnicos de laboratórios, que sempre nos atenderam de forma educada e solícita, mas principalmente à Eveline, Seu Carlos e Vanessa do laboratório de Ensino de Práticas de Farmácia e à Patrícia e Michele do laboratório de Controle de Qualidade de Medicamentos.

A todos os professores que de alguma forma contribuíram para o meu aprendizado, principalmente a Prof^a Dr.^a Taís Gratieri. A Iris e Kirla, secretárias do programa de pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, que sempre nos ajudaram e resolveram nossos problemas de forma eficiente. A Prof^a Dr.^a Maria de Fátima Borin por ser a mais dedicada e amável Coordenadora que podia existir.

Aos laboratórios de Microscopia Eletrônica e de Genética e Morfologia do IB, por gentilmente nos deixar usar equipamentos essenciais para o desenvolvimento desse trabalho.

A todos os alunos de IC e estagiários que me ajudaram em alguns experimentos, e em especial, à minha colega de laboratório, e hoje amiga, Thaiene, que sempre proativa me ajudou a conduzir vários experimentos, com sua ajuda à realização desse trabalho se tornou possível.

A Coordenação de Apoio a Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão de bolsa de mestrado no país.

RESUMO

Esse trabalho pretendeu desenvolver nanopartículas para incorporar o minoxidil sulfato (MXS) como estratégia para direcionar e sustentar a liberação do MXS para o seu local de ação, o folículo piloso, aumentando a eficácia e comodidade do tratamento tópico da alopecia. Um método analítico de quantificação do MXS foi validado por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), segundo os parâmetros de linearidade, especificidade/seletividade, precisão, exatidão e limite de quantificação, preconizados pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). O método mostrou-se linear, seletivo, preciso e exato entre as concentrações de 0,5 µg/mL a 3,0 µg/mL. As nanopartículas de quitosana contendo o MXS foram obtidas pela técnica de geleificação ionotrópica, variando a concentração da solução inicial de quitosana, a concentração da solução do agente reticulante, tripolifosfato (TTP), e a proporção volumétrica da solução do polímero em relação à solução de TPP. Para garantir a melhor eficiência de encapsulação do fármaco foram obtidas nanopartículas alterando-se as proporções adicionadas de MXS em relação ao polímero. As melhores condições para preparo das nanopartículas deu-se quando uma solução de quitosana a 1,75 mg/mL foi adicionada de uma solução de TPP a 1,0 mg/mL numa proporção volumétrica de 5:2. As nanopartículas apresentaram diâmetro médio de $271,72 \pm 59,46$ nm, índice de polidispersividade (PDI) igual a $0,3 \pm 0,06$, forma esférica, e potencial zeta de $+46,16 \pm 6,72$ mV. A melhor proporção de polímero/fármaco foi a de 1:1, que apresentou eficiência de encapsulação de $73 \pm 0,29$ %, diâmetro médio de partículas igual a $235,5 \pm 99,92$ nm, e forma esférica. As suspensões de nanopartículas contendo o fármaco foram geleificadas com a incorporação de 0,5% (m/v) de Carbopol e sua liberação e permeação cutânea foi verificada *in vitro*, utilizando células de difusão montadas com membrana hidrofílica de acetato de celulose e orelha de porco, respectivamente. O fluxo de liberação foi determinado durante 12 h, e mostraram que as nanopartículas foram capazes de **reduzir** a liberação do fármaco em aproximadamente 5 vezes se comparado à difusão dele a partir de uma solução controle através da mesma membrana, sejam elas incorporadas em um gel ou suspensas em veículo aquoso. A permeação do fármaco através da pele foi analisada *in vitro* nos tempos de 3h, 6h, 9h e 12 h, com quantificação seletiva do MXS retido no estrato córneo (EC), folículos pilosos, e epiderme viável+derme (EP). As nanopartículas mostraram ser capazes de direcionar o MXS para os folículos pilosos, aumentando a sua retenção cerca de 1,38 vezes já na terceira hora de estudo e cerca de 2,06 vezes a partir da sexta hora de experimento quando comparado à penetração folicular do fármaco a partir da solução controle. Além disso, a concentração de fármaco no folículo permaneceu constante pelo menos até a décima segunda hora de experimento quando ele estava em sua forma nanoencapsulada. A formulação na forma de gel retardou a interação das partículas com o folículo piloso, restringindo sua ação carreadora. O sistema contendo as nanopartículas de quitosana carreando o MXS, portanto, mostrou-se como uma boa alternativa para a administração tópica do fármaco no tratamento da alopecia, pois foi capaz de promover uma liberação progressiva do fármaco e direcionada para os folículos pilosos.

Palavras chave: Alopecia Androgênica; Nanopartículas; Quitosana; Minoxidil Sulfato.

ABSTRACT

This work aimed to develop nanoparticles to incorporate minoxidil sulphate (MXS) as a strategy to target and sustain the release of the MXS to its site of action, the hair follicle, thus increasing the effectiveness and convenience of the topical treatment of alopecia. An analytical method for quantification of the MXS was validated by liquid chromatography (HPLC) according to the parameters of linearity, specificity/selectivity, precision, accuracy and limit of quantification, recommended by the Brazilian National Health Surveillance Agency (ANVISA). The method was linear, selective, precise and accurate between the concentrations of 0.5 $\mu\text{g/mL}$ to 3.0 $\mu\text{g/mL}$. The chitosan nanoparticles containing MXS was obtained by the ionotropic gelation technique, varying the initial concentration of the chitosan solution, the concentration of the crosslinking agent tripolyphosphate (TTP), and the volumetric proportion of the polymer solution in relation to the solution of TPP. To ensure the best encapsulation efficiency of the drug into the nanoparticles, they were obtained by changing the proportions added of MXS in relation to that of polymer. The best conditions for preparation of the nanoparticles occurred when a solution of chitosan at 1.75 mg/mL was added to a 1.0 mg/mL TPP solution in a volumetric ratio of 5:2. The nanoparticles had an average diameter of $271.72 \pm 59,46$ nm, polydispersity index (PDI) equal to $0.3 \pm 0,06$, spherical shape and zeta potential of $+46.16 \pm 6,72$ mV. The best ratio of polymer/drug was 1:1, (m/m) which showed encapsulation efficiency of $73 \pm 0,29$ %, average particle diameter equal to $235.5 \pm 99,92$ nm and spherical shape. The suspensions of nanoparticles containing the drug were formulated as a hydrogel with the incorporation of 0.5% (w/v) Carbopol and its release rate and skin permeation was verified *in vitro* using diffusion cells fitted with hydrophilic membrane of cellulose acetate and porcine ear skin, respectively. The release flux was determined for 12 h for all formulations, and it was showed that the nanoparticles were able to reduce drug release in about 5-fold if compared to the diffusion of MXS from the control solution through the same membrane; either the drug incorporated into a gel or suspended in an aqueous vehicle. The permeation of the drug through the skin was examined *in vitro* in periods of 3h, 6h, 9h and 12h, with selective quantification of MXS retained in the stratum corneum (SC), hair follicles, and viable epidermis + dermis (EP). The nanoparticles were shown to be able to target the MXS to the hair follicles, increasing its retention about 1.38-fold already in the third hour of study and about 2.06-fold from the sixth hour of the experiment when compared to follicular penetration of the drug from the control aqueous solution. In addition, the drug concentration in the follicle remained constant at least until the twelfth hour of the experiment when the nanoencapsulated drug was applied on skin. The formulation in the gel form delayed the interaction of particles with the hair follicle, restricting its target action. The system containing chitosan nanoparticles loading the MXS therefore proved to be a good alternative for topical administration of the drug in the treatment of alopecia because it was able to promote a progressive drug release and targeted the MXS to the hair follicles.

Keywords: Androgenic Alopecia, Nanoparticles, Chitosan, Minoxidil Sulphate..

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Camadas da pele: epiderme, derme e hipoderme.....	3
Figura 2. Camadas da epiderme: estrato córneo (EC), estrato granuloso, estrato espinoso e estrato basal	4
Figura 3. Estrutura anatômica de uma unidade pilosebácea	5
Figura 4. Ciclo de crescimento do pelo: a) Fase de anagênese VI, b) Fase de catagênese, c) Fase de telogênese, d) Desprendimento do pelo.....	6
Figura 5. Fórmula estrutural da Finasterida	8
Figura 6. Fórmula estrutural do MXS, pH: 3-5 (Peso Molecular: 516,58 Da).....	10
Figura 7. Vias de permeação de fármacos pela pele: via transcelular e via intercelular	10
Figura 8. Micropartículas entram seletivamente pelo folículo e controlam a liberação do fármaco no local de ação	11
Figura 9. Mecanismo proposto para a liberação folicular de fármacos a partir de nanopartículas.....	14
Figura 10. Processo de retirada da pele da orelha do porco	16
Figura 11. Célula de difusão do tipo Franz modificada montada para realização dos estudos <i>in vitro</i> de liberação.	22
Figura 12. Célula de Franz modificada com a pele de orelha de porco separando o compartimento doador do compartimento receptor.	24
Figura 13. Pedacos de pele de orelha após a perfusão do fármaco: A) Área de perfusão após o <i>tape stripping</i> para a retirada do EC e B) Área de perfusão após a biópsia com cola de cianoacrilato para remoção dos folículos pilosos da pele.....	25
Figura 14. Espectro de absorção na região do UV/Vis de uma solução de MXS em metanol a 100 µg/mL. Faixa de varredura: 200 a 700 nm.	27
Figura 15. Representação gráfica da curva analítica obtida para o MXS por CLAE. Concentrações diluídas em metanol	28
Figura 16. Representação gráfica da curva analítica obtida para o MXS por CLAE. Concentrações diluídas em tampão fosfato 0,01M.....	28
Figura 17. Cromatograma referente à injeção de uma solução de MXS (3,0 µg/mL) em metanol.	30
Figura 18. Cromatograma referente à injeção de uma solução de MXS (3,0 µg/mL) em tampão fosfato 0,01M.....	31

- Figura 19.** Cromatograma referente à injeção de metanol. 31
- Figura 20.** Cromatograma referente à injeção de tampão fosfato. 31
- Figura 21.** Cromatograma referente à injeção da solução metanólica da suspensão de nanopartículas de quitosana..... 32
- Figura 22.** Cromatograma referente à injeção da solução metanólica da pele da orelha de porco. 32
- Figura 23.** Zona opaca de formação de nanopartículas: A) Solução de quitosana (1,75 µg/mL) antes da adição do TPP e B) Suspensão de nanopartículas formada após a adição do TPP. 36
- Figura 24.** Fotomicrografia obtida por microscopia eletrônica de varredura (MEV JOEL Modelo JSM-700IF) em aumento: A) 1700 vezes B) 4000 vezes, C) 40.000 vezes e D) 45.000 para as nanopartículas de quitosana..... 38
- Figura 25.** Fotomicrografia obtida por microscopia eletrônica de varredura (MEV JOEL Modelo JSM-700IF) em aumento: A) 23.000 vezes e B) 4000 para as nanopartículas de quitosana e MXS encapsulado na proporção 1:1..... 39
- Figura 26.** Fotografia dos géis, todos em pH 5,5 contendo as nanopartículas de quitosana encapsulando o MXS: A) 0,5% de Carbopol B) 1,0% de Carbopol e C) 1,5% de Carbopol. 39
- Figura 27.** Perfis de liberação do MXS a partir da formulação NQ-MXS contendo 1,75 µg/mL do fármaco, pH 5,5 em comparação a uma solução aquosa do fármaco contendo a mesma concentração de MXS e mesmo pH. 40
- Figura 28.** Perfis de liberação do MXS a partir da formulação gel-NQ-MXS contendo 1,75 µg/mL do fármaco, pH 5,5 em comparação ao gel da solução aquosa do fármaco contendo a mesma concentração de MXS e mesmo pH. 41
- Figura 29.** Perfis de liberação do MXS a partir da formulação NQ-MXS e gel-NQ-MXS contendo 1,75 µg/mL do fármaco, pH 5,5 em comparação a solução do aquosa d fármaco e ao gel da solução aquosa do fármaco contendo a mesma concentração de MXS e mesmo pH. 41
- Figura 30.** Quantidade de MXS recuperada dos folículos pilosos após 3h, 6h, 9h e 12 h de aplicação passiva das formulações NQ-MXS e gel-NQ-MXS, pH 5,5, e seus respectivos controles..... 45
- Figura 31.** Quantidade de MXS retida EC em 3h, 6h, 9h e 12 h de permeação passiva, a partir das formulações NQ-MXS e gel-NQ-MXS, pH 5,5 e seus controles. 47
- Figura 32.** Quantidade de MXS retida EP em 3h, 6h, 9h e 12 h de permeação passiva, a partir das formulações NQ-MXS e gel-NQ-MXS, pH 5,5 e seus controles. 48

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1.** Quantidade de fármaco (MXS) e polímero (quitosana) por 20 mL de solução utilizados na obtenção das nanopartículas..... 20
- Tabela 2.** Análise da precisão e da exatidão intracorrida e intercorrida do método de quantificação para o MXS diluído em metanol..... 29
- Tabela 3.** Análise da precisão e da exatidão intracorrida e intercorrida do método de quantificação para o MXS diluído em tampão fosfato 0,01 M. 29
- Tabela 4.** Dados para determinação do Limite de Quantificação do método de quantificação para o MXS diluído em metanol..... 33
- Tabela 5.** Dados para determinação do Limite de Quantificação do método de quantificação para o MXS diluído em tampão fosfato 0,01 M. 33
- Tabela 6.** Coeficiente de solubilidade do MXS em água mili-Q à temperatura ambiente34
- Tabela 7.** Tamanho médio (nm), potencial zeta (mV) e PDI referentes às nanoparticulas de quitosana (NQ) nas concentrações de quitosana 1,75 mg/mL e TPP 1,0 mg/mL..... 35
- Tabela 8.** Tamanho médio (nm), PDI, potencial zeta e eficiência de encapsulação de três amostras (NQ1, NQ2 e NQ3) nas proporções de polímero/fármaco (1:1; 1:2 e 1:3)..... 37
- Tabela 9.** Fluxos de liberação do MXS ($\mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}$) a partir das formulações NQ-MXS e gel-NQ-MXS quando comparados aos seus respectivos controles. 42
- Tabela 10.** Porcentagem de recuperação do MXS do EC utilizando metanol como solvente extrator..... 43
- Tabela 11.** Porcentagem de recuperação do MXS da EP utilizando metanol como solvente extrator..... 43
- Tabela 12.** Porcentagem de recuperação do MXS do folículo piloso utilizando metanol como solvente extrator..... 43

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
CV	Coefficiente de Variação
DHT	Dihidrotestosterona
EC	Etrato Córneo
EE	Eficiência de Encapsulação
EP	Epiderme + Derme
FDA	Food and Drugs Administration
LQ	Limite de Quantificação
MEV	Microscopia Eletrônica de Varredura
MX	Minoxidil
MXS	Minoxidil Sulfato
IPD	Índice de Polidispersão
PLGA	Poli Láctida-co-glicolida

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
2. OBJETIVOS	2
2.1. Objetivos específicos	2
3. REVISÃO DE LITERATURA	3
3.1 Pele e anexos cutâneos	3
3.2 Alopecia androgênica	6
3.3 Tratamentos para a alopecia	7
3.3.1 Finasterida	7
3.3.2. Minoxidil (MX)	8
3.4 Vias de permeação epidérmica e transfolicular de fármacos	10
3.5 Nanopartículas poliméricas para aplicação tópica.....	12
4. MATERIAL E MÉTODOS	16
4.1 Determinação do comprimento de onda de absorção máxima do MXS	17
4.2 Método analítico para quantificação do MXS permeado e recuperado da pele ...	17
4.3 Validação do método analítico para quantificação do MXS.....	17
4.4 Determinação do coeficiente de solubilidade do MXS	19
4.5 Obtenção das nanopartículas	19
4.6 Caracterização das nanopartículas.....	20
4.6.1. Tamanho de partícula e Potencial Zeta	20
4.6.2. Morfologia	21
4.6.3. Eficiência de encapsulação.....	21
4.7 Obtenção de formulações hidrofílicas contendo as nanopartículas com MXS	21
4.8 Estudo in vitro de liberação do MXS a partir da suspensão de nanopartículas (NQ-MXS) e gel desenvolvido contendo nanopartículas de MXS (gel-NQ-MXS)	22
4.8.1 Determinação da quantidade de fármaco liberado	23
4.9 Estudos de recuperação do MXS do estrato córneo (EC), da epiderme (EP) e do folículo piloso	23
4.10 Permeação cutânea in vitro do MXS a partir da NQ-MXS e do gel hidrofílico desenvolvido.....	23
4.11 Determinação da quantidade de MXS retido no EC, EP e no folículo piloso – Tape stripping diferencial.....	24
4.12 Análise dos dados	25
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	26
5.1 Determinação do comprimento de absorção de máxima absorção para o MXS ..	26
5.2 Método analítico para quantificação do MXS permeado e recuperado da pele ...	27
5.1.1 Linearidade	27
5.1.2 Precisão e Exatidão.....	28
5.1.4 Especificidade/Seletividade.....	29
5.1.5 Limite de quantificação	32
5.2 Determinação do coeficiente de solubilidade do MXS	33
5.3 Obtenção de nanopartículas.....	34
5.3.1 Tamanho de partícula e Potencial Zeta	35
5.3.2 Eficiência de Encapsulação	37
5.3.3 Morfologia das Nanopartículas	37
5.4 Obtenção de formulações hidrofílicas contendo as nanopartículas de quitosana com MXS encapsulado.....	39
5.5 Estudos de recuperação do MXS do estrato córneo (EC), dos folículos pilosos e da epiderme viável+derme (EP).....	39

5.6 Estudo in vitro de liberação do MXS a partir da NQ-MXS e do gel-NQ-MXS...	39
5.7 Determinação do fluxo de permeação passiva do MXS a partir da NQ-MXS e do gel-NQ-MXS	44
6. CONCLUSÕES	49
6.1 Conclusões parciais	49
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	50

1. INTRODUÇÃO

Alopecia é o nome dado à queda de cabelos e/ou pelos em determinadas áreas do corpo ou de todo o corpo. A alopecia é classificada em: alopecia androgênica, alopecia quimioterápica e alopecia areata, dependendo das causas de seu aparecimento (GELFUSO et al., 2011). A alopecia androgênica, também conhecida como alopecia hereditária ou calvície masculina, é a causa mais frequente de perda de cabelos em humanos e seu aparecimento está relacionado a fatores genéticos e hormonais (BIENOVÁ et al., 2005).

O tratamento tópico clássico contra a alopecia androgênica é feito aplicando-se uma formulação contendo o fármaco minoxidil (MX). O MX atua diretamente sobre os folículos capilares ativando canais de potássio ATPase (SHORTER, 2008), além de favorecer a irrigação sanguínea local (BUHL et al., 1990), aumentando assim o tempo da fase de crescimento capilar, a chamada fase anagênica (MESSENGER e RUNDERGREN, 2004; ROGERS e AVRAM, 2008).

A forma sulfatada do MX, o minoxidil sulfato (MXS, Figura 6), vem sendo utilizada magistralmente para o tratamento tópico da calvície, pois além de mais hidrossolúvel que o MX, o que facilita bastante sua manipulação farmacotécnica, é o sulfoconjugado ativo do MX, o principal responsável pelos efeitos farmacológicos deste fármaco na pele. No folículo, as moléculas de MX são metabolizadas em MXS pela atividade de uma fenolsulfotransferase, a qual está presente em maior quantidade no folículo piloso do que na epiderme e derme (BUHL et al., 1990; KUDLACEK et al., 1995).

As formulações clássicas contendo o MX, no entanto, não são capazes de liberar quantidades suficientes do fármaco em seu local de ação, ou seja, nos folículos pilosos, fazendo com que o paciente tenha de aplicá-las mais de uma vez ao dia (BULASMED, 2014) para assegurar o seu efeito do medicamento, o que causa incômodo e atrapalha o sucesso da terapia. Logo, uma formulação que permitisse uma liberação do fármaco direcionada ao folículo piloso e permitisse uma liberação contínua dele (i) seria mais vantajoso e cômodo para o paciente, (ii) flexibilizaria o esquema terapêutico proposto aumentando a adesão do paciente à terapia, (iii) asseguraria que quantidades terapêuticas do fármaco atingiriam seu local de ação, e tudo isso contribuiria para o sucesso da terapia tópica com este fármaco. Em vista disso, este trabalho propõe a nanoencapsulação do MXS com o polímero quitosana e a incorporação destas nanopartículas em uma formulação semi-sólida como estratégia tanto para direcionar o fármaco ao local de ação, quanto para sustentar a sua liberação por períodos mais longos após a aplicação do produto.

2. OBJETIVOS

Este trabalho tem como objetivo desenvolver e caracterizar uma formulação tópica contendo nanopartículas de quitosana encapsulando o MXS e avaliar a sua capacidade em direcionar e sustentar a liberação do fármaco para os folículos pilosos, buscando uma terapia tópica mais eficiente no tratamento da alopecia androgênica.

2.1. Objetivos específicos

- Padronizar e validar um método analítico seletivo para doseamento do MXS;
- Determinar a solubilidade aquosa do fármaco em estudo;
- Obter nanopartículas de quitosana contendo o MXS;
- Caracterizar nanopartículas quanto ao tamanho, potencial zeta, morfologia e eficiência de encapsulação;
- Obter uma formulações contendo as nanopartículas de MXS;
- Avaliar *in vitro* a cinética de liberação do MXS a partir das formulações desenvolvidas;
- Estudar *in vitro* a permeação e retenção cutânea e folicular do MXS a partir das formulações estudadas.

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Pele e anexos cutâneos

A pele apresenta uma área total de 2.500 cm², no nascimento, e de 18.000 cm² a 25.000 cm² em um ser humano adulto. Sua espessura pode variar de 1,5 mm a 4 mm, sendo composta por diferentes tipos celulares e estruturas. As diferentes áreas do organismo são recobertas por peles com características diversificadas, observando-se variações na espessura das camadas e na quantidade e no tipo de anexos cutâneos na região (HARRIS, 2009). A pele é formada por três camadas, a epiderme, a derme e a hipoderme (Figura 1) (BOUWSTRA et al., 2003; HARRIS, 2009).

A epiderme é a camada mais externa da pele, compactada e impermeável, perfurada apenas por poros dos folículos pilosebáceos e das glândulas sudoríparas, que se originam na derme, mas que são consideradas apêndices da epiderme. A epiderme não apresenta rede vascular, sendo nutrida pela difusão dos nutrientes oriundos da derme por capilaridade. A derme suporta a epiderme e é composta por tecidos conectivos fibrosos de elastina e colágeno. A hipoderme é constituída por um tecido adiposo, ricamente servido por nervos e vasos sanguíneos. O tecido adiposo está envolvido na regulação da temperatura, provisão de energia, proteção e suporte, funcionando também como depósito nutricional (BOUWSTRA et al., 2003 ; HARRIS, 2009).

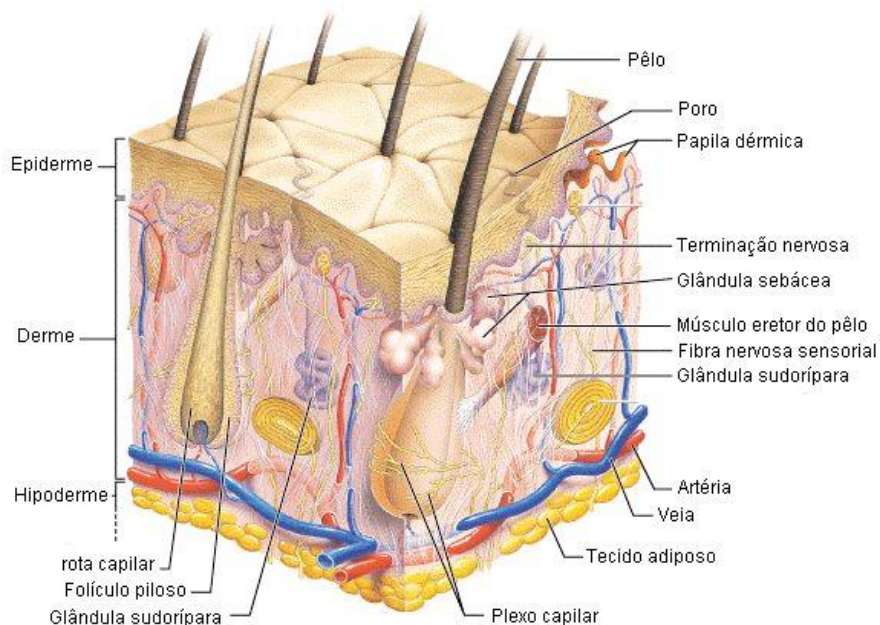


Figura 1. Camadas da pele: epiderme, derme e hipoderme (adaptado de <http://www.bioaula.loja.ghi.com.br>).

A proteção da pele é primariamente conferida pelo estrato córneo (EC). Esta camada superficial da epiderme, com somente 10 μm a 15 μm de espessura, é a primeira barreira à absorção percutânea de substâncias, assim como contra a perda de água pelo organismo. Abaixo do EC está a epiderme viável (de 50 μm a 100 μm de espessura), que é responsável pela geração do EC (BOUWSTRA et al., 2003).

A epiderme viável é um epitélio estratificado composto principalmente pelas camadas basal, espinhosa e granular (Figura 2). A camada basal da epiderme é constituída por células matrizes proliferativas, que são células germinativas. A cada mitose aproximadamente 50% dessas células contribuem para a renovação da epiderme. Os queratinócitos que compõem a camada basal são células alongadas, alinhadas perpendicularmente à membrana basal. Nessa camada, ainda existem outros tipos celulares, como por exemplo, os melanócitos, responsáveis pela pigmentação da pele, células de Langerhans, que atuam na defesa imunológica da pele e células de Merkel, atuando como receptores mecânicos na percepção tátil (HARRIS, 2009).

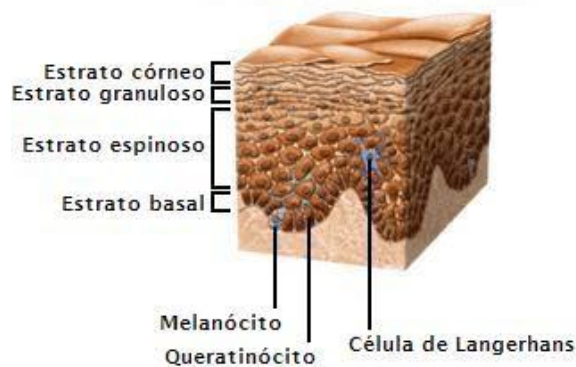


Figura 2. Camadas da epiderme: estrato córneo (EC), estrato granuloso, estrato espinoso e estrato basal (adaptado de <http://www.bioaula.loja.ghi.com.br>).

A camada espinhosa é composta por células poligonais. Nesse estágio inicia-se o processo de queratinização. Já o estrato granuloso é composto por uma rica presença de grânulos de queratina nas células. Após a maturação das células granulosas, há perda do núcleo e achatamento dos queratinócitos, com formação de placas de queratina. Os queratinócitos sintetizam e expressam diferentes proteínas e lipídios estruturais durante sua maturação. As últimas sequências de diferenciação dos queratinócitos estão associadas a mudanças profundas em sua estrutura, transformando-os nas escamas cornificadas física e quimicamente resistentes do EC, os corneócitos (HARRIS, 2009).

Os anexos epidérmicos, também denominados de anexos cutâneos, são estruturas inseridas na derme, mas que constituem invaginações da epiderme (HARRIS, 2009).

Os cabelos e pelos do corpo originam-se em estruturas chamadas de folículos, os quais estão distribuídos por toda a dimensão do organismo. O folículo capilar se desenvolve com um crescimento oblíquo ou curvado de células epidérmicas dentro da derme ou hipoderme, sendo canalizado para formar uma estrutura relativamente imóvel da raiz. O folículo abriga as zonas de divisão celular, ou bulbo, e de queratinização, nas quais a haste é formada (Figura 3) (HARRIS, 2009).

O cabelo humano é um filamento queratinizado que cresce a partir de cavidades em formas de sacos chamados folículos. Estes folículos estendem-se desde a derme até a epiderme através do EC. Cada folículo contém componentes glandulares e musculares. O diâmetro de um fio de cabelo pode variar de 15 μm a 120 μm (FERNANDES, 2013 e POZEBON et al., 1999).

O cabelo é basicamente composto por três camadas: (i) a cutícula (camada externa composta por várias subcamadas separadas por um complexo de células – endocutícula, epicutícula e exocutícula), (ii) o córtex (principal componente do cabelo, formado por um conjunto de células cilíndricas denominado de matriz, local onde fica localizada a queratina e outras proteínas e (iii) a medula (camada mais interna do folículo) (POZEBON et al., 1999).

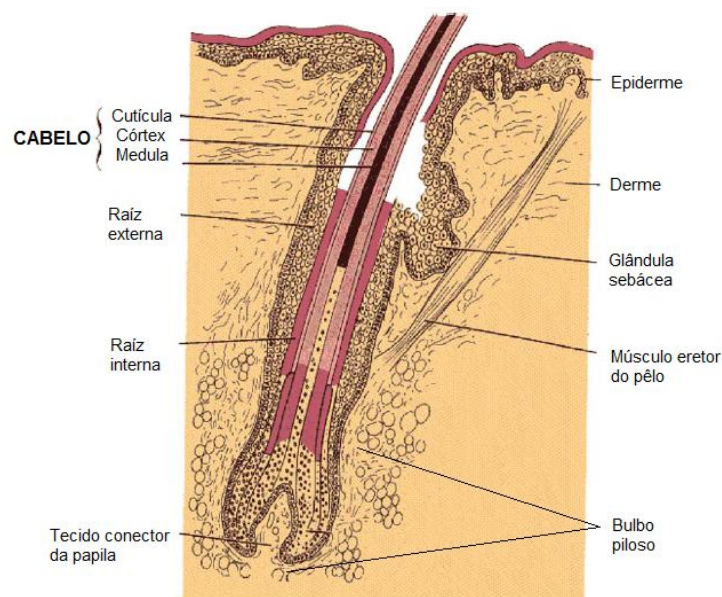


Figura 3. Estrutura anatômica de uma unidade pilossebácea (adaptado de MEIDAN et al., 2005).

Grande parte das propriedades do cabelo é determinada pela queratina. A queratina é uma proteína secundária produzida pelos queratinócitos e constituída pela mistura de vários aminoácidos, sendo o mais importante a cistina. As unidades de cistina podem ligar os filamentos de queratina adjacentes através de ligações dissulfúricas. Esse tipo de ligação forte é responsável pela grande estabilidade química e física das fibras de queratina, contribuindo ainda para a forma e textura do cabelo (FERNANDES, 2013).

3.2 Alopecia androgênica

A alopecia androgênica é a principal causa da queda de cabelos em homens. A doença, conhecida popularmente como calvície, pode causar a perda dos cabelos ainda durante a adolescência. A carga hereditária é reconhecida como um fator determinante nesses casos e sabe-se que a testosterona é quem desempenha um papel importante em sua etiologia (BIENOVÁ et al., 2005).

Os pelos crescem em fases cíclicas, em proporções diferentes para diferentes partes do corpo. O pelo humano apresenta três fases cíclicas de crescimento, a anagênese (fase de crescimento ativo), a catagênese (fase de regressão) e a telogênese (fase de repouso). A fase de anagênese é caracterizada por intensa atividade mitótica da matriz, na catagênese os folículos sofrem regressão de até 1/3 de suas dimensões anteriores, e a telogênese é a fase de despreendimento do pelo, ou seja, é quando o pelo cai (Figura 4) (FOITZIK e PAUS, 2004 e JANKOVIC e JANKOVIC, 1998). Em um estado normal 85% dos cabelos do couro cabeludo encontram-se em anagênese, 14% em catagênese e 1% na fase de telogênese.

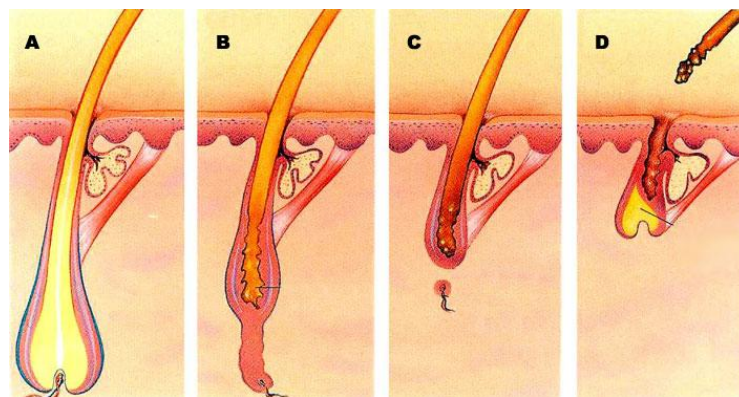


Figura 4. Ciclo de crescimento do pelo: a) Fase de anagênese VI, b) Fase de catagênese, c) Fase de telogênese, d) Despreendimento do pelo (adaptado de Sinclair, 2004)

Nas células do folículo piloso, a testosterona é convertida em um metabólito biologicamente mais ativo, conhecido como dihidrotestosterona (DHT). A DHT liga-se a receptores androgênicos no folículo piloso e, a partir desta ligação, inicia-se um processo, no qual a fase de anagênese do crescimento folicular é reduzida. Por isso, o crescimento capilar passa direto para a fase de telogênese levando à queda do cabelo. A densidade de receptores androgênicos no folículo piloso varia de acordo com o local e esta variação é determinada geneticamente (BIENOVÁ et al., 2005).

A alopecia androgênica pode afetar tanto o homem quanto a mulher, porém com padrões morfológicos diferentes (ROGERS e AVRAM, 2008). Embora este tipo de alopecia seja mais conhecido no sexo masculino, ela acomete aproximadamente 50% dos homens adultos maiores de 40 anos (SHAPIRO, 2003), e pode ocorrer também em mulheres, causando uma perda difusa do cabelo deixando-os mais ralos e podendo expor o couro cabeludo. A alopecia androgênica feminina inicia-se com o afinamento dos cabelos nas têmporas e pode aumentar com o passar do tempo (JÚNIOR e PADOVEZ, 2006).

A alopecia androgênica em mulheres é menos frequente do que em homens; porém a etiologia da doença é bastante semelhante nos dois casos. Entretanto, deve-se excluir a possibilidade de disfunção endócrina antes de diagnosticar o caso como alopecia androgênica. Sabe-se que níveis baixos de estrógeno podem contribuir para a alopecia em mulheres na menopausa ou após ovariectomia (BIENOVÁ et al., 2005).

3.3 Tratamentos para a alopecia

Para o tratamento da alopecia, tem sido utilizados fármacos tanto de aplicação tópica quanto sistêmica, e eles podem ser usados individualmente ou combinados. Os mais utilizados são a finasterida de uso oral e o MX para uso tópico. Outra opção mais direcionada às mulheres é a aplicação de formulações que contenham estrogênio, que prolonga a fase de anagênese do crescimento capilar, prevenindo a queda de cabelo precoce (BIENOVÁ et al., 2005).

3.3.1 Finasterida

A finasterida é um fármaco inibidor seletivo da enzima 5-alfa redutase, a qual converte a testosterona em DHT, que é o principal responsável pela queda de cabelos. Ela tem sido o principal fármaco utilizado para o tratamento sistêmico da alopecia em homens. A finasterida

deve ser administrada pela via oral por longos períodos, de pelo menos um ano, na dose de 1 mg por dia (BULASMED, 2012).

A efetividade desse fármaco vem sendo demonstrada em diversos estudos. Sinclair (2004) estudou a queda de cabelos de leve a moderada em homens, com idades entre 18 e 41 anos, tratados com finasterida na dose de 1mg/dia, por via oral. Em um período de quatro meses, cerca de 86% dos homens tratados tiveram a queda cessada e em 48% deles se observou crescimento do cabelo.

Os principais efeitos adversos do uso oral da finasterida são perda da libido, disfunção erétil, ginecomastia e diminuição do volume de ejaculação. Mesmo sendo efeitos reversíveis, há certa resistência dos homens a adotarem o tratamento com esta substância por motivos culturais, por medo de perderem a virilidade. Além disso, após o término da terapia há uma queda vagarosa dos cabelos (BIENOVÁ et al., 2005), ou seja, seu efeito é observado somente com o uso constante do medicamento.

Devido a alguns outros efeitos adversos mais graves da finasterida, como por exemplo, risco de câncer de próstata, azoospermia e outros efeitos adversos sexuais, o MX de aplicação tópica passa a ser o tratamento preferencial e de escolha para a alopecia androgênica (ROGERS e AVRAM, 2008).

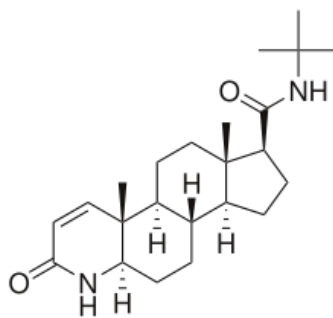


Figura 5. Fórmula estrutural da Finasterida

3.3.2. Minoxidil (MX)

Soluções de MX a 5% ou 2% para aplicação tópica sobre o couro cabeludo são as formulações mais usadas para a terapia da alopecia (BLUME-PEYTAVI et al., 2011). Originalmente, o MX era um vasodilatador periférico usado no tratamento da hipertensão. Foi notado, entretanto, que o principal efeito adverso da administração sistêmica era a hipertricose auricular, ou seja, o crescimento de pelos nas orelhas dos pacientes. A partir de então, este novo uso para o fármaco foi proposto.

O MX tem efeito direto na proliferação e diferenciação dos queratinócitos foliculares, promovendo um prolongamento da fase de anagênese folicular (ATRUX-TALAU et al., 2009; MURA et al., 2009 BIENOVÁ et al., 2005).

A administração de MX é feita duas vezes ao dia (BULASMED, 2012) e, assim como para a finasterida, o seu efeito terapêutico é temporário, ou seja, quando o fármaco não está mais atuando, o cabelo volta a cair vagarosamente. Isso torna a terapia com este fármaco contínua, podendo se estender a muitos anos. Assim, a formulação contendo MX deve ser o mais cômoda possível para o paciente de modo a não trazer desconfortos a ele em seu dia a dia. Os produtos comerciais que contêm o MX, no entanto, são normalmente soluções alcoólicas com alto teor de álcool etílico e/ou propilenoglicol. A aplicação repetida de álcool etílico e/ou propilenoglicol pode levar a sérios efeitos adversos, como por exemplo, ressecamento do couro cabeludo, irritação, queimação, vermelhidão e alergia de contato (ARONSON, 2006; MURA et al., 2009; PADOIS et al., 2011).

Estudos também demonstraram que após aplicação e evaporação do álcool presente nas formulações, o MX tende a formar cristais insolúveis sobre a pele, diminuindo assim sua eficiência em penetrar este tecido (PADOIS et al., 2011). Novas formulações dermatológicas livres de solventes orgânicos irritantes e que permitam que o fármaco penetre adequadamente a pele são, portanto, essenciais para diminuir os efeitos adversos e garantir o sucesso do tratamento da alopecia com o MX.

Mais especificamente, o MX deve conseguir chegar em concentrações adequadas à região pilosebácea. Neste contexto, este trabalho pretende desenvolver e caracterizar uma formulação tópica contendo o MX em sua forma sulfatada mais ativa e mais hidrossolúvel, o MXS (Figura 6), (i) que seja livre de solventes orgânicos para garantir o conforto para o paciente e evitar efeitos adversos como irritação e alergia; (ii) que garanta que altas concentrações do fármaco penetre na pele e chegue diretamente ao local da ação, ou seja, os folículos pilosos e (iii) que libere o fármaco gradativamente ao longo do dia, permitindo assim, apenas uma única aplicação do produto. Tudo isso aumentará bastante a adesão ao tratamento pelo paciente e garantirá o sucesso da terapia (PAPAKOSTAS et al., 2011; PROW et al., 2011; WOSICKA e KRZYSZTOF, 2011).

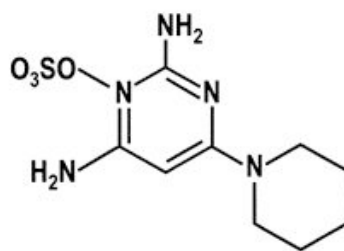


Figura 6. Fórmula estrutural do MXS, pH: 3-5 (Peso Molecular: 516,58 Da).

3.4 Vias de permeação epidérmica e transfolicular de fármacos

No tratamento tópico de patologias da pele, o fármaco contido no medicamento aplicado deve ser capaz de penetrar e ficar retido no local por determinado tempo em concentrações terapêuticas. A penetração de um fármaco na pele depende de um grande número de fatores, incluindo as propriedades físico-químicas do fármaco, as características do veículo farmacêutico e as condições da pele em que será aplicado o produto. A pele normal e íntegra atua como uma barreira natural, limitando o grau e a velocidade de penetração do fármaco (ANSEL et al., 2007).

Dessa forma, podem ser identificadas duas diferentes rotas de permeação através desta barreira natural, a via intercelular, em que a substância se difunde ao redor dos corneócitos passando somente pela matriz lipídica, e a via transcelular em que o fármaco passa diretamente através dos corneócitos e matriz lipídica intercelular (Figura 4) (GRATIERI et al., 2008; MOSER et al., 2001). Essas duas rotas são conhecidas como vias epidérmicas, pois em ambos os casos o fármaco se difunde através de todas as camadas da epiderme.

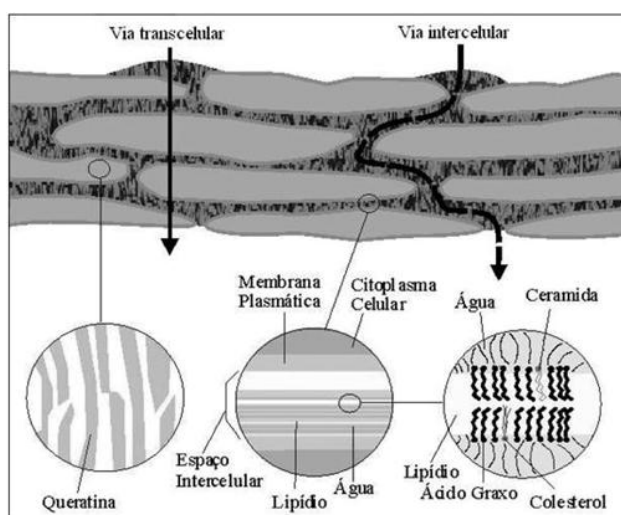


Figura 7. Vias de permeação de fármacos pela pele: via transcelular e via intercelular (adaptado de MOSER et al., 2001).

Uma outra via de permeação cutânea de fármacos dá-se através dos apêndices cutâneos (folículos pilosos, glândulas sebáceas e sudoríparas), que formam rotas alternativas através da epiderme (GRICE et al., 2010). Apesar de ocuparem uma pequena área superficial cutânea, sabe-se que os apêndices cutâneos são a via de preferência para algumas substâncias aplicadas passivamente na pele, assim como para alguns fármacos incorporados em sistemas de liberação mais elaborados. Blume-Peytavi et al. (2010) já demonstraram a importância da via folicular para permeação do MX a partir de uma formulação convencional por meio de técnicas de espectrometria de massa superficial, e Feldmann e Maibach (1967) demonstraram haver alta absorção de substâncias em áreas com alta densidade de pelos. Lipossomas, micropartículas e nanopartículas poliméricas estão sendo amplamente estudados como carreadores para favorecer a penetração de compostos pela via folicular (VOGT et al., 2005).

No caso de fármacos de ação tópica cutânea para tratamento de patologias não relacionadas ao folículo, essas estruturas podem também atuar como reservatório de fármacos para serem lentamente difundido para outras camadas da pele (Figura 8) (LADEMANN et al.; 2006; VOGT et al., 2005).

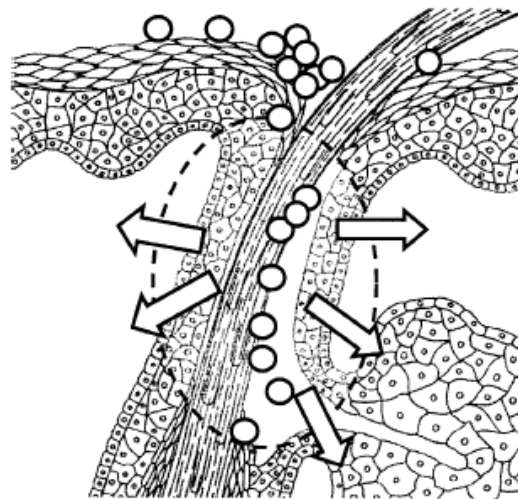


Figura 8. Micropartículas entram seletivamente pelo folículo e controlam a liberação do fármaco no local de ação (adaptado de VOGT et al., 2005).

Neste estudo, pretende-se empregar nanopartículas como carreadores do MXS para liberar de forma progressiva o fármaco para o folículo piloso.

3.5 Nanopartículas poliméricas para aplicação tópica

A nanotecnologia é claramente uma área de pesquisa e desenvolvimento muito ampla e interdisciplinar, que inclui conhecimentos da biologia, química, física, matemática, engenharia, computação e outros ramos da ciência (DURAN et al., 2006; FERNANDES E FILGUEIRAS, 2008), uma vez que se baseia nos mais diversificados tipos de materiais (polímeros, cerâmicas, metais, semicondutores e biomateriais), estruturados em escala nanométrica de modo a formar blocos de construção como nanopartículas, nanotubos e nanofibras (DURAN et al., 2006).

Entre as áreas que tiveram um avanço significativo com as pesquisas nanotecnológicas, destaca-se a área da saúde englobando os setores farmacêutico, odontológico e médico, que visa utilizar das características dos nanomateriais para o diagnóstico e tratamento de várias doenças.

Muitas doenças originam-se de alterações biológicas em níveis moleculares ou em nanoescala. Mutações gênicas, malformações de proteínas, e infecções causadas por vírus e bactérias podem levar ao mau funcionamento celular. Essas moléculas e agentes infecciosos estão na escala nanométrica e também podem estar protegidos por barreiras biológicas que impedem a ação de fármacos em macroescala, como por exemplo a barreira hematoencefálica (KIM et al., 2010).

Os nanomateriais possuem uma maior taxa de superfície de contato comparado ao volume corporal, assim como, características ópticas, eletrônicas, magnéticas e biológicas diferenciadas dos materiais em macroescala (KIM et al., 2010). Podem ainda ser desenvolvidos em diferentes formatos, tamanhos, composição química e características de superfície (PEER et al., 2007; XIA et al., 2009).

No campo farmacêutico, esses nanomateriais estão sendo incorporados no desenvolvimento de novos carreadores para a liberação de fármacos, agentes de contraste e testes para diagnóstico, sendo que alguns já estão em testes clínicos ou já foram aprovados para o uso humano, principalmente pela agência norte-americana de regulação *Food and Drug Administration* (FDA) (KIM et al., 2010).

Os principais nanocompostos utilizados no campo farmacêutico como carreadores de fármacos são:

- Lipossomos;
- Dendrímeros;
- Nanopartículas Poliméricas;
- Nanopartículas Magnéticas;
- Nanopartículas Metálicas;
- Nanopartículas Lipídicas Sólidas;
- Fullereno;
- Nanotubos de carbono.

Muitos desses nanomateriais foram desenvolvidos para a ação específica contra tumores, porém também são utilizados como carreadores de fármacos para aplicação clínica e como agentes de contraste para testes de diagnóstico (KIM et al., 2010).

O uso de nanopartículas poliméricas é bastante estudado para a aplicação tópica por elas serem capazes de proteger, sustentar e até restringir a permeação transdérmica de fármacos através da pele, fazendo com que eles permaneçam mais retidos no tecido cutâneo (DE JALON et al., 2001). Além disso, os polímeros usados para o preparo de nanopartículas são biodegradáveis, inócuos e de fácil manipulação.

Polímeros de PLGA (Poli Lactida-co-glicolida) são a classe de polímeros mais empregada na obtenção de sistemas nanoparticulados por serem atóxicos, bem tolerados, biodegradáveis e biocompatíveis. Além disso, eles já vêm sendo estudados com este propósito desde 1971 (GAVINI et al., 2004; BRANNON-PEPPAS et al., 2004). Por ser um polímero sintético, os PLGA são polímeros muito caros, o que inviabiliza a produção de produtos com um valor viável para as indústrias e consumidores. Uma alternativa para o uso do PLGA é a quitosana (NAGPAL et al., 2011; WANG et al. 2011; PARK et al. 2010).

Nanopartículas de quitosana estão sendo cada vez mais estudadas e oferecem mais vantagens em relação às outras matrizes poliméricas devido à sua biocompatibilidade, biodegradabilidade nas formulações, versatilidade de aplicação adicionada à uma toxicidade baixa, não imugenidade e propriedades mucoadesivas, o que pode aumentar o tempo de adesão das nanopartículas na pele (NAFEE et al., 2007; SHAH et al., 2008). Micropartículas de quitosana contendo o MXS já foram preparadas e caracterizadas por Gelfuso et al. (2011), que mostraram que elas foram capazes de sustentar três vezes a liberação deste fármaco. Além disso, acredita-se que a redução de seu tamanho para a escala nanométrica possa permitir um

maior direcionamento do fármaco para os folículos pilosos, sem deixar de haver uma liberação sustentada do fármaco.

O estudo de nanopartículas poliméricas para a veiculação de fármacos envolvidos no tratamento de afecções cutâneas que envolvem os folículos pilossebáceos está ganhando muita importância, pois além de serem sistemas estáveis e de simples preparo, as nanopartículas propiciam um aumento da absorção folicular do fármaco por conseguirem penetrar a pele via folículos, fazendo dessas estruturas um reservatório de fármaco, que vai sendo aos poucos liberado pela formulação para atingirem o seu sitio de ação (GELFUSO et al., 2011; MEIDAN et al., 2005; SMIJS e BOUWSTRA, 2010), conforme esquematizado na Figura 9.

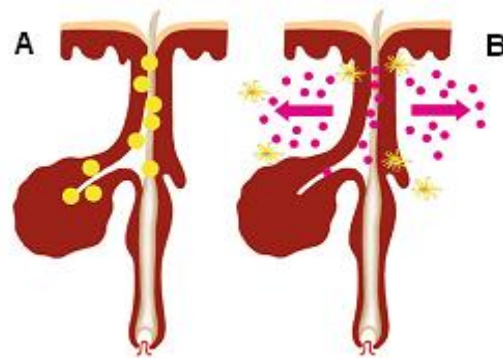


Figura 9. Mecanismo proposto para a liberação folicular de fármacos a partir de nanopartículas: a) as nanopartículas penetram a pele preferencialmente via folículo pilossebáceo, se acumulando nesta estrutura, e b) o fármaco vai sendo liberado das partículas localizadas no folículo pilossebáceo, agindo em regiões subjacentes (adaptado de PAPAKOSTAS et al., 2011).

Recentes trabalhos propuseram o uso de outros sistemas nanoestruturados, como lipossomas e nanopartículas lipídicas, como sistemas alternativos para a liberação tópica de fármacos. Padois et al. (2011) compararam duas formulações, uma de nanopartículas lipídicas sólidas que continham o MX com os produtos comerciais disponíveis contendo o fármaco não encapsulado. O diâmetro das nanopartículas lipídicas sólidas foi considerado adequado para atingir os folículos pilosos (190 nm) e a permeação cutânea do MX a partir dessas nanopartículas mostrou-se tão eficiente quanto as das formulações comerciais. Além disso, o estudo reportou uma diferença muito grande entre as formulações em termos de irritação cutânea, uma vez que as formulações que continham as nanopartículas lipídicas não foram agressivas à pele.

Balakrishnan et al. (2009) demonstraram o potencial efeito dos niossomas (vesículas de lipídios sintéticos de natureza não iônica, desenvolvidas com o objetivo de aumentar a estabilidade dos lipossomas) em aumentar biodisponibilidade tópica do MX em pele de camundongos. O estudo mostrou que os niossomas conseguem aumentar a penetração do MX na pele dos camundongos mesmo em concentrações baixas do fármaco. Além disso, estudos de permeação revelaram que o tamanho das partículas desempenha um papel determinante na penetração cutânea do fármaco.

Espera-se com o desenvolvimento de nanopartículas de quitosana contendo o MXS conseguir efeitos mais pronunciados no que diz respeito tanto ao acúmulo de MXS na região folicular, quanto no potencial que a formulação terá em sustentar a liberação do fármaco, levando-se em consideração toda a simplicidade do preparo e baixo custo de produção que estes sistemas nanoparticulados rígidos têm em comparação àqueles sistemas deformáveis já estudados.

4. MATERIAL E MÉTODOS

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). Ácido Acético 99,9%, quitosana de baixo peso molecular e o tripolifosfato (TPP) foram obtidos da Sigma-Aldrich (Steinheim, Alemanha). As formulações hidrofílicas foram preparadas com Carbopol[®] e correções de pH foram realizadas com hidróxido de sódio (Dinâmica Química Contemporânea São Paulo, Brasil). Para preparação do tampão fosfato foram utilizados fosfato de sódio nas formas monobásica e dibásica (Vetec, Rio de Janeiro, Brasil) e cloreto de sódio (Serva, Rio de Janeiro, Brasil). 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 tipo Milli-Q (Millipore, França). As orelhas de porco utilizadas foram cedidas pela Bonasa (Brasília, Brasil). Para a obtenção da pele, cada orelha foi fixada sobre uma placa de isopor recoberta por papel alumínio, com o auxílio de um bisturi a pele foi retirada, e a camada adiposa adjacente removida com o auxílio de uma tesoura (Figura 10). A pele foi congelada a -4°C por um período máximo de dois meses antes do seu uso.

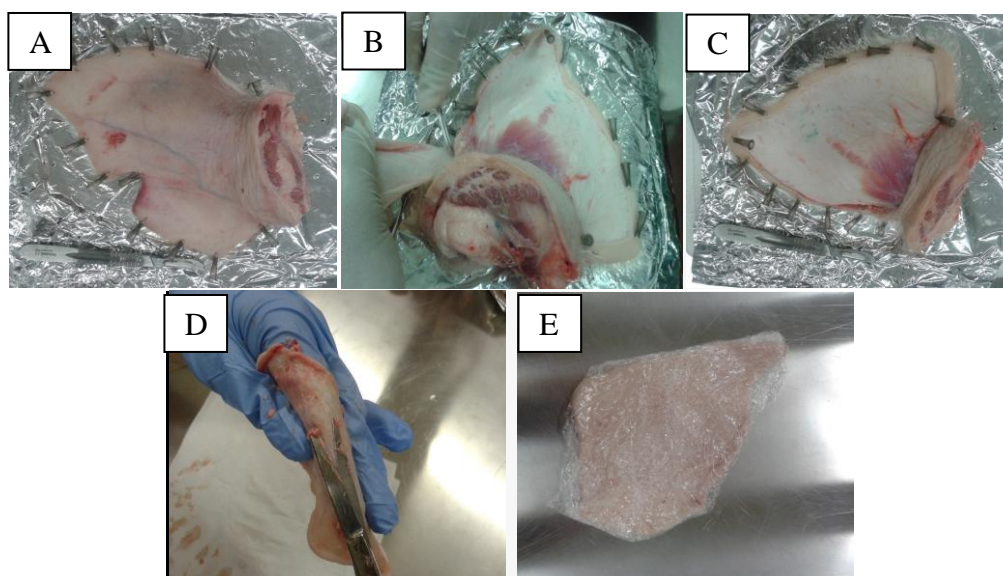


Figura 10. Processo de retirada da pele da orelha do porco: A) A orelha do porco é fixada em uma placa de isopor. B) Com auxílio de um bisturi a pele é removida da orelha do porco. C) Pele totalmente removida da orelha do porco. D) O tecido adiposo adjacente é retirado com auxílio de uma tesoura. E) A pele de porco é mantida sob refrigeração à -4°C até seu uso.

4.1 Determinação do comprimento de onda de absorção máxima do MXS

Para a determinação do comprimento de onda de absorção máxima para o fármaco, o MXS foi solubilizado em metanol a uma concentração igual a 100 µg/mL e foi feita uma varredura dessa solução em um espectrofotômetro de UV/Vis (Shimadzu, UV 1800), utilizando-se cubetas de quartzo de 1,00 cm de caminho óptico. A varredura foi feita na faixa de comprimento de onda entre 200 e 700 nm. O comprimento de onda de máxima absorção no UV/Vis foi selecionado para análise do MXS em CLAE.

4.2 Método analítico para quantificação do MXS permeado e recuperado da pele

O MXS foi dosado com o auxílio de um Cromatógrafo Líquido de Alta Eficiência (CLAE), modelo Shimadzu LC 20-AD, composto por duas bombas (modelo LC 20-AT), um injetor automático (modelo 9SIL-20AD) e forno (modelo CTO-20AS), acoplados a um detector espectrofotométrico (modelo SPD-M20A) e a um computador equipado com o programa de análise cromatográfica Shimadzu LC. Foi utilizada uma coluna de fase reversa C₁₈ (150 mm x 4,6 mm) e fase móvel composta por uma mistura de Água deionizada: Acetonitrila (90:10) (v/v). A vazão foi de 1mL/min, o volume de injeção das amostras foi de 50µL, o forno foi utilizado à temperatura ambiente e a detecção foi feita em 285 nm (GELFUSO et al., 2011).

A validação do método analítico foi realizada no laboratório de controle de qualidade da Farmácia Escola da Universidade de Brasília (FE-UnB) com um único analista.

4.3 Validação do método analítico para quantificação do MXS

O método padronizado foi validado em termos de linearidade, precisão, exatidão, especificidade/seletividade e limite de quantificação, segundo legislação vigente (ANVISA, 2003).

▪ Linearidade

Para verificar a linearidade do método, foram realizadas seis diluições em metanol a partir de uma solução padrão de MXS (100 µg/mL), previamente preparada pela diluição de 10 mg do fármaco em 100 mL de metanol (grau HPLC, Tedia, Brazil). As diluições para construção da curva foram feitas utilizando como solventes metanol e tampão fosfato 0,01 M, pH 7,4, em triplicata para cada concentração, que foram iguais a 0,5; 1,0; 1,5; 2,0 e 3,0 µg/mL. A curva analítica foi construída relacionando-se a concentração do MXS com área do pico fornecido pelo aparelho após injeção das amostras padrão. A análise estatística dos dados

foi obtida pelo método de regressão linear, obtendo uma reta no formato $y = ax + b$, onde (a) corresponde ao coeficiente angular e (b) coeficiente linear. As faixas lineares foram calculadas utilizando-se o coeficiente de correlação linear (r), que de acordo com os parâmetros mínimo aceitável de $r = 0,99$ (ANVISA, 2003).

▪ **Precisão**

A precisão do método foi avaliada por meio do estudo de repetitividade e precisão intermediária. Os resultados foram expressos através do coeficiente de variação (CV%), calculado através da seguinte fórmula:

$$CV\% = (\text{Desvio Padrão}/\text{Concentração Média}) \times 100 \quad (\text{Equação 1}),$$

onde: CV% corresponde ao coeficiente de variação; Desvio Padrão é a estimativa do desvio padrão da média e Concentração Média é as médias das medidas em triplicata para cada concentração analisada.

A repetitividade foi avaliada considerando-se a dispersão dos valores das áreas dos picos de três concentrações (1,0; 1,5; 3,0 $\mu\text{g/mL}$), que contemplaram o intervalo linear do método, em triplicata para cada concentração.

A precisão intermediária foi avaliada considerando-se a dispersão dos valores das áreas dos picos de três concentrações (1,0; 1,5; 3,0 $\mu\text{g/mL}$), que contemplaram o intervalo linear do método, em triplicata para cada concentração, obtidas em três dias diferentes, com o mesmo analista e equipamento.

▪ **Exatidão**

A exatidão representa o grau de concordância entre os resultados encontrados na análise e um valor de referência ou teórico aceito como verdadeiro (RIBANI et al., 2004). A exatidão foi analisada utilizando as mesmas concentrações descritas anteriormente para cálculo da precisão. Os resultados foram expressos em função da porcentagem do erro relativo:

$$E\% = (\text{Valor}_{\text{Obtido}} - \text{Valor}_{\text{Real}}) / (\text{Valor}_{\text{Real}}) \times 100 \quad (\text{Equação 2}),$$

onde: E% corresponde à porcentagem de erro relativo; Valor_{obtido} corresponde à concentração obtida após a análise; e Valor_{real} corresponde à concentração do padrão que deveria ser encontrada após a análise.

▪ **Especificidade/Seletividade**

Para a análise da Especificidade/Seletividade do método foi injetado no CLAE metanol e tampão fosfato 0,01 M, pH 7,4, como brancos das amostras, para verificar a capacidade do método de medir exatamente um composto na presença de outros componentes (ANVISA, 2003). A seletividade da metodologia também foi verificada a partir da injeção de (i) uma solução diluída e filtrada de quitosana e de (ii) uma solução metanólica do homogeneizado da pele filtrado.

▪ **Limite de Quantificação**

Para obtenção do Limite de Quantificação (LQ), foram injetadas concentrações decrescentes do MXS solubilizadas tanto em metanol quanto em tampão fosfato 0,01M, pH 7,4. Estas concentrações foram: 0,01; 0,05; 0,1; 0,5 e 1,0 µg/mL. O LQ foi estabelecido por meio da análise de soluções contendo concentrações decrescentes do fármaco até o menor nível determinado com precisão e exatidão aceitáveis (ANVISA, 2003).

4.4 Determinação do coeficiente de solubilidade do MXS

A solubilidade do MXS foi determinada em água mili-Q, de acordo com a metodologia proposta por Ogiso et al. (2004). Um excesso de fármaco (~1g) foi adicionado a erlenmeyers contendo 10 mL de água mili-Q. As soluções foram mantidas à temperatura ambiente sob agitação magnética (1000 rpm) por 24 horas. Após, as amostras foram filtradas em filtros com porosidade de 0,22 µm acoplados a seringas e diluídas para análise em CLAE. O estudo foi realizado em triplicata.

4.5 Obtenção das nanopartículas

As nanopartículas de quitosana foram desenvolvidas pela técnica de geleificação ionotrópica, partindo do procedimento proposto por Calvo et al. (1997). Resumidamente, soluções de quitosana contendo o ácido acético foram preparadas e mantidas sob agitação, *overnight*. Sob estas soluções foram gotejadas soluções do agente reticulante, o TPP. A

reticulação do polímero positivo pelo TPP negativo proporcionou a formação de nanopartículas.

Assim, a técnica foi otimizada variando parâmetros críticos do processo. Foram testadas diferentes concentrações da solução inicial de quitosana (1,25; 1,75 e 2,0 mg/mL), da solução inicial de TPP (0,28 e 2,0 mg/mL), variou-se as proporções Polímero/TPP (1:1 a 5:1 v/v), mantendo-se a concentração de ácido acético (Sigma Aldrich, Alemanha) cerca de 1,75 maior que a concentração da solução de quitosana (CALVO et al., 1997), agitação magnética a 2000 rpm, temperatura a 30°C e pH igual a 4,7.

Para a nanoencapsulação do MXS, a quitosana foi solubilizada em uma solução aquosa de ácido acético a 1% (v/v) cerca de meia hora antes da adição do fármaco ao sistema em diferentes quantidades. Após a adição do fármaco, a mistura foi agitada por cerca de 4 h para garantir a dissolução de todos os componentes. A solução de TPP foi então gotejada lentamente para a obtenção das nanopartículas, e o sistema foi deixado sob agitação magnética por mais 10 min. As quantidades de quitosana e MXS foram variadas para se determinar a melhor eficiência de encapsulação e essas quantidades estão descritas na Tabela 1.

As nanopartículas foram caracterizadas de acordo com a distribuição do tamanho da partícula e potencial zeta, morfologia e eficiência de encapsulação do fármaco.

Tabela 1. Quantidade de fármaco (MXS) e polímero (quitosana) por 20 mL de solução utilizados na obtenção das nanopartículas.

Amostra	Quantidade de quitosana (mg)	Quantidade de MXS (mg)	Proporção polímero/fármaco
NQ1	35	35	1:1
NQ2	35	17,5	2:1
NQ3	35	8,75	4:1

4.6 Caracterização das nanopartículas

4.6.1. Tamanho de partícula e Potencial Zeta

O diâmetro hidrodinâmico das partículas e o potencial zeta foram analisados por espalhamento de luz dinâmico e mobilidade eletroforética, respectivamente. Um mL da suspensão coloidal das nanopartículas, contendo ou não o MXS, foram analisadas logo após sua obtenção em um aparelho Zetasizer Nano ZS (Malvern, EUA).

4.6.2. Morfologia

A morfologia das partículas, bem como a confirmação da distribuição de tamanho delas, foi analisada por microscopia eletrônica de varredura. Para a análise, uma gota das amostras de nanopartículas contendo ou não o MXS foram colocadas em um suporte e deixadas à temperatura ambiente até que o solvente fosse seco. Em seguida, as amostras foram metalizadas com ouro e analisadas em um MEV (MEV JOEL, JSM-7000 IF) em aumento de 4000 a 45000 vezes.

4.6.3. Eficiência de encapsulação

A eficiência de encapsulação foi determinada avaliando-se indiretamente a quantidade de fármaco associado às nanopartículas. Para isto, as suspensões de nanopartículas contendo o MXS foram centrifugadas a 4000 rpm por uma hora em uma centrífuga (Centri Bio, TDL 80-2B) e o sobrenadante foi filtrado em um filtro de poro igual a 0,22 µm acoplado a uma seringa. Foi feita uma diluição de 1:1000 (v/v) do filtrado em metanol e o MXS presente nesta amostra foi quantificado em CLAE, obtendo-se a concentração de MXS não encapsulado (C_{obtido}). A concentração de MXS encapsulado foi determinada pela diferença entre a concentração inicial de fármaco adicionado ($C_{\text{teórico}}$) e a concentração de MXS não encapsulado obtida. A eficiência de encapsulação, então, foi calculada da seguinte forma:

$$EE\% = [(C_{\text{teórico}} - C_{\text{obtido}}) / C_{\text{teórico}}] \times 100 \quad (\text{Equação 3}),$$

onde: EE% é a eficiência de encapsulação do MXS na nanopartícula; C_{obtido} é a concentração de MXS que não foi encapsulado nas nanopartículas de quitosana; e $C_{\text{teórico}}$ é a concentração de MXS que foi inicialmente colocada para preparo das nanopartículas.

Foram testadas três proporções de polímero/fármaco - 1:1; 2:1; 4:1 (m/m) - para se estabelecer qual proporção possuiria a maior eficiência de encapsulação.

4.7 Obtenção de formulações hidrofílicas contendo as nanopartículas com MXS

A suspensão de nanopartículas contendo o fármaco foi geleificada adicionando-se 0,5%, 1% e 2% (m/m) do polímero hidrofílico aniônico Carboxymethyl Cellulose (CMC). Após homogeneização da formulação, o pH foi ajustado para 5,5 com o auxílio de uma solução de NaOH a 0,5 M. Para os estudos de liberação *in vitro* e de permeação cutânea do MXS foram analisadas, portanto, duas formulações: i) suspensão de nanopartículas de quitosana que continha o MXS encapsulado (NQ-MXS) e ii) o gel da suspensão de nanopartículas que continham o MXS encapsulado (gel-NQ-MXS), e seus respectivos controles: i) solução aquosa do MXS e ii) O gel da solução aquosa do MXS (gel). A concentração final de MXS em todas as formulações

foi de 1,75 µg/mL. O pH de todas as formulações foi avaliado e modificado para 5,5 quando necessário.

4.8 Estudo *in vitro* de liberação do MXS a partir da suspensão de nanopartículas (NQ-MXS) e gel desenvolvido contendo nanopartículas de MXS (gel-NQ-MXS)

A influência da NQ-MXS e do gel-NQ-MXS desenvolvidos na liberação do MXS foi verificada *in vitro* através de um ensaio de liberação. Este ensaio foi realizado utilizando-se células de difusão de Franz modificadas (Figura 11) e membranas sintéticas hidrofílicas de acetato de celulose.



Figura 11. Célula de difusão do tipo Franz modificada montada para realização dos estudos *in vitro* de liberação.

A solução receptora presente no compartimento inferior (compartimento receptor) da célula foi uma solução tampão fosfato a 0,01M, pH 7,4, mantida à temperatura ambiente durante todo o tempo de experimento. Essa solução foi sendo reposta ao compartimento receptor à medida que, de 1 h em 1h, foram coletadas para análise 1 mL de solução receptora ao longo de 12 h de experimento. No compartimento doador foram adicionados 1 mL da NQ-MXS e 1 mL do gel-NQ-MXS. Como controle, experimentos semelhantes foram realizados colocando-se no compartimento doador 1 mL da solução aquosa do fármaco e o gel hidrofílico contendo o fármaco. Todas as formulações continham 1,75 % (m/m) de MXS e tiveram seu pH corrigido para 5,5.

A quantidade de fármaco liberada foi determinada por CLAE-UV pela análise das amostras coletadas após a filtração em membranas acopladas à seringas de porosidade de 0,22 µm. O perfil de liberação do MXS a partir da NQ-MXS e do gel-NQ-MXS foi analisado e comparado com ao da solução aquosa do fármaco e do gel da solução aquosa do fármaco (controles) por meio de métodos gráficos relacionando-se a quantidade de fármaco liberada (µg) em função do tempo (h).

4.8.1 Determinação da quantidade de fármaco liberado

Para se determinar a quantidade de fármaco liberado que se difunde através da membrana hidrofílica foi necessário realizar um cálculo de acordo com a seguinte equação:

$$Q_{\text{realt}} = C_{\text{mensurat}} \times V_r + V_a \times \sum^{n-1} C_a \quad (\text{Equação 4}),$$

onde: Q_{realt} é a quantidade liberada acumulada de fármaco no tempo t ; C_{mensurat} é a concentração mensurada do fármaco da coleta no tempo t ; V_r é o volume do compartimento receptor da célula de difusão; V_a é o volume de amostra removido na coleta; e C_a é a concentração de fármaco na amostra removida.

4.9 Estudos de recuperação do MXS do estrato córneo (EC), da epiderme (EP) e do folículo piloso

Três fragmentos de pele de porco foram inicialmente esticadas e presas sobre um suporte de isopor. Sobre cada pedaço de pele foi colocado um *template* de plástico com área de exposição igual a $1,0 \text{ cm}^2$. O EC de cada um dos pedaços de pele foram removidos pela técnica do *tape stripping* com o auxílio de 15 pedaços de fita adesiva. Após, 1 gota de cola de cianoacrilato foi colocada sobre a pele e um pedaço de fita adesiva foi colocada sobre essa gota e pressionada até que ela estivesse completamente seca. Após, a fita foi removida em um único movimento para remoção dos folículos pilosos. Sobre os pedaços de fita contendo o EC, fitas contendo os folículos e sobre os pedaços de pele remanescentes foram adicionados 50 μL , 75 μL , 100 μL da solução estoque metanólica de MXS (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$). O metanol foi evaporado e em seguida as fitas adesivas e os pedaços de pele foram transferidos para tubos Falcon de 50 mL, onde adicionou 5 mL de metanol para extração do fármaco das camadas da pele e avaliação da recuperação em três faixas de concentração da curva analítica: (i) concentração baixa (0,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$), (ii) concentração média (1,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$) e (iii) concentração alta (3,0 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Os tubos foram deixados agitando por 24 h e seu conteúdo filtrado em membranas de 0,22 μm conectados a seringas, e analisado por CLAE para quantificação do MXS. Esse experimento foi realizado em triplicata para cada concentração analisada.

4.10 Permeação cutânea *in vitro* do MXS a partir da NQ-MXS e do gel hidrofílico desenvolvido

A célula de difusão foi montada com a pele da orelha de porco separando o compartimento doador do compartimento receptor (Figura 12). O compartimento receptor foi preenchido com a solução de tampão fosfato 0,01M, pH 7,4. Por 30 minutos a pele foi deixada em contato com a solução receptora com a intenção de hidratá-la antes do estudo.

No compartimento doador foram adicionados 1 mL da NQ-MXS e 1 mL do gel-NQ-MXS. A solução receptora foi mantida à temperatura ambiente e agitada a 1000 rpm por 3 h, 6 h, 9 h ou 12 h. As amostras foram coletadas ao final de cada hora estabelecida e analisadas por CLAE. O fluxo do fármaco foi determinado relacionando a quantidade de MXS permeado em função do tempo.

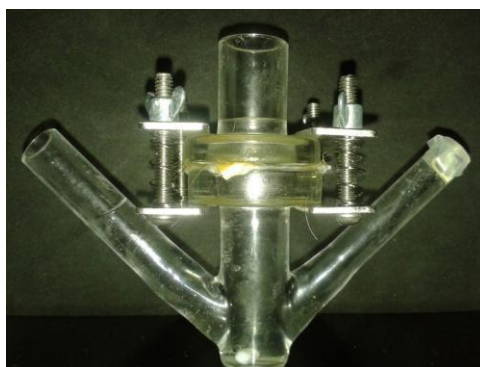


Figura 12. Célula de Franz modificada com a pele de orelha de porco separando o compartimento doador do compartimento receptor.

4.11 Determinação da quantidade de MXS retido no EC, EP e no folículo piloso – *Tape stripping* diferencial

Ao final dos experimentos de permeação cutânea, a quantidade de MXS que permaneceu retida no EC da pele foi determinada e diferenciada daquela retida nos folículos pilosos e EP. Utilizou-se para tal a técnica denominada *tape stripping* diferencial (TEICHMANN et al., 2005).

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. Um *template* de plástico com área de 1,0 cm² foi colocado sobre a pele de modo a deixar exposto somente a área de transporte do fármaco. O EC desta região foi totalmente removido com o auxílio de 15 fitas adesivas. O conteúdo folicular desta área da pele sem EC foi retirado pela aplicação de uma gota de cola de cianoacrilato. Um pedaço da fita adesiva foi colocado sobre a cola e pressionado levemente durante 5 minutos até que a cola estivesse totalmente seca. A fita adesiva foi então retirada em um único movimento. As fitas adesivas, a camada de cola seca retirada, e a EP picotada foram transferidos para três tubos Falcon de 50 mL distintos, de onde se extraiu o MXS pela adição de 5 mL de metanol em cada tubo. Os tubos foram deixados agitando tampados por 24 h e seu conteúdo foi filtrado em filtros com porosidade de 0,22 µm e analisado por CLAE para quantificação do fármaco em estudo.

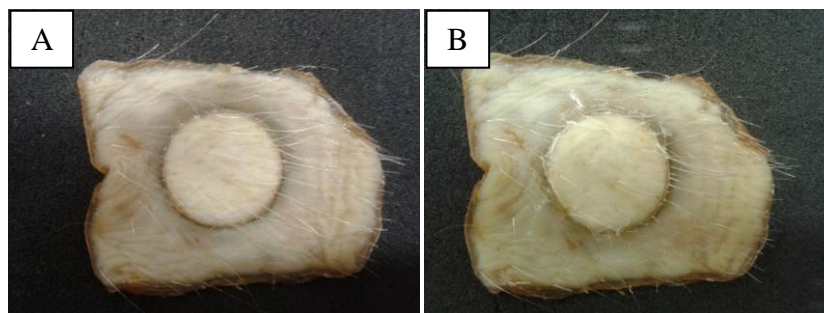


Figura 13. Pedacos de pele de orelha após a perfusão do fármaco: A) Área de perfusão após o *tape stripping* para a retirada do EC e B) Área de perfusão após a biópsia com cola de cianoacrilato para remoção dos folículos pilosos da pele.

4.12 Análise dos dados

Os dados quantitativos estão apresentados nas Tabelas e Figuras como média \pm desvio padrão da média de pelo menos 3 replicatas. As regressões lineares foram obtidas com a utilização do programa Microsoft Excel 2007. A análise estatística dos dados foi realizada com a utilização do programa GraphPad Prism. Diferenças significativas entre conjuntos de dados foram verificadas por análise de variância *one way*, seguido de teste de Tukey com comparação múltipla dos dados. O nível de significância estatística foi fixado como sendo $p < 0,05$

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Este trabalho teve por objetivo desenvolver um produto inovador para o tratamento da alopecia androgênica utilizando-se, como estratégia, a nanoencapsulação do MXS. As nanopartículas de quitosana oferecem várias vantagens na administração tópica de fármacos, como a possibilidade de se obter uma liberação controlada, a facilidade de administração na forma de suspensões tópicas, boa biocompatibilidade e não imunogenicidade (BRANNON-PEPPAS et al., 2004; FAISANT et al., 2002; GAVINI et al., 2004), além de possibilidade de se obter uma liberação localizada do fármaco exatamente no seu local de ação (folículos pilossebáceos), reduzindo assim a ocorrência de efeitos colaterais. A importância prática deste sistema de liberação é, portanto, muito grande.

5.1 Determinação do comprimento de absorção de máxima absorção para o MXS

Foi realizada uma varredura do MXS dissolvido em metanol a 100 µg/mL. O espectro de varredura na região do UV/Vis está apresentado na Figura 14. Os valores de comprimentos de onda de absorção máxima encontrados para o fármaco foram de 210 e de 285 nm e está de acordo com o que se encontra descrito na literatura científica para este composto (GELFUSO et al., 2011 e SHEU et al., 2006). O comprimento de onda de 285 nm, no entanto, foi selecionado para detecção do fármaco por CLAE porque o comprimento de onda igual a 210 nm foi menos seletivo durante as análises, ou seja, observou-se vários picos de absorção do próprio solvente e outros artefatos no cromatograma analisado neste comprimento de onda.

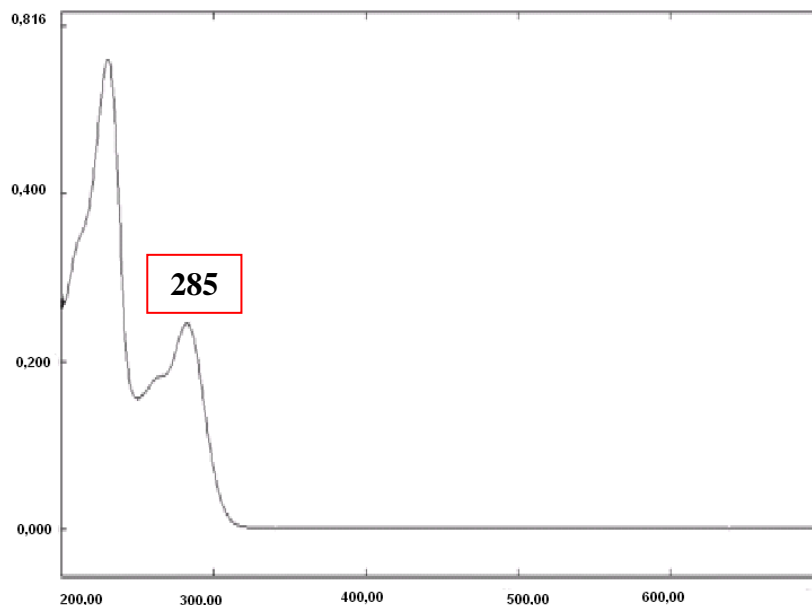


Figura 14. Espectro de absorção na região do UV/Vis de uma solução de MXS em metanol a 100 µg/mL. Faixa de varredura: 200 a 700 nm.

5.2 Método analítico para quantificação do MXS permeado e recuperado da pele

A validação de um método analítico é a confirmação, por fornecimento de evidência objetiva, de que os requisitos específicos para um determinado uso pretendido são atendidos (NBR ISO/IEC 17.025, 2001). É necessário acreditar a metodologia para se atingir um grau de reconhecimento, comparabilidade, rastreabilidade e confiabilidade. A validação do método analítico é um aspecto essencial para a garantia da qualidade de análise (BARROS, 2002). Dados analíticos não confiáveis podem levar a decisões equivocadas e a prejuízos financeiros irreparáveis. Por esta razão, neste trabalho, o método analítico para doseamento do MXS permeado e recuperado da pele foi validado.

5.1.1 Linearidade

A linearidade do método corresponde à sua capacidade em fornecer resultados diretamente proporcionais à concentração da substância em análise, dentro de uma faixa de aplicação (RIBANI et al., 2004).

As Figuras 15 e 16 mostram as curvas analíticas obtidas para o MXS, na faixa de concentração entre 0,5 a 3,0 µg/mL, usando metanol e solução tampão fosfato 0,01M, pH 7,4, como diluentes, respectivamente. A partir da análise da regressão linear é possível afirmar que o método apresentou linearidade na faixa de concentração entre 0,5 µg/mL e 3,0 µg/mL, uma vez que o coeficiente de correlação linear obtido foi de 0,9999 para a curva de metanol e 0,9957 para a curva de tampão fosfato 0,01M, estando de acordo com o preconizado pela ANVISA (ANVISA, 2003).

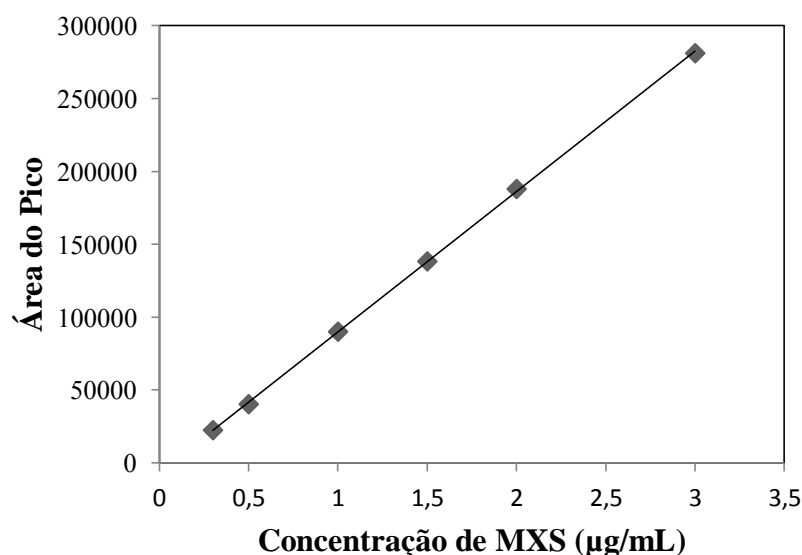


Figura 15. Representação gráfica da curva analítica obtida para o MXS por CLAE. Concentrações diluídas em metanol. Equação da reta: $y = 96352x - 6478,4$ e coeficiente de correlação linear: $r = 0,9999$.

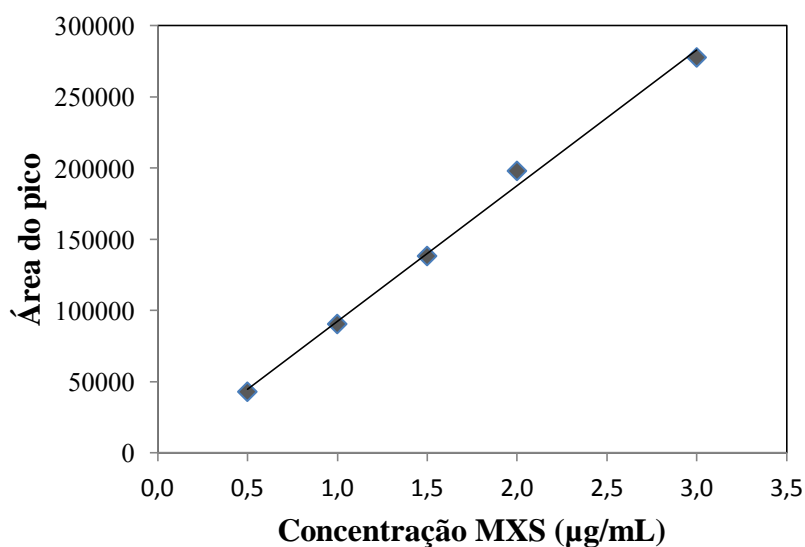


Figura 16. Representação gráfica da curva analítica obtida para o MXS por CLAE. Concentrações diluídas em tampão fosfato 0,01M. Equação da reta: $y = 95326x - 2981,9$ e coeficiente de correlação linear: $r = 0,9957$.

5.1.2 Precisão e Exatidão

A precisão representa a dispersão de resultados em ensaios independentes repetidos de uma mesma amostra. A precisão é avaliada pelo desvio padrão absoluto (RIBANNI et al., 2004). Já a exatidão representa o grau de concordância entre os resultados individuais

encontrados em um determinado ensaio e um valor de referência aceito como verdadeiro (RIBANNI et al., 2004). A precisão pode ser expressa como desvio padrão relativo (DPR) ou coeficiente de variação (CV%), não se admitindo valores superiores a 5% (ANVISA, 2003).

As Tabelas 2 e 3 mostram que os valores de precisão e exatidão obtidos para o método de análise do MXS por CLAE estão dentro da faixa estabelecida pela ANVISA. Os valores de exatidão e precisão para as concentrações de 1; 1,5 e 3 µg/mL foram menores que o valor de 5%, limite preconizado por esta agência regulatória.

Tabela 2. Análise da precisão e da exatidão intracorrída e intercorrída do método de quantificação para o MXS diluído em metanol.

Concentração Teórica (µg/mL)	Concentração Experimental (µg/mL)	Precisão %	Exatidão %
Intracorrída (n=9)			
1,0	1,00 ± 0,01	1,89	0,28
1,5	1,50 ± 0,03	2,36	0,26
3,0	2,98 ± 0,01	0,49	-0,44
Intercorrída (n=9)			
1,0	0,99 ± 0,01	1,93	-0,16
1,5	1,50 ± 0,03	2,85	0,47
3,0	2,99 ± 0,04	1,31	-0,04

Tabela 3. Análise da precisão e da exatidão intracorrída e intercorrída do método de quantificação para o MXS diluído em tampão fosfato 0,01 M.

Concentração Teórica (µg/mL)	Concentração Experimental (µg/mL)	Precisão %	Exatidão %
Intracorrída (n=9)			
1,0	0,97 ± 0,04	0,44	-0,25
1,5	1,46 ± 0,05	4,40	-2,31
3,0	2,88 ± 0,07	1,44	-3,85
Intercorrída (n=9)			
1,0	1,03 ± 0,01	0,22	3,99
1,5	1,47 ± 0,03	3,21	-1,97
3,0	2,92 ± 0,02	1,01	-2,44

5.1.4 Especificidade/Seletividade

Especificidade ou seletividade de um método é a sua capacidade de medir exatamente um composto em presença de outros componentes (ex: impurezas, produtos de degradação e

componentes da matriz) (ANVISA, 2003).

Na Figura 17 está representado o cromatograma referente à injeção de uma solução de MXS a 3,0 µg/mL em metanol; já na Figura 18 está representando o cromatograma referente à injeção de uma solução de MXS a 3,0 µg/mL em solução tampão fosfato 0,01 M, seguindo o protocolo das condições padronizadas para a quantificação do fármaco por CLAE-UV (item 4.10). As Figuras 19 e 20 estão representando os brancos da amostra, ou seja, somente o metanol e a solução tampão que foram utilizados como diluentes do MXS, mostrando não haver nenhuma interferência do metanol e da solução tampão na análise.

Para se garantir que nenhum componente da matriz interfere na especificidade do método também foi avaliado o cromatograma da solução metanólica de quitosana (1,75µg/mL) e a de um homogeneizado de pele em metanol filtrado (1 cm² de pele/5 mL de metanol). As Figuras 21 e 22 mostram os cromatogramas referentes à injeção de 50 µL da solução metanólica de quitosana e da solução metanólica dos componentes da pele. A análise de todas as figuras permite concluir que o método se mostrou seletivo para a dosagem do MXS.

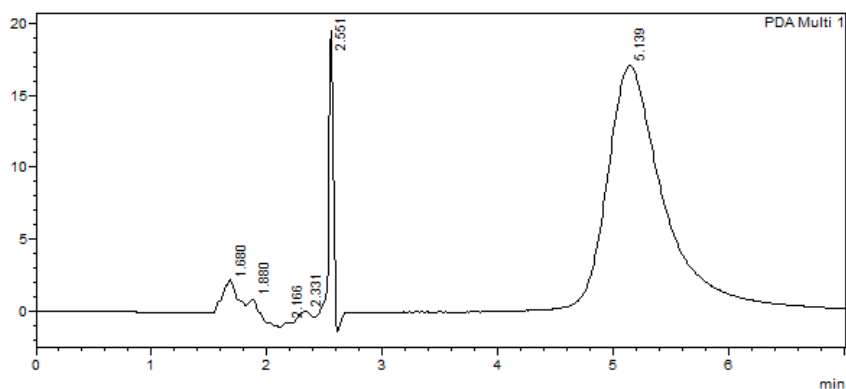


Figura 17. Cromatograma referente à injeção de uma solução de MXS (3,0 µg/mL) em metanol. Coluna C18; fase móvel: água/acetonitrila (90:10); tempo de retenção 5,139min; vazão de 1mL/min; volume de injeção: 50 µL; detecção a 285 nm.

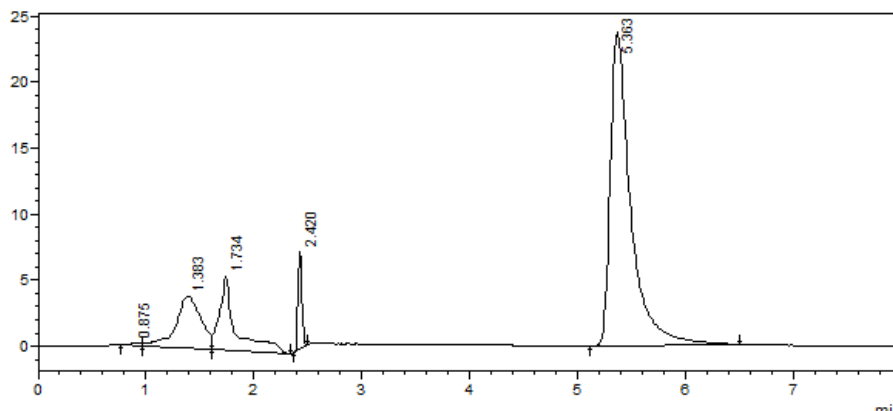


Figura 18. Cromatograma referente à injeção de uma solução de MXS (3,0 µg/mL) em tampão fosfato 0,01M. Coluna C18; fase móvel: água/acetonitrila (90:10); tempo de retenção 5,139min; vazão de 1mL/min; volume de injeção: 50 µL; detecção a 285 nm.

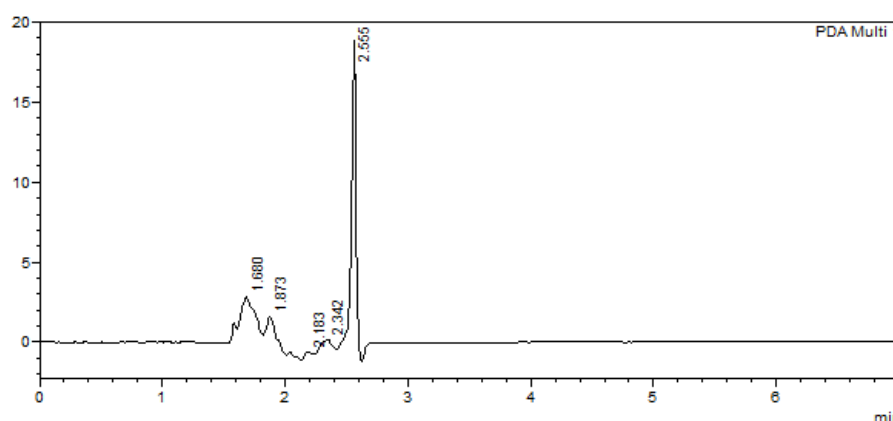


Figura 19. Cromatograma referente à injeção de metanol. Coluna C18; fase móvel: água/acetonitrila (90:10); vazão de 1mL/min; volume de injeção: 50 µL; detecção a 285 nm.

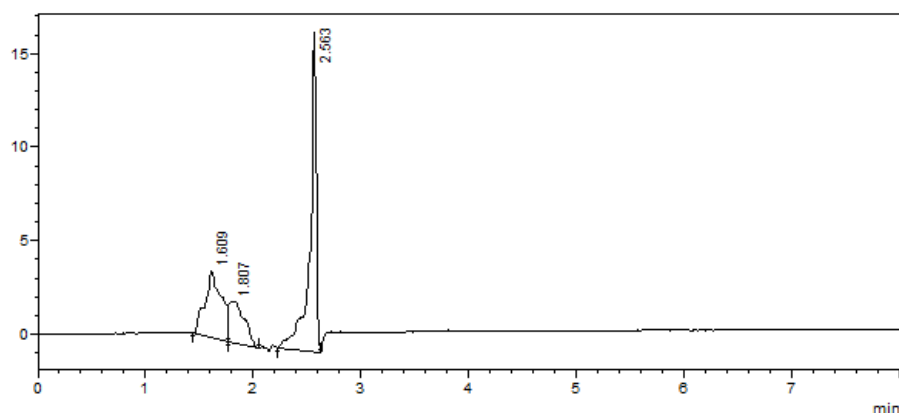


Figura 20. Cromatograma referente à injeção de tampão fosfato. Coluna C18; fase móvel: água/acetonitrila (90:10); vazão de 1mL/min; volume de injeção: 50 µL; detecção a 285 nm.

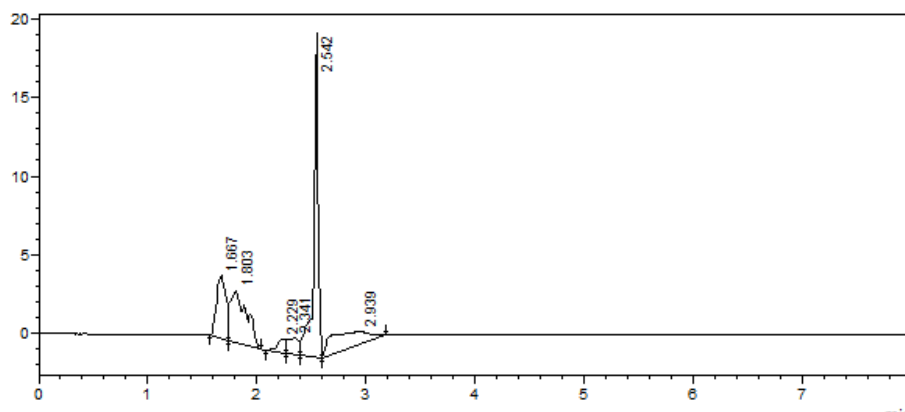


Figura 21. Cromatograma referente à injeção da solução metanólica da suspensão de nanopartículas de quitosana.. Coluna C18; fase móvel: água/acetonitrila (90:10); vazão de 1mL/min;volume de injeção: 50 μ L; detecção a 285 nm.

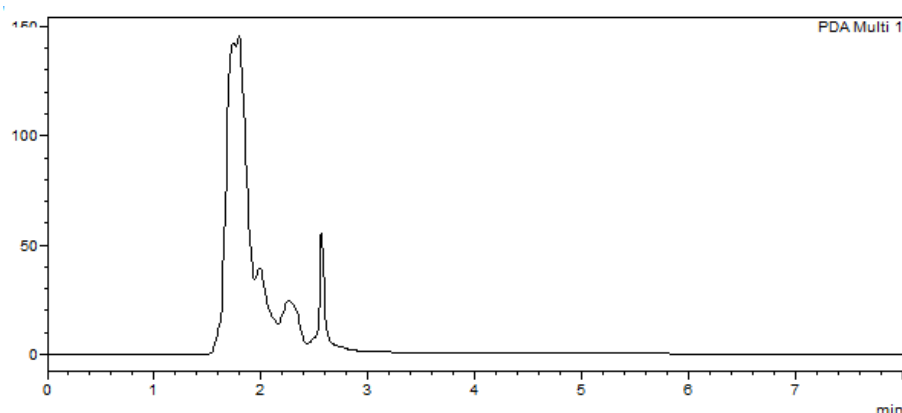


Figura 22. Cromatograma referente à injeção da solução metanólica da pele da orelha de porco. Coluna C18; fase móvel: água/acetonitrila (90:10); vazão de 1mL/min;volume de injeção: 50 μ L; detecção a 285 nm.

5.1.5 Limite de quantificação

O limite de quantificação de um método analítico representa a menor concentração da substância em exame que pode ser medida, utilizando-se um determinado procedimento experimental (RIBANNI et al., 2004) Na prática, normalmente corresponde ao padrão da calibração de menor concentração, excluindo-se o branco (PEREZ, 2010).

Tabela 4. Dados para determinação do Limite de Quantificação do método de quantificação para o MXS diluído em metanol

Concentração Teórica ($\mu\text{g/mL}$)	Concentração Experimental ($\mu\text{g/mL}$)	Precisão %	Exatidão %
0,01	$0,2 \pm 0,01$	0,5	194
0,3	$0,30 \pm 0,05$	3,07	0,45
0,5	$0,48 \pm 0,07$	1,64	-2,72
1	$1,00 \pm 0,01$	1,89	0,28

A menor concentração quantificável do MXS por meio do método proposto por CLAE com precisão e exatidão dentro dos limites preconizados pela ANVISA foi a concentração de 0,3 $\mu\text{g/mL}$, sendo considerado, portanto, o limite de quantificação do método quando o fármaco foi dissolvido em metanol (Tabela 4).

Tabela 5. Dados para determinação do Limite de Quantificação do método de quantificação para o MXS diluído em tampão fosfato 0,01 M.

Concentração Teórica ($\mu\text{g/mL}$)	Concentração Experimental ($\mu\text{g/mL}$)	Precisão %	Exatidão %
0,05	$0,09 \pm 0,01$	0,84	95,15
0,5	$0,49 \pm 0,03$	1,75	-0,96
1	$0,97 \pm 0,05$	0,44	-2,05

Para o fármaco dissolvido em tampão fosfato, dentre as concentrações analisadas, a menor concentração quantificável do MXS por meio do método proposto por CLAE com precisão e exatidão dentro dos limites preconizados pela ANVISA foi a concentração de 0,5 $\mu\text{g/mL}$, sendo considerado, portanto, o limite de quantificação do método quando ele esteve dissolvido em tampão fosfato pH 7,4 (Tabela 5).

5.2 Determinação do coeficiente de solubilidade do MXS

Antes do desenvolvimento de qualquer forma farmacêutica ou de um sistema de liberação de fármacos é essencial analisar as propriedades físicas e químicas da molécula de fármaco. Essa primeira fase de aprendizagem, delineamento e desenvolvimento de uma nova formulação é conhecida como pré-formulação (ANSEL, 2007; AULTON, 2005). A determinação da solubilidade do fármaco é importante do ponto de vista farmacotécnico, pois quanto maior a tendência da substância se dissolver, mais facilmente ela pode ser absorvida

(AULTON, 2005). Um aspecto relevante a ser considerado, é que a velocidade de solubilização (dissolução) e a quantidade que pode ser dissolvida (solubilidade) não são iguais e não estão relacionadas, embora, na prática, uma alta solubilidade de um fármaco esteja, em geral, associada a uma alta dissolução (ANSEL, 2007; AULTON, 2005). Além disso, é necessário conhecer a solubilidade do fármaco em questão, pois nos estudos de permeação e liberação *in vitro* deve-se evitar a saturação do meio (tampão fosfato 0,01M, pH: 7,4), o que atrapalharia sua difusão/fluxo através da pele. Por isso, nesses estudos deve-se manter as condições de *sink*, ou seja, a concentração do fármaco no meio receptor não deve ser maior que 10% de seu coeficiente de solubilidade em hipótese alguma. O coeficiente de solubilidade do MXS em água mili-Q à temperatura ambiente foi determinado e está apresentado na Tabela 6.

Tabela 6. Coeficiente de solubilidade do MXS em água mili-Q à temperatura ambiente

Solvente	Concentração após 24h (g/L)
Água mili-Q	56,14 ± (0,04)

O MXS apresenta solubilidade em meio aquoso de 56,14 g/L, sendo considerado solúvel em água (AULTON, 2006), diferente do MX não sulfatado, que é considerado pouco solúvel em água (2,2 g/L a 25°C) (GORECKI, 1988; THE MERCK INDEX, 1987). Esse resultado de solubilidade em água garante, portanto, que os estudos de liberação *in vitro* e de permeação cutânea do MXS foram conduzidos nas condições de *sink*.

5.3 Obtenção de nanopartículas

As nanopartículas de quitosana contendo o MXS foram preparadas seguindo a técnica de geleificação ionotrópica proposta por Calvo et al. (1997), e foram caracterizadas quanto à distribuição do tamanho da partícula e potencial zeta, morfologia e eficiência de encapsulação do fármaco.

O grau de protonação da molécula de quitosana é basicamente controlado pelo pH do meio. Shu e Zu (2002) demonstraram a relação entre o pH da solução de quitosana e o grau de protonação das suas moléculas. Se o pH da solução aumentar drasticamente - por exemplo, se houver um aumento de pH de 4,8 para 8,0, - o grau de protonação é inexistente, indicando que existe um pH crítico no qual a molécula de quitosana começa a se desprotonar. Fan et al. (2012) mostraram que a faixa de pH ótima pra se obter partículas estáveis e monodispersas é

entre 4,7 e 5,5. Por esta razão, para preparo das nanopartículas de quitosana neste trabalho, fixou-se o pH da solução de quitosana em 4,7.

5.3.1 Tamanho de partícula e Potencial Zeta

A Tabela 7 mostra o tamanho médio, índice de polidispersão (PDI) e potencial zeta das suspensões de nanopartículas preparadas usando-se proporções de 5:1 e 5:2 (v/v) da solução de quitosana (1,75 mg/mL) em relação à solução de TPP (1,00 mg/mL). O tamanho médio das nanopartículas nessas concentrações de quitosana e TPP estão de acordo com o proposto por Calvo et al. (1997), que obtiveram partículas de quitosana com tamanho médio de $304,7 \text{ nm} \pm 24,9$ utilizando o mesmo método de preparo.

Tabela 7. Tamanho médio (nm), potencial zeta (mV) e PDI referentes às nanopartículas de quitosana (NQ) nas concentrações de quitosana 1,75 mg/mL e TPP 1,0 mg/mL.

Proporção	Tamanho das partículas (nm)	PDI	Potencial Zeta (+mV)
5:1	$243,28 \pm 76,97$	$0,295 \pm 0,033$	$47,7 \pm 0,62$
5:2	$271,72 \pm 59,46$	$0,345 \pm 0,060$	$46,16 \pm 6,72$

Calvo et al. (1997) afirmaram que de acordo com a proporção utilizada entre as soluções de quitosana e TPP, as amostras resultantes poderiam se apresentar macroscopicamente de três formas: i) como soluções claras, ii) como soluções levemente opacas e iii) como agregados opacos. As amostras levemente opacas são consideradas as que possuem menor tamanho de partículas, ou seja, caracterizam a formação de nanopartículas. Neste trabalho, quando se trabalhou com proporções volumétricas de 5:2 da solução de quitosana (1,75 $\mu\text{g/mL}$) e solução de TPP (1,0 $\mu\text{g/mL}$), obteve-se soluções levemente opacas, conforme mostra a Figura 23. Já trabalhando-se com proporções de 5:1 (v/v), a reprodutibilidade do método de obtenção não era assegurada, ou seja, por diversas vezes se obtinha soluções mais claras que apresentavam resultados em não conformidade quando lidas em aparelho Zetasizer. Os resultados apresentados na Tabela 7 para tamanho de partícula, PDI e potencial zeta para ambas as proporções não foram significativamente diferentes entre si ($p < 0,05$). Portanto, a proporção de 5:2 foi à escolhida para a obtenção das nanopartículas por garantir uma maior reprodutibilidade na preparação.

O PDI apresentado por todas as nanopartículas foi em torno de 0,3, mostrando estarem relativamente monodispersas. De maneira semelhante aos nossos resultados, Ing et al. (2012), obtiveram nanopartículas de quitosana com valores de PDI de $0,366 \pm 0,047$.

Todas as partículas apresentaram valores de potencial zeta acima de 30 mV em módulo, o que garante a estabilidade da suspensão, pois cargas superficiais desta magnitude evitam que haja aglomeração entre as nanopartículas (Calvo et al., 1997). As cargas superficiais positivas apresentadas pelas nanopartículas são devido à carga residual da quitosana que não se ligaram à molécula de TPP.

As amostras obtidas correspondentes às proporções de 5:3, 5:4 e 1:1 (v/v) entre as soluções de quitosana/TPP não apresentaram resultados considerados satisfatórios de tamanho de partícula, pois formaram-se muitos agregados.

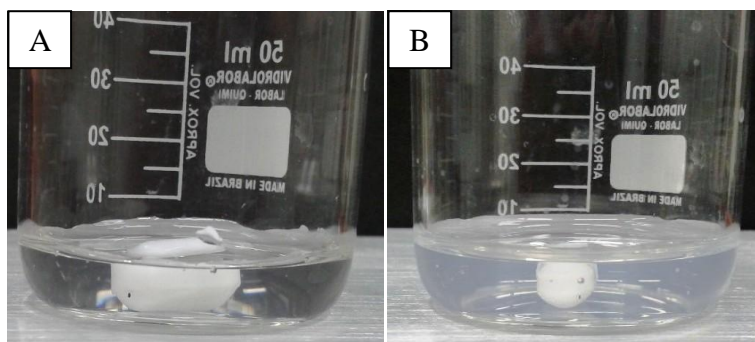


Figura 23. Zona opaca de formação de nanopartículas: A) Solução de quitosana ($1,75 \mu\text{g/mL}$) antes da adição do TPP e B) Suspensão de nanopartículas formada após a adição do TPP.

Calvo et al. (1997) e Fan et al. (2012), demonstraram em seus trabalhos que quanto maior a concentração inicial de quitosana adicionada, maior será o tamanho médio das nanopartículas obtidas. Isso ocorre porque, sob condições ácidas, existe uma repulsão eletrostática entre as moléculas de quitosana devido ao protonamento do grupo amino e também existe uma ligação intermolecular de hidrogênio entre as moléculas de quitosana. Abaixo de certa concentração da quitosana ($2,0 \text{ mg/mL}$), a ligação de hidrogênio intermolecular e a repulsão eletrostática estão em equilíbrio (QUN e AJUN, 2006). Portanto, no intervalo de concentração entre $1,0 \text{ mg/mL}$ a $2,0 \text{ mg/mL}$, à medida que a concentração de quitosana aumenta na solução, as moléculas de quitosana se aproximam, levando a um aumento das ligações intermoleculares, formando portanto partículas maiores, porém ainda em nanoescala (FAN et al., 2012). Acima da concentração de $2,0 \text{ mg/mL}$, micropartículas são formadas devido a uma forte ligação intermolecular, pois várias moléculas de quitosana estariam envolvidas na formação de uma só partícula.

5.3.2 Eficiência de Encapsulação

A eficiência de encapsulação foi determinada avaliando-se a quantidade de fármaco interagindo com as nanopartículas, seja em seu interior ou conectado à sua superfície. A Tabela 8 apresenta os valores encontrados de eficiência de encapsulação do MXS para as nanopartículas preparadas com diferentes proporções de polímero/fármaco (m/m). Os valores de eficiência variaram de 26,18% a 73,32%. Não houve diferença significativa entre os valores de eficiência de encapsulação das amostras NQ2 e NQ3, mas ambos os valores foram significativamente diferente do apresentando pela NQ1 ($p < 0,05$).

Maiores valores de eficiência de encapsulação foram obtidos quando se trabalhou com menores proporções de fármaco em relação ao polímero. Medeiros (2011) obteve uma eficiência de encapsulação de 75% em nanopartículas de quitosana carreando peptídeos antitumorais. Pan et al. (2002) obtiveram 80% de encapsulação da insulina. Mohammadpour et al. (2012) demonstraram que aumentando-se a concentração de um peptídeo presente no veneno de um escorpião, de 50 para 75 $\mu\text{g/mL}$, a eficiência de encapsulação diminuía.

Tabela 8. Tamanho médio (nm), PDI, potencial zeta e eficiência de encapsulação de três amostras (NQ1, NQ2 e NQ3) nas proporções de polímero/fármaco (v/v).

Amostra	Proporção Polímero/Fármaco	Tamanho Médio (nm)	PDI	Potencial Zeta (+mV)	Eficiência de Encapsulação (%)
NQ1	1:1	235,5 \pm 99,9	0,310 \pm 0,008	28,6 \pm 5,98	73,32 \pm 0,29
NQ2	1:2	271,2 \pm 46,2	0,323 \pm 0,04	22,3 \pm 5,29	28,8 \pm 0,16
NQ3	1:4	306,6 \pm 41,9	0,307 \pm 0,01	25,4 \pm 5,87	26,18 \pm 0,02

A baixa eficiência de encapsulação nas concentrações mais elevadas de MXS pode estar relacionada à capacidade limitada que as nanopartículas poliméricas têm em acomodar o fármaco em seu interior ou em sua superfície sem interferir em sua estrutura.

5.3.3 Morfologia das Nanopartículas

A Figura 24 apresenta fotomicrografias das nanopartículas obtidas por geleificação ionotrópica em vários aumentos. Já a Figura 25 apresenta fotomicrografias das nanopartículas contendo o MXS encapsulado na proporção polímero/fármaco de 1:1 (m/m). As nanopartículas apresentaram-se bem esféricas e nota-se, pela observação das fotomicrografias,

que se formou uma população de partículas relativamente monodispersa e monomodal, com partículas de diâmetro em torno de 300 nm, corroborando com os resultados de diâmetro hidrodinâmico das partículas apresentados anteriormente. Calvo et al. (1997) também demonstraram o formato esférico das nanopartículas de quitosana, porém elas se apresentaram polidispersas, com tamanhos muito variados desde partículas na escala micrométrica até partículas na escala nanométrica. Fan et al. (2012) afirmaram que a técnica de geleificação ionotrópica é muito sensível, e que na maioria das vezes a amostra apresenta-se polidispersa e com baixa estabilidade. As nanopartículas de quitosana desenvolvidas nesse trabalho, portanto, apresentaram características superiores àquelas preparadas anteriormente por ambos os grupos de pesquisa, mostrando que as variações implementadas no método inicial de preparo foram positivas.

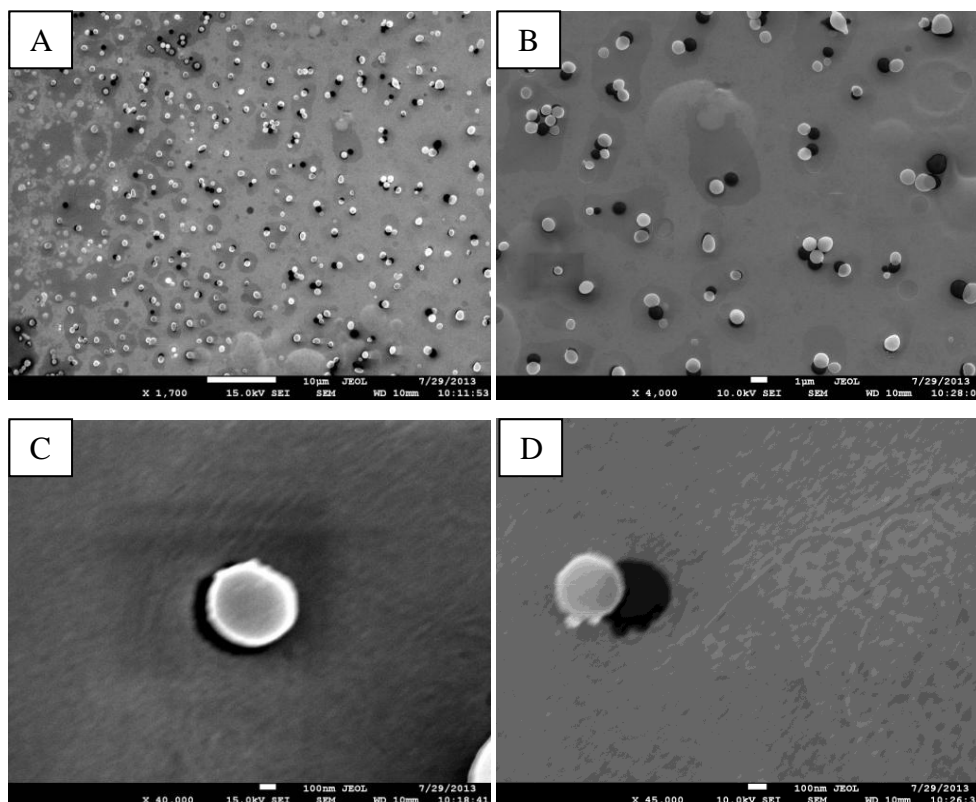


Figura 24. Fotomicrografia obtida por microscopia eletrônica de varredura (MEV JOEL Modelo JSM-700IF) em aumento: A) 1700 vezes B) 4000 vezes, C) 40.000 vezes e D) 45.000 para as nanopartículas de quitosana.

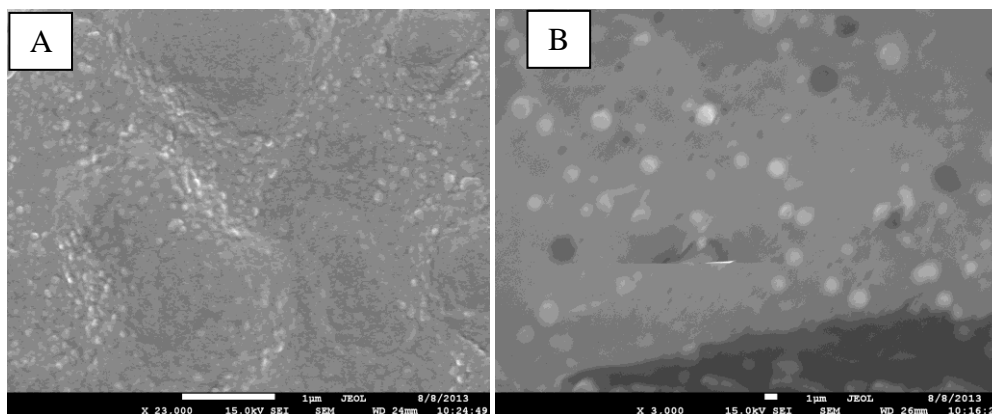


Figura 25. Fotomicrografia obtida por microscopia eletrônica de varredura (MEV JOEL Modelo JSM-700IF) em aumento: A) 23.000 vezes e B) 4000 para as nanopartículas de quitosana e MXS encapsulado na proporção 1:1.

A presença do MXS nas nanodispersões não resultaram em alteração significativa na morfologia das nanopartículas (Figura 25), nem em sua faixa de diâmetro. Esses resultados estão, portanto, totalmente de acordo com os valores de tamanho de partícula apresentados na Tabela 8.

5.4 Obtenção de formulações hidrofílicas contendo as nanopartículas de quitosana com MXS encapsulado

A suspensão coloidal do MXS encapsulado nas nanopartículas de quitosana foi geleificada adicionando-se 0,5%, 1% e 1,5% (m/m) de Carbopol (Figura 26). Optou-se por utilizar a porcentagem de 0,5% (m/m) de Carbopol, no entanto, porque esta concentração foi responsável por produzir um gel mais fluido, facilitando a sua aplicação sobre a pele. O pH do gel foi ajustado para 5,5 para torna-lo compatível à aplicação tópica dermatológica.

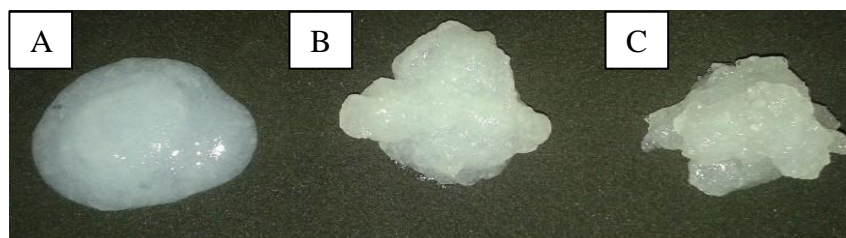


Figura 26. Fotografia dos géis, todos em pH 5,5 contendo as nanopartículas de quitosana encapsulando o MXS: A) 0,5% de Carbopol B) 1,0% de Carbopol e C) 1,5% de Carbopol.

5.5 Estudos *in vitro* de liberação do MXS a partir da NQ-MXS e do gel-NQ-MXS

Os estudos de liberação foram realizados *in vitro* com intuito de se conhecer a velocidade com que o fármaco deixa a formulação e fica disponível para sofrer difusão

através da pele. Nesse estudo, as formulações foram colocadas em contato com uma membrana hidrofílica que as separavam do contato direto com o meio receptor aquoso. A membrana interferia pouco na difusão do fármaco através das formulações. O perfil de liberação do fármaco a partir da NQ-MXS e do gel-NQ-MXS foi comparado à sua difusão através da membrana a partir de uma solução aquosa e de um gel hidrofílico, todos contendo a mesma concentração do MXS e o mesmo pH.

A Figura 27 mostra as quantidades de MXS liberadas (μg) da formulação NQ-MXS, contendo $1,75 \mu\text{g/mL}$ de MXS, pH 5,5, em função do tempo em comparação à solução aquosa do fármaco.

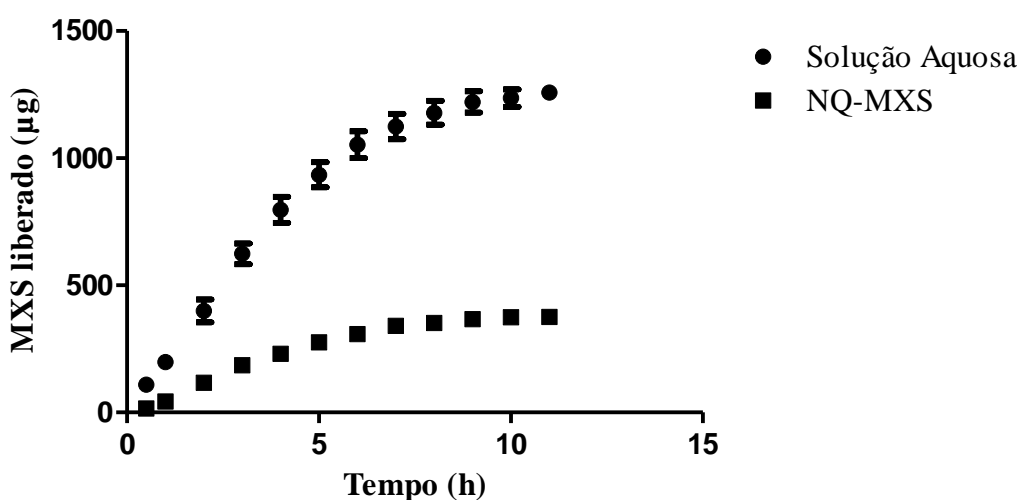


Figura 27. Perfis de liberação do MXS a partir da formulação NQ-MXS contendo $1,75 \mu\text{g/mL}$ do fármaco, pH 5,5 em comparação a uma solução aquosa do fármaco contendo a mesma concentração de MXS e mesmo pH.

A partir da primeira hora de estudo, a liberação do fármaco ocorreu em quantidades significativamente diferentes ($p > 0,05$) daquelas de fármaco difundido da membrana hidrofílica a partir da solução aquosa controle. Assim, a formulação NQ-MXS foi capaz de controlar a liberação do MXS durante as 12 horas de experimento quando comparada ao seu controle.

A Figura 28 apresenta as quantidades de MXS liberado (μg) da formulação gel-NQ-MXS, contendo $1,75 \mu\text{g/mL}$ de MXS, pH 5,5 em função do tempo em comparação ao gel do fármaco livre, mostrando que a presença de fármaco encapsulado também retardou a sua liberação.

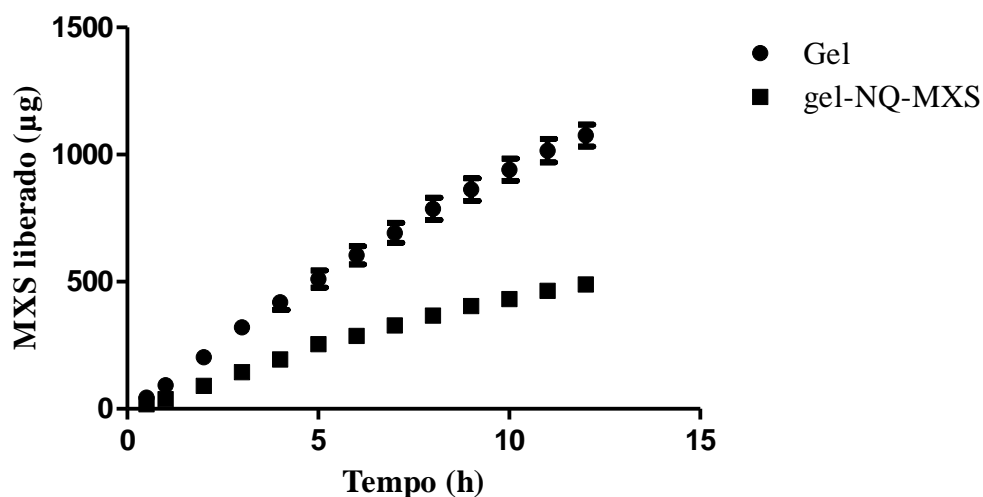


Figura 28. Perfis de liberação do MXS a partir da formulação gel-NQ-MXS contendo 1,75 µg/mL do fármaco, pH 5,5 em comparação ao gel da solução aquosa do fármaco contendo a mesma concentração de MXS e mesmo pH.

A Figura 29 compara a porção linear de todos os perfis de liberação do MXS (µg) a partir das duas formulações e seus respectivos controles, dados utilizados para cálculo dos fluxos de liberação do fármaco, apresentados a seguir na Tabela 9.

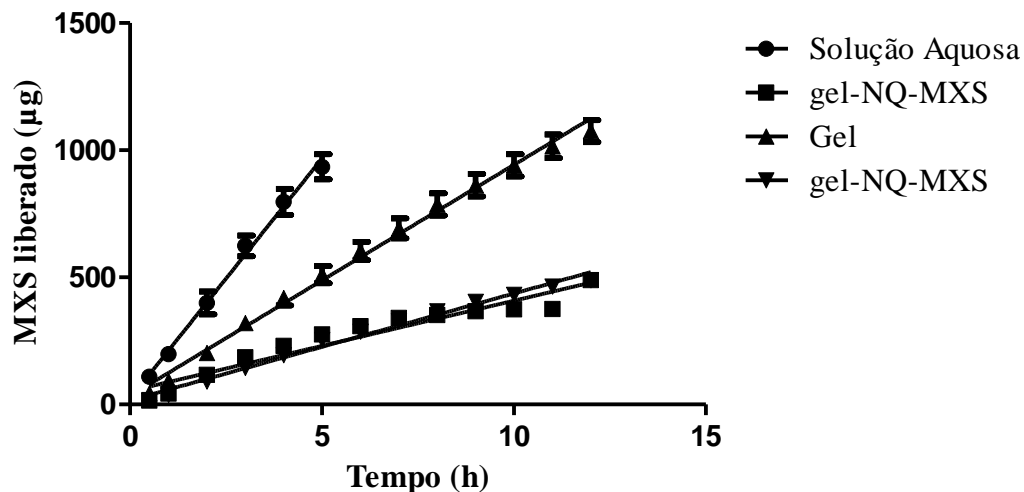


Figura 29. Perfis de liberação do MXS a partir da formulação NQ-MXS e gel-NQ-MXS contendo 1,75 µg/mL do fármaco, pH 5,5 em comparação a solução do aquosa d fármaco e ao gel da solução aquosa do fármaco contendo a mesma concentração de MXS e mesmo pH.

Não houve diferença significativa entre os valores de liberação das formulações NQ-MXS e gel-NQ-MXS, demonstrando que são as nanopartículas que desempenham a função de controlar significativamente a liberação do fármaco, apesar da rede polimérica promover algum controle quando o fármaco está em sua forma livre na formulação.

Tabela 9. Fluxos de liberação do MXS ($\mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}$) a partir das formulações NQ-MXS e gel-NQ-MXS quando comparados aos seus respectivos controles.

Matrizes	Fluxo de Liberação ($\mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}$)	Coefficiente de correlação linear (r)
Solução Aquosa	$188,9 \pm 6,0$	0,98
NQ-MXS	$35,4 \pm 1,8$	0,91
Gel	$90,9 \pm 1,7$	0,98
gel-NQ-MXS	$42,0 \pm 1,1$	0,97

A análise da Tabela 9 torna claro que as nanopartículas foram capazes de controlar a liberação do fármaco, tendo um fluxo de liberação cerca de 5 vezes menor que o fluxo da solução controle. Gelfuso et al. (2011), obtiveram micropartículas de quitosana encapsulando o MXS com tamanho médio de $4,5 \mu\text{m}$, que foram capazes de retardar a liberação do fármaco cerca de 3,5 vezes quando comparadas à difusão do fármaco livre. O sistema nanoestruturado teve um efeito mais pronunciado no controle da liberação do MXS do que um sistema microencapsulado.

5.6 Estudos de recuperação do MXS do estrato córneo (EC), dos folículos pilosos e da epiderme viável+derme (EP)

Os testes de recuperação do fármaco foram realizados com o intuito de se validar o processo de extração do MXS do EC, da EP e dos folículos pilosos, além de verificar a capacidade extratora do metanol para o fármaco nas diferentes matrizes.

O método utilizado para recuperação do MXS retido na pele já foi utilizado por Gelfuso et al. (2011), mostrando-se bastante eficiente. Na Tabela 10 estão apresentados os resultados da recuperação do MXS extraído com 5 mL de metanol do EC aderido as fitas adesivas, na Tabela 11 estão os valores de recuperação do fármaco a partir da EP e na Tabela 12 encontram-se os valores de recuperação do fármaco dos folículos pilosos.

Tabela 10. Porcentagem de recuperação do MXS do EC utilizando metanol como solvente extrator.

Concentração MXS ($\mu\text{g/mL}$)	Quantidade recuperada de MXS (μg)	% Recuperada de MXS
0,5	$0,49 \pm 0,03$	98,26
1,5	$1,26 \pm 0,22$	84,45
3	$2,77 \pm 0,50$	92,42

Tabela 11. Porcentagem de recuperação do MXS da EP utilizando metanol como solvente extrator.

Concentração MXS ($\mu\text{g/mL}$)	Quantidade recuperada de MXS (μg)	% Recuperada de MXS
0,5	$0,47 \pm 0,05$	99,97
1,5	$1,33 \pm 0,08$	85,91
3	$2,45 \pm 0,12$	80,50

Tabela 12. Porcentagem de recuperação do MXS do folículo piloso utilizando metanol como solvente extrator.

Concentração MXS ($\mu\text{g/mL}$)	Quantidade Recuperada de MXS (μg)	% Recuperada de MXS
0,5	$0,44 \pm 0,01$	88,33
1,5	$1,32 \pm 0,04$	88,29
3	$2,74 \pm 0,14$	91,63

O processo de extração do MXS das camadas pele mostrou-se eficiente dentro do intervalo de linearidade (0,5 a 3,0 $\mu\text{g/mL}$) do método analítico validado por CLAE-UV. A recuperação do fármaco foi realizada com porcentagens de erro que estão dentro do limite aceito para a validação de métodos envolvendo processos extrativos ($\pm 15\%$) (CAUSON, 1997), semelhante ao método validado anteriormente para o mesmo fármaco (GELFUSO et al., 2011). Desta forma, garante-se que a metodologia padronizada é adequada para quantificação do MXS presente no EC, na EP e nos folículos pilosos.

5.7 Determinação do fluxo de permeação passiva do MXS a partir da NQ-MXS e do gel-NQ-MXS

O termo difusão passiva é usado para descrever a passagem de moléculas (fármaco) através de uma membrana que não participa ativamente no processo. Os fármacos absorvidos de acordo com esse fenômeno são ditos serem absorvidos passivamente. O processo de absorção é comandado pelo gradiente de concentração através da membrana, com passagem das moléculas do fármaco ocorrendo primariamente a partir do lado de maior concentração. A maioria dos fármacos atravessam as membranas biológicas por difusão (ANSEL, 2007).

A difusão passiva é descrita pela primeira lei de Fick, que descreve que a velocidade de difusão ou transporte através da membrana (dy/dx) é proporcional à diferença na concentração do fármaco em ambos os lados da membrana.

$$- \quad) \quad (\text{Equação 5}),$$

onde: C_1 e C_2 são as concentrações de fármaco de cada um dos lados da membrana e P é a constante ou coeficiente de permeabilidade.

Em uma terapia tópica dermatológica, em que o efeito do fármaco aplicado deve ocorrer diretamente no local de aplicação, após aplicação da formulação, grandes quantidades do fármaco devem penetrar a pele, atravessando o EC. Essa camada da pele age como uma barreira lipídica importante para a maioria dos fármacos, permitindo a absorção de substâncias lipossolúveis por difusão passiva, enquanto substâncias insolúveis nos lipídeos se difundem com muita dificuldade através dela (ANSEL, 2007).

O desenvolvimento de novos sistemas de liberação de fármacos, como por exemplo, micropartículas, lipossomas e nanopartículas, estão sendo cada vez mais estudados como veículos para aplicação tópica (GELFUSO et al., 2013). Alguns estudos vem mostrando o uso de micropartículas e nanopartículas como sistemas de liberação capazes de se acumular nos folículos pilosos, pois esta parece ser a principal via de penetração dessas partículas. Micro e nanopartículas, portanto, atuariam como um reservatório de fármaco, que aos poucos é liberado no seu sítio de ação (MEIDAN et al., 2005; GELFUSO et al., 2011; GELFUSO et al., 2013 SMIJS e BOUWSTRA, 2010). Tendo isso em vista, foram preparadas nanopartículas de quitosana contendo o MXS, com o objetivo de direcionar e sustentar a liberação deste fármaco na base dos folículos pilosos, na tentativa de melhorar a terapia da alopecia androgênica.

Os estudos de permeação cutânea foram realizados *in vitro* por diferentes períodos com quatro diferentes formulações. Após esses tempos experimentais, o MXS que penetrou os folículos pilosos foi recuperado e os valores estão apresentados na Figura 30.

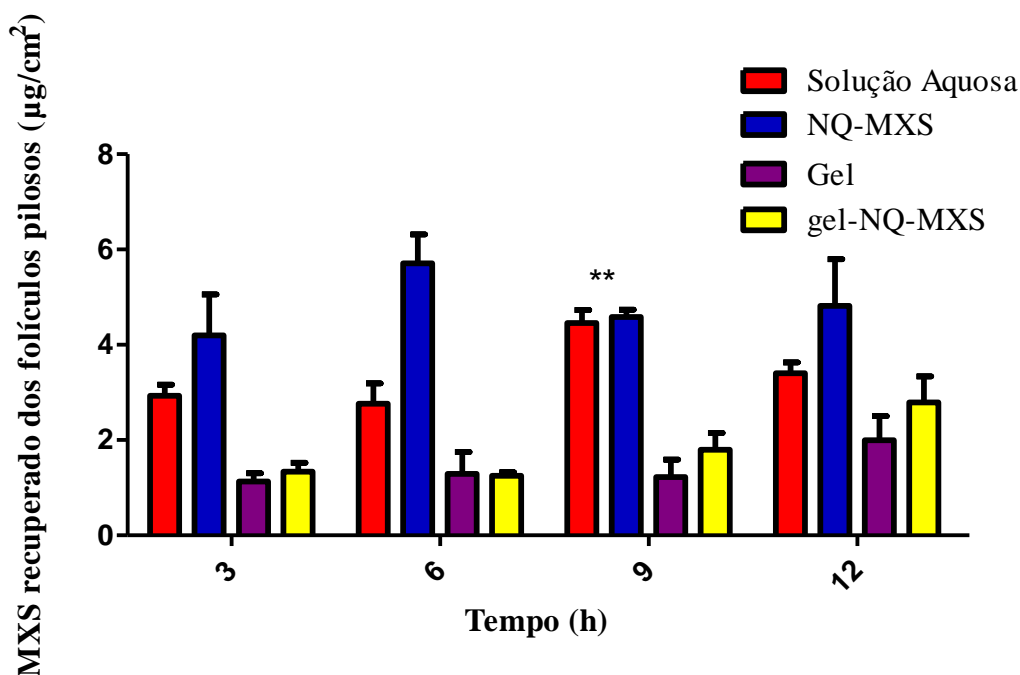


Figura 30. Quantidade de MXS recuperada dos folículos pilosos após 3h, 6h, 9h e 12 h de aplicação passiva das formulações NQ-MXS e gel-NQ-MXS, pH 5,5, e seus respectivos controles. As barras representam a média \pm desvio padrão da média de pelo menos 4 determinações. ** Quantidades significativamente iguais ($p < 0,05$).

As nanopartículas direcionaram o MXS para os folículos pilosos rapidamente, já a partir das primeiras 3 h de experimento, aumentaram a retenção do fármaco no local cerca de 1,4 vezes na terceira hora de estudo e cerca de 2 vezes na sexta hora de estudo quando comparado a uma solução controle. Se levarmos em consideração que a formulação NQ-MXS sustentou a liberação do fármaco, apresentando um fluxo de liberação 5 vezes menor que o controle, esses resultados de permeação mostram a habilidade das nanopartículas em direcionar a liberação do fármaco para os folículos pilosos. Gelfuso (2009) avaliou a retenção folicular de MXS após administração de uma formulação contendo o fármaco microencapsulado e demonstrou que o sistema obtido foi capaz de promover um aumento significativo de seis vezes na retenção folicular do fármaco de maneira significativa ($p < 0,05$) após 6 h de experimento. A formulação nanoestruturada, portanto, teve um desempenho três vezes menor que a desenvolvida por Gelfuso (2009) em termos de quantidade de fármaco recuperado do folículo. Deve-se considerar, no entanto, que a formulação desenvolvida por aquele pesquisador continha uma concentração 10 vezes maior do fármaco e uma quantidade relativamente alta de etanol na formulação. A nanoestruturação da formulação, portanto, permite um rápido aumento e direcionado aumento da liberação de MXS no folículo de

maneira significativa, com redução na quantidade de fármaco na formulação, o que significa menores custos em seu processo produtivo, e eliminação do uso de etanol para suspender as partículas, garantindo a segurança da formulação ao longo do tempo de uso pelo paciente.

A partir da nona hora de experimento, o acúmulo de MXS nos folículos passou a não ser diferente daquele promovido pela solução controle ($p < 0,05$), porém, na décima segunda hora de experimento já se é possível notar que a solução aquosa controle passou a não ser capaz de manter a mesma concentração de fármaco no local, enquanto as nanopartículas mantiveram a concentração do fármaco constante no local.

Os valores de quantidade de MXS retido nos folículos pilosos na formulação gel-NQ-MXS quando comparados ao seu controle não mostraram diferença significativa e mostraram ser inferiores aos de MXS liberados a partir das NQ-MXS, indicando que o gel das nanopartículas (gel-NQ-MXS), apesar de liberarem o fármaco de maneira semelhante à NQ-MXS, não deve permitir que essas estruturas interajam rapidamente com os folículos pilosos.

Esses resultados devem significar que, para interagir com os folículos pilosos, as nanopartículas precisam não só liberar o fármaco como sofrer sedimentação na própria formulação para que possam atingir rapidamente os folículos pilosos e liberar o fármaco no local.

A velocidade de sedimentação das partículas de uma suspensão é representada pela lei de Stokes:

$$v = \frac{g(\rho_p - \rho_m)d^2}{18\eta}$$

onde: dx/dt é a velocidade de sedimentação, d é o diâmetro das partículas, ρ_p a densidade das partículas, ρ_m é a densidade do meio, g é a constante gravitacional e η é a viscosidade do meio.

É evidente, a partir da equação, que a velocidade de sedimentação é maior para partículas grandes do que menores, quando todos os outros fatores permanecerem constantes. Quando há a redução dos tamanhos das partículas a velocidade de sedimentação diminui (ANSEL, 2007). Portanto, a viscosidade do gel prejudicou a rápida sedimentação das nanopartículas impedindo a interação delas com a pele.

O pH da formulação é um dos fatores que influenciam a permeação passiva do MXS. Isso ocorre porque a variação do pH da formulação doadora pode afetar o grau de ionização da própria molécula do fármaco. Gelfuso et al. (2011) demonstraram que em pH maiores de 4,5, que correspondem ao pKa da molécula de MXS, o fármaco encontra-se menos ionizado.

Essa redução da forma ionizada do fármaco parece aumentar a permeação passiva à medida que aumenta a afinidade do fármaco pelo EC apolar, facilitando sua difusão em direção ao interior da pele. Por esta razão, todas as formulações desenvolvidas neste trabalho tiveram seus pHs corrigidos para 5,5. Esse pH, inclusive, é compatível com o pH da pele, não causando a ela irritação ou outro tipo de agressão com o passar do tempo (OHMANN e VAHLQUIST, 1998).

Os dados trazidos na Figura 31 permite analisar-se o efeito das nanopartículas de quitosana sobre a retenção do MXS no EC. O sistema nanoencapsulado não foi capaz de restringir a entrada do fármaco nesta camada da pele, em todas as formulações contendo o fármaco encapsulado ou não, promovendo retenções no EC em quantidades não diferentes significativamente ($p < 0,05$) em relação aos seus respectivos controles. Essas quantidades de MXS retidas no EC, no entanto, foram inferiores às obtidas por Gelfuso (2009) a partir da formulação contendo micropartículas de quitosana.

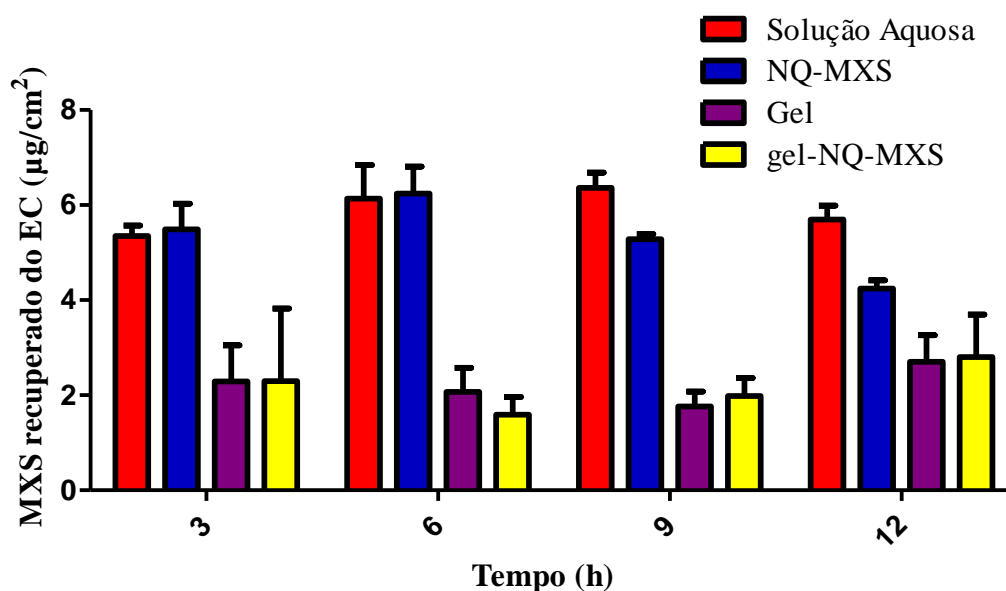


Figura 31. Quantidade de MXS retida EC em 3h, 6h, 9h e 12 h de permeação passiva, a partir das formulações NQ-MXS e gel-NQ-MXS, pH 5,5 e seus controles. As barras representam a média \pm desvio padrão da média de pelo menos 4 determinações.

Por fim, a Figura 32 mostra o perfil de retenção do MXS na EP a partir de todas as formulações estudadas por um período de até 12 h.

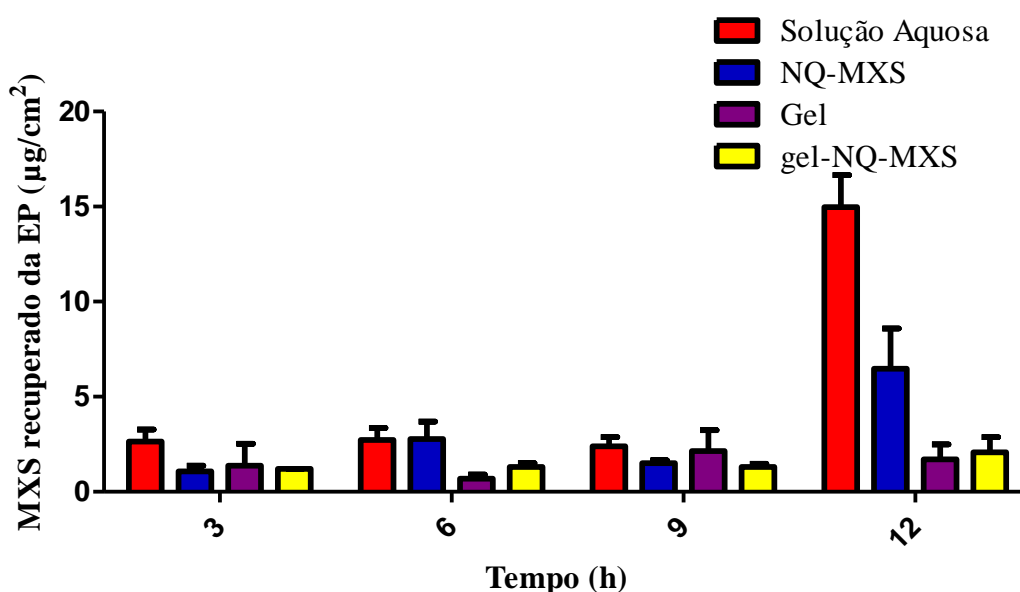


Figura 32. Quantidade de MXS retida EP em 3h, 6h, 9h e 12 h de permeação passiva, a partir das formulações NQ-MXS e gel-NQ-MXS, pH 5,5 e seus controles. As barras representam a média \pm desvio padrão da média de pelo menos 4 determinações.

Pela análise da Figura acima, nota-se que todas as formulações mantiveram o MXS nas camadas mais superficiais da pele, isto é, no EC, e somente a partir da décima segunda hora de estudo, houve um aumento significativo ($p < 0,05$) da retenção do MXS na EP, sendo após esse período a quantidade de MXS permeado a partir das NQ-MXS foi 2,31 vezes menor que o seu controle ($p < 0,05$). Aliado ao fato de que mesmo após 12 h de experimento o MXS não foi quantificado na solução receptora, esses resultados indicam que todas as formulações, principalmente as nanopartículas, mantiveram o MXS em seu local de ação, impedindo que ele fosse absorvido em grandes quantidades para as camadas mais profundas da pele. Alta taxa de permeação do fármaco pode significar alta toxicidade sistêmica que, no caso do MXS, poderia causar uma redução de pressão arterial por parte do paciente.

As nanopartículas desenvolvidas, especialmente quando formuladas na forma de suspensão aquosa líquida, apresentam como potencial para o tratamento tópico da alopecia, pois foram capazes de sustentar a liberação do MXS, aumentando rapidamente seu acúmulo nos folículos pilosos, se comparadas aos controles.

6. CONCLUSÕES

As nanopartículas de quitosana contendo MXS, NQ-MXS, desenvolvidas neste trabalho apresentaram-se como um sistema de liberação muito promissor para a terapia tópica da alopecia utilizando o MXS, pois foi capaz de aumentar rapidamente a quantidade de fármaco no seu local de ação e manter praticamente constante a concentração de MXS no local, além de restringir a entrada do fármaco para camadas mais profundas da pele. Ademais, esta formulação que não contém solvente orgânico em sua composição deve favorecer o uso prolongado do fármaco sem problemas de sensibilização da pele.

6.1 Resumo dos Resultados

- O método analítico proposto para quantificação do MXS por CLAE, bem como o processo de extração do fármaco das camadas da pele suína, foram validados adequadamente, garantindo a confiabilidade dos experimentos quantitativos;
- A determinação do coeficiente de solubilidade aquosa do MXS permitiu assegurar que todos os experimentos de liberação e permeação *in vitro* desse fármaco foram realizados dentro das condições de *sink*;
- As NQ-MXS e NQ desenvolvidas apresentaram forma esférica, diâmetro em torno de 300 nm, com polidispersividade adequada e potencial zeta ideal para garantir estabilidade física à nanodispersão;
- As nanopartículas de quitosana sustentaram aproximadamente 2 vezes a liberação do MXS através da pele, enquanto as formulações preparadas em forma de gel não o fizeram de forma significativa;
- A formulação NQ-MXS garantiu a entrada rápida de altas concentrações do fármaco nos folículos pilosos, seu alvo de ação, com máximo de retenção em 6 h de estudo, se comparado ao controle. Além disso, essa concentração de MXS no folículo foi mantida alta até pelo menos 12 h.
- O MXS não permeou a pele a partir das formulações propostas, o que deve evitar a ocorrência de efeitos adversos sistêmicos por parte do fármaco.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), RE N° 899, 2003.

ANSEL, H. C.; POPOVICH, N. G.; JR, L. V. Formas farmacêuticas e sistemas de liberação de fármacos. 8ª edição. Editora Artmed: São Paulo, 2007.

ARONSON, J. K. Minoxidil. In: Aronson, J.K. (Ed.), Meyler's Side Effects of Drugs: The International Encyclopedia of Adverse Drug Reactions and Interactions. Elsevier, Amsterdam, pp. 2354–2356, 2006.

ATRUX-TALLAU, N., FALSON, F., PIROT, F. Nanotherapeutics for skin diseases. In: Lamprecht, A. (Ed.), Nanotherapeutics: Drug Delivery Concepts in Nanoscience. Pan Stanford, pp. 125–161, 2009.

AULTON, M. E. Delineamento de formas farmacêuticas. 2ª edição. Editora Artmed: São Paulo, 2005.

BALAKRISHNAN, P. ; SHANMUGAN, S. ; LEE, W. ; LEE, W. O. ; KIM, J. O. ; OH, D. H. ; KIM, D. D. ; KIM, J. S. ; YOO, B. K. ; CHOI, H. G. ; WOO, J. S. ; YONG, C. S. Formulation and in vitro assessment of minoxidil niosomes for enhanced skin delivery. International Journal of Pharmaceutics n. 377, pp. 1–8, 2009.

BARROS, C. B. Validação de Métodos Analíticos. Biológico, Sao Paulo, v.64, n.2, pp. 175-177, 2002.

BIENOVÁ, M.; KUCEROVÁ, R.; FIURASKOVÁ, M.; HAJDÚCH, M.; KOLÁR, Z. Androgenic alopecia and current methods of treatment. Acta Dermatovenerologica Alpina, v. 14, n. 1, pp. 5-8, 2005.

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

BRANNON-PEPPAS, L.; SOEHL, K.; MONACO, M.D.; GARLICH, J.; PATTERSON, M.; SMITH, T.C. Nanoparticles for delivery of pifithrins to combat cell death due to chemotherapy and radiation Journal of Drug Delivery Science and Technology, v.14, n.4, pp.257-264, 2004.

BUHL A. E.; WALDON D.; BAKER, C. A.; JOHNSON, G. A. Minoxidil sulfate is the active metabolite that stimulates hair follicles. *Journal of Investigative Dermatology*, v. 95, n. 5, pp. 533-537, 1990.

BULASMED. Disponível em: < www.bulas.med.com.br > Acessado em: Setembro, 2014.

CALVO, P.; REMUNAN-LOPEZ, C.; VILA-JATO, J. L. e ALONSO, M. J. Novel hydrophilic Chitosan-Polyethylene Oxide Nanoparticles. *Journal of Applied Polymer Science*, 63, 125-132, 1997.

CAUSON, R. Validation of chromatographic methods in biomedical analysis: viewpoint and discussion. *Journal of Chromatography B*, v. 689, pp. 175-180, 1997.

DE JALON, E. G.; BLANCO-PRIETO, M. J.; YGARTUA, P.; SANTOYO, S. PLGA microparticles: possible vehicles for topical drug delivery. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 226, n. 1-2, pp. 181-184, 2001.

DURAN, N.; MATTOSO, L. H. C.; DE MORAES, P. C. Nanotecnologia: Introdução, preparação e caracterização de nanomateriais e exemplos de aplicação. Editora Artliber, 2006.

FAISANT, N.; SIEPMANN, J.; BENOIT, J.P. PLGA-based microparticles: elucidation of mechanisms and a new, simple mathematical model quantifying drug release. *European Journal of Pharmaceutical Sciences.*, v.15, n.4, pp.355-66, 2002.

FAN, W.; YAN, W.; XU, Z.; NI, H. Formation mechanism of monodisperse, low molecular weight chitosan nanoparticles by ionic gelation technique. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, v.90, pp.21-27, 2012.

FELDMANN, R. J.. MAIBACH, H.I. Regional variation in percutaneous penetration of 14C cortisol in man. *Journal of Investigative Dermatology*, v.48, pp.181-183, 1967.

FERNANDES, M. F. M.; FILGUEIRAS, C. A. L. Um panorama da nanotecnologia no Brasil (e seus macrodesafios). *Química Nova*, v. 31, n.8, pp.2205-2213, 2008.

FERNANDES, D. M. F.; *Cosmética Capilar: Estratégias de veiculação de ingredientes ativos*. Universidade Fernando Pessoa, 2013.

GAVINI, E.; CHETONI, P.; COSSU, M.; ALVAREZ, M.G.; SAETTONE, M.F.; GIUNCHEDI, P. PLGA microspheres for the ocular delivery of a peptide drug, vancomycin using emulsification/spray-drying as the preparation method: in vitro/in vivo studies. *European Journal Pharmaceutics Biopharmaceutics*. v.57, pp.207-12, 2004.

GELFUSO, G. M.; GRATIERI, T.; SIMÃO, P. S.; FREITAS, L. A. P.; LOPEZ, R. F. V. Chitosan microparticles for sustaining the topical delivery of minoxidil sulphate. *Journal of Microencapsulation*, v. 28, pp. 650-8, 2011.

GELFUSO, G. M.; GRATIERI, T.; DELGADO-CHARRO, M. B.; GUY, R. H.; LOPEZ, R. F. V. Iontophoresis-Targeted, follicular delivery of minoxidil sulfate for the treatment of alopecia. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, v.102, n.5, pp. 1488-1494, 2013.

GORECKI, D. K. *Analytical Profiles of Drugs Substances*, v.17, pp. 185, 1988.

GRATIERI, T.; GELFUSO, G. M. LOPEZ, R. F. V. Princípios básicos e aplicação da iontoforese na penetração cutânea de fármacos. *Química Nova*, v. 31, n. 6, pp. 1490-1498, 2008.

GRICE, J. E. ; CIOTTI, S. ; WEINER, N. ; LOCKWOOD, P. ; CROSS, S. E. ; ROBERTS, M. S. Relative Uptake of Minoxidil into Appendages and Stratum Corneum and Permeation through Human Skin In Vitro. *Journal of Pharmaceutical Science*, vol. 99, n. 2, 2010.

HARRIS, M. I. N. C. *Pele: Estrutura, propriedades e envelhecimento*. Editora Senac, 2009.

ING, L. Y.; ZIN, N. M.; SARWAR, A.; KATAS, H. Antifungal Activity of chitosan nanoparticles and correlation with their physical properties. *International Journal of Biomaterials*, pp. 1-9, 2012.

NBR ISO/IEC 17.025. Requisitos gerais para a competência de laboratórios de ensaio e calibração, 1999.

JUNIOR, A. C. L. e PADOVEZ, F. Incidência de alopecia androgenética em mulheres portadoras de Síndrome dos Ovários Policísticos. *Medicina Cutânea Ibero-Latino-Americana*, v.34, n.6, pp. 275-278, 2006.

KIM, B. Y. S.; JAMES, T. R.; CHAN, W. C. W. Nanomedicine. *The New England Journal of Medicine*, vol. 363, n. 25, pp. 2434-2443, 2010.

KUDLACEK, P. E.; CLEMENS, D. L.; ANDERSON, R. J. Characterization of recombinant human liver thermolabile phenol sulfotransferase with minoxidil as the substrate. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, v. 210, n. 2, pp. 363-369, 1995.

LADEMANN, J.; RICHTER, H.; TEICHMANN, A.; OTBERG, N.; BLUME-PEYTAVI, U.; LUENGO, J.; Nanoparticles – An efficient carrier for drug delivery into the hair follicles. *European Journal*, v.66, pp. 159-164, 2007.

LAUER, A. C. ; LIEB, L. M. ; RAMACHANDRAN, C. ; FLYNN, G. L. ; WEINER, N. D. Transfollicular Drug Delivery. *Pharmaceutical research*, v. 12, n. 2, pp. 179-186, 1995.

MEDEIROS, K. A. Desenvolvimento e testes *in vitro* de nanopartículas de quitosana e para liberação controlada de peptídeos antitumorais. Dissertação de mestrado submetida ao programa de pós-graduação em biologia animal da Universidade de Brasília, 2011.

MEIDAN, V. M.; BONNER, M. C.; MICHINIAK, B. B. Transfollicular drug delivery-is it a reality? *International Journal of Pharmaceutics*. v. 306, pp. 1–14, 2005.

MOSER, K.; KRIWET, K.; NAIK, A.; KALIA, Y. N.; GUY, R. H. Passive skin permeation enhancement and its quantification *in vitro*. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, v. 52, pp. 103-112, 2001.

MOHAMMADPOUR, D. N.; ESKANDARI, R.; AVADI, M. R.; ZOLFAGHARIAN, H.; MOHAMMAD, S. A.; REZAYAT, M. Preparation and *in vitro* characterization of chitosan nanoparticles containing *Mesobuthus eupeus* scorpion venom as an antigen delivery system. *The Journal of venomous animals and toxins including tropical diseases*, v. 18, pp. 44-52, 2012.

MURA, S. ; MANCONI, M. ; SINICO, C. ; VALENTI, D. ; FADDA, A. M. Penetration enhancer-containing vesicles (PEVs) as carriers for cutaneous delivery of minoxidil. *International Journal of Pharmaceutics* n. 380, pp.72–79, 2009.

NAFEE, N.; TAETZ, S.; SCHNEIDER, M.; SCHAEFER, U. F.; LEHR, C.-M. Chitosan-coated PLGA nanoparticles for DNA/RNA delivery: effect of the formulation parameters on complexation and transfection of antisense oligonucleotides. *Nanomedicine: Nanotechnology Biology and Medicine*, v. 3, pp.173–183, 2007.

NAGPAL, K.; SINGH, S. K. e MISHRA, D. N. Chitosan Nanoparticles: A Promising System in Novel Drug Delivery. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, n. 11, vol. 58, pp. 1423-1430, 2010.

OGISO, T.; IWARI, M.; PAKU, T. Effects of various enhancers on transdermal penetration of indomethacin and urea, as relationship between penetration parameters and enhancement factors. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 84, n. 4, pp.482-488, 2004.

OHMAN, H.; VAHLQUIST, A.; The pH gradient over the stratum corneum differs in X-linked recessive and autosomal dominant ichthyosis: a clue to the molecular origin of the acid skin mantle?. *Journal of Investigative Dermatology*, v. 7, pp. 111-647, 1998.

- PADOIS, K.; CANTIÉNI, C. ; BERTHOLLE, V. ; BARDEL, C. ; PIROT, F. ; FALSON, F. Solid lipid nanoparticles suspension versus commercial solutions for dermal delivery of minoxidil. *International Journal of Pharmaceutics*, n. 416, p. 300– 304, 2011.
- PAN, Y.; LI, Y.; ZHAO, H.; ZHENG, J.; XU, H.; WEI, G.; HAO, J.; CUI, F. Chitosan nanoparticle improve the intestinal absorption of insulin in vivo. *International Journal of Pharmacy*, v.249, pp. 139-147, 2002.
- PAPAKOSTAS, D.; RANCAN, F.; STERRY, W.; BLUME, U. VOGT, A. Nanoparticles in dermatology. *Archives of Dermatological Research* vol. 303, pp. 533–550, 2011.
- PARIKH, R.H.; PARIKH, J.R.; DUBEY, R.R.; SONI, H.N.; KAPADIA, K.N. Poly(D,L-lactide-co-glycolide) microspheres containing 5-fluorouracil: optimization of process parameters. *American Association of Pharmaceutical Scientists*, v. 4, n. 2, p. 13, 2003.
- PEER, D.; KARP, J. P.; HONG, S.; FAROKHZAD, O. C.; MARGALIT, R.; LANGER, R. Nanocarriers as an emerging platform for cancer therapy. *Nature Nanotechnology*, v.2, n.751, pp.60, 2007.
- PEREZ, M. A. F Validação de Métodos Analíticos: Como Fazer? Porque ela é importante? *ITAL (Instituto de Tecnologia de alimentos)*, v. 22, n.3, 2010.
- POZEBON, D.; DRESSLER, V. L.; CURTIUS, A. J. Análise de cabelo: Uma revisão dos procedimentos para a determinação de elementos traço e aplicação. *Química Nova*, v. 6, n. 22, pp. 839-846, 1998.
- QUN, G.; AJUN, W. Effects of molecular weight, degree of acetylation and ionic strength on surface tension of chitosan in dilute solution. *Carbohydrate Polymers*, v. 64, pp. 29-36, 2006.
- PROW, T. A. ; GRICE, J. E. LIN, L. L. ; FAYE, R.; BUTLER, M.; BECKER, W.; WURM, E. M. T.; YOONG, C.; ROBERTSON, T. A.; SOYER, H. P.; ROBERTS, M. S. Nanoparticles and microparticles for skin drug delivery. *Advanced Drug Delivery Reviews* v. 63, pp. 470–491, 2011.
- RIBANI, M.; BOTTOLI, C. B. G.; COLLINS. C. H.; JARDIM, I. C. S. F.; MELOL, F.C.M. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. *Quim. Nova*, v. 27, n. 5, pp.771-780, 2004.
- RIVERA, P. A.; MARTINEZ-OHARRIZ, M.C.; RUBIO, M.; IRACHE, J.M.; ESPUELAS, S. Fluconazole encapsulation in PLGA microspheres by spray-drying. *Journal of Microencapsulation*, v. 21, n. 2, p.203-11, 2004.

ROGERS, N. E e AVRAM, M. R. Medical Treatments for male and female pattern hair loss. *Journal American Dertmatology*, v. 59, n. 4, pp. 547-566, 2008.

SCHAFFER, K. M.; MEHNERT, W; KORTING, H. C. Lipid nanoparticles for improved topical application of drugs for skin diseases. *Advanced Drug Delivery Review*, v. 59, pp. 427- 443, 2007.

SCHMIDT. N.; GANS, E.H. Clindamycin 1.2% tretinoin 0.025% gel versus clindamycin gel treatment in acne patients: a focus on fitzpatrick skin types. *Journal of Clinical Aesthetic Dermatology*, v. 4, n. 6, pp.31-40.

SINCLAIR, R. Male Pattern androgenetic alopecia. *British Medical Journal*, n. 9, pp 317-865, 2004.

SHAH, P. P; MASHRU, R. C.; THAKKAR, A. R.; BADHAN, A. C. Effect of chitosan crosslinking on bitterness of artemether using response surface methodology. *Journal Pharmacy and Pharmacology*, v. 60, n .4, pp.421-427, 2008.

SHAPIRO, J. Safety of topical minoxidil solution: a one-year, prospective, observational study. *Journal of Cutaneous Medicine and Surgery*, v. 7, n. 4, pp. 322-329, 2003.

SHEU, M. T.; WU. A. B.; LIN, K. P.; SHEN, C. H.; HO, H. O. Effect of tocopheryl polyethylene glycol succinate on the percutaneous penetration of monoxidil from water/ethanol/polyethylene glycol 400 solutions. *Drug Developente and Industrial Pharmacy*, v.32, n.5, pp. 595-607, 2006.

SHIM, J.; SEOK, K. H.; PARK, W. S. ; HAN, S. H. ; KIM, J. ; CHANG, I.S Kim J. Transdermal delivery of mixnoxidil with block copolymer nanoparticles. *Journal of Control and Release*, v. 97, pp. 477- 484, 2004.

SHORTER, K. ; FARJO, N. P. ; PICKSLEY, S. M. ; RANDALL, V. A. Human hair follicles contain two forms of ATPsensitive potassium channels, only one of which is sensitive to minoxidil. *The Journal of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, v. 22, pp. 1725-1726, 2008.

SHU, X. Z.; ZHU, K. J. The influence of multivalent phosphate structure on the porporties of ionically cross-linked chitosan films for controlled drug release. *European Journal of Pharmaceuticals and Biopharmaceuticals*, v. 54, pp. 235-243, 2002.

TEICHMANN, A.; JACOBI, U.; OSSADNIK, M.; RICHTER, H.; KOCH, S.; STERRY, W.; LADEMANN, J. Differential stripping: determination of the amount of topically applied

substances penetrated into the hair follicles. *Journal of Investigative Dermatology*. v. 125, pp. 264-269, 2005.

THE MERCK INDEX. 12nd ed., Merck & Company, Rathway, 1987.

VOGT, A.; MANDT, N.; LADEMANN, J.; SCHAEFER, H.; BLUME-PEYTAVI, U. Follicular targeting – A promising tool in selective dermatoterapia. *Journal of Investigative Dermatology*, v. 10, pp. 252-255, 2005.

WOOSICKA, H. e CAL, K. Targeting to the hair follicles: Current status and potential. *Journal of Dermatological Science*, n. 57, p. 83–89, 2010.

XIA, Y.; XIONG, Y. J.; LIAM, B.; SKRABALAK, S. E. Shape-controlled synthesis of metal nanocrystals: simple chemistry meets complex physics? *Angewandte Chemie International Edition*, v.48, n.60, pp.103, 2009.