

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

CAMILA YUMI USHIROBIRA

**DESENVOLVIMENTO DE NANOPARTÍCULAS POLIMÉRICAS CONTENDO
DUTASTERIDA PARA O TRATAMENTO DA ALOPECIA ANDROGÊNICA**

**BRASÍLIA
2019**

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

CAMILA YUMI USHIROBIRA

**DESENVOLVIMENTO DE NANOPARTÍCULAS POLIMÉRICAS CONTENDO
DUTASTERIDA PARA O TRATAMENTO DA ALOPECIA ANDROGÊNICA**

Dissertação apresentada como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas pelo programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade de Brasília

Orientadora: Profa. Dra. Taís Gratieri

Coorientador: Prof. Dr. Guilherme M. Gelfuso

**BRASÍLIA
2019**

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

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

Ud Ushirobira, Camila Yumi
DESENVOLVIMENTO DE NANOPARTÍCULAS POLIMÉRICAS CONTENDO
DUTASTERIDA PARA O TRATAMENTO DA ALOPECIA ANDROGÊNICA /
Camila Yumi Ushirobira; orientador Tais Gratieri; co
orientador Guilherme Martins Gelfuso. -- Brasília, 2019.
80 p.

Dissertação (Mestrado - Mestrado em Ciências
Farmacêuticas) -- Universidade de Brasília, 2019.

1. Alopecia androgênica. 2. inibidores da 5-alfa
redutase . 3. dutasterida . 4. nanopartículas poliméricas .
5. direcionamento aos folículos pilosos. I. Gratieri, Tais,
orient. II. Martins Gelfuso, Guilherme , co-orient. III.
Título.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Camila Yumi Ushirobira

Título do trabalho: Desenvolvimento de nanopartículas poliméricas contendo dutasterida para o tratamento da alopecia androgênica

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

Aprovada em: 02 de agosto de 2019

Banca Examinadora

Profa. Dra. Taís Gratieri
Universidade de Brasília

Profa. Dra. Maria de Fátima Borin
Universidade de Brasília

Dra. Luana Alves de Freitas Afiune

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, gostaria de agradecer à Deus por me proporcionar a bênção de estar com saúde e cheia de vida para conseguir correr atrás dos meus sonhos e por me iluminar em todos os meus passos.

Aos meus antepassados por me proporcionarem tudo que sou hoje e por terem lutado constantemente para dar aos seus filhos condições melhores de vida.

A minha mãe, Regina, meu pai, César e minha irmã Renata por todo incentivo, suporte e carinho ofertado até os dias de hoje. Sem vocês nada seria possível, sou eternamente grata!

A minha segunda mãe, minha vó Massako, por me passar tanta sabedoria, me apoiar, se preocupar sempre comigo e por ser minha companheira de todos os momentos sejam eles de felicidade ou de tristeza. Você é minha inspiração de vida! Uma pessoa extremamente atenciosa com todos e que sabe partilhar todo o seu amor entre os filhos e netos.

Aos meus tios Orlando, Guilherme, Massato, Shiro, Isao e as minhas tias Midori, Lilian, Megumi, Luiza, Suely e Tomi por estarem sempre me apoiando, me aconselhando e sempre estar de prontidão para me ajudar nas adversidades que surgirem. A todos meus primos, Gabriel, Rafael, Carol, Bruna, Pedro, Isabel, Tiago, Hiro, Eri, Keith, Karin, Alex e Takashi por todo carinho e amor concedido a mim.

Ao meu namorado Kalil, por ter tanta compreensão, paciência e por ter me ajudado tanto. Me ensina todos os dias que devemos viver um dia de cada vez e aproveitar o presente.

A dona Nonata por me conceder momentos de descontração, me ajudar e sempre estar presente.

À família vôlei do Clube Nipo Brasileiro pela amizade e por me proporcionar momentos com muita adrenalina.

A minha orientadora, Profa. Dra. Taís Gratieri, por ter me concedido a oportunidade única de realizar meu mestrado na UnB que propiciou um aprendizado ímpar na área de pesquisa em nanotecnologia.

Aos professores, Dr. Guilherme Gelfuso e Dr. Marcílio Cunha-Filho que contribuíram para o meu aprendizado, sempre solícitos as minhas dúvidas, esclarecendo-as da melhor forma possível.

Ao técnico do LTMAC, Thiago por sempre estar à disposição para dúvidas que surgiram ao decorrer do mestrado.

A todos os integrantes do LTMAC pelo apoio, incluindo os alunos estagiários e de iniciação científica, bem como os ex-membros do laboratório, Ana Christina, Ana Clara, Bárbara, Camila, Devana, Felipe, Fernando, Geisa, Giselly, Ihatandersson, Jessica Thalita, Jessyka, Larissa, Letícia, Lorena, Ludmila, Maíra Miranda, Maíra Nunes, Maíra Teixeira, Natane, Paula, Pedro, Seila, Tamara, Thaiene e Wanessa. Em especial à mestranda Amanda Malini, pelo carinho e por ter me ajudado na concretização de experimentos.

A professora Maria Aparecida Godoy Soler e aos Nanoworkers do Laboratório de Nanofilmes e Nanodispositivos (LNNano) do Instituto de Física: Aline, Larissa e Luísa por terem nos ajudado ao longo do período. Em especial, à Débora pela amizade e por ter apoiado na realização de experimentos e no uso de equipamentos.

À Ingrid do Laboratório de Microscopia e Microanálise do Instituto de Ciências Biológicas por ter me auxiliado na obtenção das imagens microscópicas.

Ao Elias do Laboratório de Toxicologia do Instituto de Ciências Biológicas por prontamente se dispor a secar minhas amostras.

Ao Hermano e a Isis do CNANO no Instituto de Física por ter me auxiliado na leitura das amostras através da espectroscopia de refletância total atenuada (ATR).

À Laís do Laboratório de Farmacognosia da Faculdade de Saúde por ter me ajudado, gentilmente, na rotaevaporação das nanopartículas. Bem como, todos alunos do laboratório e a Profa. Dra. Lorena Albernaz por ter cedido o espaço para que eu pudesse concluir a produção das nanopartículas.

Ao Gabriel, André e Sr. Carlos do Laboratório de Ensino de práticas de farmácia, por ter me emprestado algumas vidrarias e aparelhos que me auxiliaram na conclusão dos experimentos.

Ao Aluísio e a técnica Renata do Laboratório de Genética da Faculdade de Saúde que gentilmente me permitiram utilizar a ultracentrífuga refrigerada, mesmo fazendo um barulho terrível. Sou eternamente grata!

À técnica Júlia do Laboratório de Controle de Qualidade de Medicamentos e a todos os alunos por terem me ajudado, sempre que precisei, durante todo o mestrado.

Ao Ms. Ricardo por ter me concedido inúmeros conselhos e proporcionado muitas gargalhadas em momentos tensos e que com sua sabedoria pude aprender bastante sobre a nanotecnologia.

Ao prof. Dr. Breno que com sua experiência me conduziu sabiamente e generosamente quando entrei no LTMAC. Seus conhecimentos foram de extrema importância para que pudesse imergir no mundo da nanociência.

À Dra. Luana, amiga-irmã, por ter vivenciado comigo todos os momentos do mestrado, desde o início, me ajudando a realizar os experimentos e compartilhando comigo todo o seu conhecimento. Seu apoio técnico, científico, acadêmico, pessoal e psicológico, propiciou a conclusão desse trabalho de uma forma única.

À família inteira da Luana, Kalley, Fernando, Jorge, Ester, Saulo e Junior por terem me acolhido com tanto carinho e amor. Vocês são uma família abençoada, pela qual tenho uma admiração imensa que vou levar para o resto da vida!

A minha querida amiga Vivian Cintra por todos esses anos de amizade, desde o ensino médio. E que coincidentemente, ou não, estava cursando pós-graduação na Universidade de São Paulo ao mesmo tempo que eu. Assim, trocamos experiências e compartilhamos muitos momentos.

Aos meus queridos amigos, Gabriela Castro, Felipe Rodrigues, e Thayane Moreira por terem me acompanhado nessa jornada e por todo carinho e amizade formados através do Ciência sem Fronteiras, programa com financiamento da CAPES e CNPq.

A minha segunda casa, Universidade de Brasília, por me acolher desde a graduação até os dias de hoje e me proporcionar oportunidades ímpares.

Às empresas Bonasa e Nipobras por ter cedido o material necessário para o desenvolvimento dos experimentos de permeação *in vitro*. E posteriormente, à Loiane da Sabugy por ter atendido aos nossos pedidos.

Às fontes de fomento, FAPDF e CNPq, pelos auxílios financeiros indispensáveis para o desenvolvimento desse trabalho.

À Coordenação de Apoio à Pessoa de Nível Superior (CAPES) pela concessão de bolsa de mestrado.

“Live as if you were to die tomorrow.
Learn as if you were to live forever.”

Mahatma Gandhi

RESUMO

USHIROBIRA, CAMILA YUMI Desenvolvimento de nanopartículas poliméricas contendo dutasterida para o tratamento da alopecia androgênica. Brasília, 2019. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade de Brasília, Brasília, 2019.

Nesse trabalho foram desenvolvidas e caracterizadas nanopartículas poliméricas com e sem revestimento de quitosana incorporando o fármaco dutasterida (DUTA) para o direcionamento ao folículo piloso como estratégia para o tratamento da alopecia androgênica. O método analítico foi validado de acordo com os parâmetros de linearidade, especificidade/seletividade, precisão, exatidão. O método mostrou-se linear, seletivo, preciso e exato na faixa de concentração de $0,5\mu\text{g/mL}$ a $15\mu\text{g/mL}$. As nanopartículas sem revestimento de quitosana apresentaram formato esférico, diâmetro médio de $202,7\pm 0,4$ nm, índice de polidispersão (PDI) igual a $0,102\pm 0,03$ e um potencial zeta (ζ) de $-13,63\pm 0,64$ mV, enquanto que as nanopartículas revestidas com quitosana também apresentaram formato esférico sendo o diâmetro médio de $232,36\pm 2,02$ nm, índice de polidispersão (PDI) igual a $0,229\pm 0,009$ e um potencial zeta (ζ) de $+40,16\pm 1,22$ mV. A permeação *in vitro* foi avaliada em relação à quantidade de DUTA retida no estrato córneo, folículo piloso e na epiderme viável. Através do cálculo do fator de direcionamento aos folículos, a permeação com aplicação do estímulo mecânico potencializou o direcionamento das nanopartículas com e sem revestimento de quitosana em duas vezes quando comparadas à permeação passiva. Ambas nanopartículas demonstraram uma capacidade similar em penetrar no folículo piloso em todos os tempos de permeação realizados. Por fim, as nanopartículas poliméricas contendo ou não revestimento de quitosana demonstraram ser bons nanocarreadores tópicos da dutasterida, apresentando elevada eficiência de encapsulação, estabilidade, liberação controlada, permeação e retenção do fármaco nas camadas da pele indicando o potencial dessas no tratamento da alopecia androgênica.

Palavras-Chave: alopecia androgênica; nanopartículas poliméricas; quitosana; dutasterida; administração tópica; inibidores da 5-alfa redutase.

ABSTRACT

USHIROBIRA, CAMILA YUMI Development of polymeric nanoparticles containing dutasteride for treatment of androgenic alopecia. Brasília, 2019. Dissertation (Master) – Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade de Brasília, Brasília, 2019.

In this work, we developed and characterized chitosan coated and uncoated polymeric nanoparticles incorporating dutasteride (DUTA) to target the hair follicles as a strategy for treatment of androgenic alopecia. The analytical method was validated according to the parameters of linearity, specificity / selectivity, precision, accuracy. The method was linear, selective, precise and accurate in concentration range from 0.5µg/mL to 15µg/mL. Uncoated chitosan nanoparticles had spherical shape, average diameter of 202.7±0.4nm, polydispersion index (PDI) equal to 0.102±0.03 and a zeta potential (ζ) of -13.63±0,64 mV, while chitosan-coated nanoparticles also had a spherical shape with a mean diameter of 232.36±2.02nm, a PDI of 0.229±0.009 and a zeta potential (ζ) of +40.16±1.22 mV. *In vitro* permeation was evaluated in relation to the amount of DUTA retained in *stratum corneum*, hair follicle and viable epidermis. By calculating the targeting factor to hair follicles, permeation with application of mechanical stimulation enhanced targeting of chitosan coated and uncoated nanoparticles by two-fold compared to passive permeation. Both nanoparticles demonstrated a similar ability to penetrate hair follicle at all permeation times performed. Finally, polymeric nanoparticles with or without chitosan coating proved to be good topical dutasteride nanocarriers, presenting high encapsulation efficiency, stability, controlled release, permeation and retention in skin layers indicating their potential in treatment of androgenic alopecia.

Keywords: androgenic alopecia; polymer nanoparticles; chitosan; dutasteride; topical administration; inhibitors of 5-alpha reductase.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Camadas da pele: epiderme, derme e hipoderme (adaptado de https://www.todamateria.com.br/pele-humana/).....	4
Figura 2. Camadas da epiderme: Camada córnea, lúcida, granulosa, espinhosa e basal. (adaptado de Junqueira; Carneiro, 2008).	5
Figura 3. Ciclo de crescimento capilar (adaptado de https://www.superdicasartvitta.com.br/2017/03/ciclo-de-vida-do-cabelo/).....	6
Figura 4. Fórmula estrutural da finasterida (Peso molecular 372,553 g/mol).	9
Figura 5. Fórmula estrutural da dutasterida (Peso molecular 528,539 g/mol).	11
Figura 6. Vias de permeação de fármacos pela pele: via transcelular e intercelular (adaptado de MOSER et al., 2001).	14
Figura 7. Penetração de partículas através do folículo piloso (PEREIRA et al., 2018).	17
Figura 8. Fórmula estrutural da Policaprolactona.....	19
Figura 9. Fórmula estrutural da quitosana (AHMED; ALJAEID, 2016).	20
Figura 10. Ensaio de liberação da DUTA.	27
Figura 11. Ensaio de permeação por célula de Franz modificada.....	28
Figura 12. Espectro de absorvância no UV/Vis de uma solução em metanol a 100µg/mL. Faixa de varredura: 200 a 600nm.	30
Figura 13. Cromatogramas referentes à injeção de uma solução de DUTA (7,5 µg/mL) em metanol e os interferentes da pele (EC, FP, EP).....	31
Figura 14. Cromatogramas referentes à injeção de uma solução de DUTA (7,5 µg/mL) em metanol, meio e dos componentes das nanopartículas (NPs).	32
Figura 15. Representação gráfica da curva analítica obtida para a DUTA por CLAE. Concentrações diluídas de metanol. Equação da reta: $y = 8000,9x - 157,9$ e coeficiente de correlação linear: $r^2 = 0,999$	33
Figura 16. Representação gráfica da curva analítica obtida para a DUTA por CLAE. Concentrações diluídas em meio. Equação da reta: $y = 1000,2x+450,14$ e coeficiente de correlação linear: $r^2 = 0,998$	33
Figura 17. Fotomicrografia das NPY (A) e NPYQS (B) obtidas por microscopia eletrônica de transmissão.....	38

Figura 18. Comparação da eficiência de encapsulação da partícula com e sem QS entre Temperatura ambiente e geladeira a 4000 rpm.	39
Figura 19. Comparação da eficiência de encapsulação da partícula com e sem QS em diferentes rotações (rpm).	40
Figura 20. Diâmetro hidrodinâmico das NPYQS e NPY por 90 dias em temperatura ambiente e geladeira.	41
Figura 21. Índice de polidispersão das NPYQS e NPY por 90 dias em temperatura ambiente e geladeira.	42
Figura 22. Potencial zeta das NPYQS e NPY por 90 dias em temperatura ambiente e geladeira.	42
Figura 23. Eficiência de encapsulação das NPYQS e NPY por 90 dias em temperatura ambiente e geladeira.	43
Figura 24. Perfil de liberação da DUTA a partir do CTY, NPY e NPYQS contendo 125µg/mL do fármaco, pH 4,7.	45
Figura 25. Quantidade de DUTA retida no EC em 6h, 6h com massagem e 12 horas de permeação passiva a partir das NPY-QS, NPY e do CTY (média ± DP, n = 6).	47
Figura 26. Quantidade de DUTA retida no FP em 6h, 6h com massagem e 12 horas de permeação passiva a partir das NPY-QS, NPY e do CTY (média ± DP, n=6)	47
Figura 27. Quantidade de DUTA retida no EP em 6h, 6h com massagem e 12 horas de permeação passiva a partir das NPY-QS, NPY e do CTY (média ± DP, n = 6).	48
Figura 28. Fator de direcionamento folicular em 6h, 6h com massagem e 12 horas de permeação passiva a partir das NPY-QS, NPY e do CTY (média ± DP, n = 6).	49

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Propriedades da molécula de dutasterida.....	11
Tabela 2. Análise da precisão e exatidão intra e intercorrida do método de quantificação em CLAE da DUTA diluída em metanol.	34
Tabela 3. Porcentagem de recuperação da DUTA do EC, FP e EP utilizando 3 mL de metanol como solvente extrator.	35
Tabela 4. Limite de Quantificação e Detecção teóricos da DUTA diluída em metanol e meio	35
Tabela 5. Testes de diferentes proporções polímero/fármaco na obtenção das nanopartículas.....	36
Tabela 6. Estabilidade e EE% das NPY sem QS no período de 10 dias.	36
Tabela 7. Estabilidade e EE% das NPYQS no período de 10 dias.....	37
Tabela 8. Solubilidade da DUTA em diferentes meios.....	44

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

AGA	Alopecia androgenética
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
CTY	Controle
CV	Coefficiente de Variação
D _H	Diâmetro hidrodinâmico
DHT	Dihidrotestosterona
DP	Desvio Padrão
DUTA	Dutasterida
EC	Etrato Córneo
EE	Eficiência de Encapsulação
EG	Etilenoglicol
EP	Epiderme + Derme
F127	Pluronic®
FDA	Food and Drug Administration
FP	Folículo Piloso
GEL	Geladeira
LD	Limite de Detecção
LQ	Limite de Quantificação
MET	Microscopia Eletrônica de Transmissão
NLC	Carreadores Lipídicos Nanoestruturados
NP	Nanopartícula
NPY	Nanopartícula sem Revestimento de Quitosana
NPYQS	Nanopartícula com Revestimento de Quitosana
PCL	Policaprolactona
PDI	Índice de Polidispersão
PEG	Poli(etilenoglicol)
PH	Potencial hidrogeniônico
PLGA	Poli(ácido lático-co-ácido glicólico)
QS	Quitosana
SDS	Dodecil Sulfato de Sódio
TA	Temperatura Ambiente
TEWL	Perda de Água Transdérmica
UV/Vis	Ultravioleta/Visível

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
2. OBJETIVOS	2
2.1. Objetivo Geral	2
2.2. Objetivos específicos	2
3. REVISÃO DE LITERATURA	3
3.1. Pele e anexos cutâneos	3
3.1.2. Alopecia androgênica	7
3.2. Epidemiologia	8
3.3. Impacto social da AGA	8
3.4. Tratamentos existentes e efeitos adversos	9
3.4.1. Inibidores da 5-alfa redutase	9
3.5. Vias de permeação	13
3.5.1. Fatores Intrínsecos da pele	14
3.5.2. Fatores inerentes à formulação	15
3.5.3. Fatores externos contribuintes à permeação	15
3.6. Vantagens de um nanosistema	16
3.6.1. Nanopartículas contendo dutasterida	18
3.6.2. Nanopartículas com núcleo lipídico e revestidas com quitosana	19
4. MATERIAIS E MÉTODOS	20
4.1. Determinação do comprimento de onda de absorção máxima da dutasterida (DUTA)	20
4.2. Método analítico para quantificação da DUTA permeada e recuperada da pele	20
4.3. Validação do método analítico para quantificação de DUTA	21
4.3.1. Especificidade/Seletividade	21
4.3.2. Linearidade	21
4.3.3. Precisão	22
4.3.4. Exatidão	22
4.3.5. Limite de detecção (LD) e quantificação (LQ)	23
4.4. Obtenção das nanopartículas	24
4.5. Morfologia das nanopartículas	24
4.6. Eficiência de encapsulação	25
4.7. Estudo de estabilidade	25
4.8. Determinação da solubilidade da DUTA em diferentes meios	26
4.9. Estudo <i>in vitro</i> de liberação da DUTA a partir das nanopartículas	27
4.10. Permeação cutânea <i>in vitro</i> da DUTA a partir das suspensões de nanopartículas com e sem quitosana	28

4.11. Análise dos dados	29
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	29
5.1. Determinação do comprimento de absorção máxima para a DUTA.....	29
5.2. Método analítico para quantificação da DUTA	30
5.3. Validação do método analítico para quantificação de DUTA.....	30
5.3.1. Especificidade/Seletividade.....	30
5.3.2. Linearidade.....	32
5.3.3. Precisão.....	34
5.3.4. Exatidão.....	34
5.3.5. Limite de detecção (LD) e quantificação (LQ).....	35
5.4. Obtenção das nanopartículas	35
5.5. Morfologia das nanopartículas	38
5.6. Eficiência de encapsulação	39
5.7. Estudo de Estabilidade	40
5.8. Determinação da solubilidade da DUTA em diferentes meios.....	44
5.9. Estudo <i>in vitro</i> de liberação da DUTA a partir das nanopartículas	44
5.10. Estudos de permeação <i>in vitro</i>	46
6. CONCLUSÃO	51
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	52

1. INTRODUÇÃO

Alopecia pode ser definida como a perda de cabelo/pelo em partes do corpo ou em toda a sua extensão. Os três tipos mais comuns de alopecia são: alopecia androgênica, alopecia areata e alopecia quimioterápica (NALLURI; HARRIES, 2016). Dentre essas, a mais recorrente é a alopecia androgênica, condição poligenética que pode acometer homens e mulheres prevalecendo em homens caucasianos, chegando a ocorrer em 30% naqueles com idade de 30 anos, 50% com 50 anos e 80% nos homens com 70 anos (LOLLI et al., 2017).

Os tratamentos para alopecia androgênica aprovados pela Food and Drug Administration (FDA) são o minoxidil tópico e finasterida por via oral (ADIL; GODWIN, 2017). Recentemente, o fármaco dutasterida, aprovado pela FDA e pela Agência de Vigilância Sanitária (ANVISA) para tratamento de Hiperplasia Prostática Benigna (HPB) (BULASMED, 2017), tem sido destacado como alternativa promissora para o tratamento sistêmico da alopecia androgênica (RATHNAYAKE; SINCLAIR, 2010; NOOR et al., 2017).

A dutasterida atua através da inibição da enzima 5-alfa redutase diminuindo os níveis de di-hidrotestosterona (DHT) em 90% (CLARK et al., 2004; LOLLI et al., 2017). A enzima 5-alfa redutase é responsável pela conversão da testosterona em DHT na região peribulbar do folículo piloso e por sua vez, os níveis elevados de DHT faz com que ocorra uma diminuição do folículo e conseqüentemente, uma redução no crescimento capilar (CLARK et al., 2004; LOLLI et al., 2017). Apesar do tratamento por via oral com inibidores da 5-alfa redutase serem efetivos no controle da alopecia androgênica esses estão relacionados a efeitos adversos sexuais, como: disfunção erétil, distúrbios da ejaculação e diminuição da libido (HIRSHBURG et al., 2016).

Sendo assim, o tratamento tópico apresenta-se como uma alternativa para contornar os efeitos indesejáveis resultantes da ação sistêmica dos inibidores da 5-alfa redutase, sendo necessário que o fármaco seja continuamente liberado na região peribulbar do folículo piloso para que se consiga uma eficácia relevante.

Evidências recentes demonstram que as nanopartículas poliméricas quando aplicadas topicamente podem se acumular nos folículos pilosos e promover a liberação controlada de diversos fármacos (MATOS et al., 2015). Além disso, estudos existentes mostram que através da aplicação da massagem manual as partículas conseguem penetrar mais profundamente nos folículos pilosos (LADEMANN et al., 2007).

Dessa forma, este trabalho propõe o desenvolvimento e a caracterização de nanopartículas poliméricas com e sem cobertura de quitosana para veiculação do inibidor da 5-alfa redutase, dutasterida e direcionamento aos folículos pilosos.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

Desenvolver e caracterizar nanopartículas poliméricas contendo dutasterida para o direcionamento do fármaco aos folículos pilosos.

2.2. Objetivos específicos

- Validar um método analítico para a quantificação do fármaco dutasterida;
- Desenvolver e caracterizar nanopartículas poliméricas com e sem cobertura de quitosana contendo dutasterida;
- Avaliar a estabilidade das nanopartículas poliméricas seguindo parâmetros de diâmetro hidrodinâmico, polidispersividade, potencial zeta, eficiência de encapsulação;
- Avaliar o perfil de liberação *in vitro* do fármaco a partir das nanoformulações desenvolvidas;

- Avaliar a permeação passiva *in vitro* da dutasterida nanoencapsulada na pele intacta da orelha de suínos a partir das nanoformulações desenvolvidas;

- Avaliar o direcionamento das nanopartículas aos folículos pilosos através do cálculo do fator de direcionamento aos folículos pilosos.

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1. Pele e anexos cutâneos

A pele possui uma área superficial entre 1,5 a 2,0 m², (CHU, 2012) sendo assim o maior órgão do corpo humano. É constituída pela epiderme, porção epitelial que possui origem ectodérmica, e uma porção conjuntiva que por sua vez, tem origem mesodérmica. Abaixo da derme, encontra-se a hipoderme que atua como uma junção dos tecidos subjacentes (Figura 1). A pele desempenha inúmeras funções, dentre elas a proteção contra a invasão de microrganismos desconhecidos, a termorregulação do corpo, proteção contra o atrito e desidratação, produção de melanina que auxilia na proteção contra os raios ultravioleta, além disso, possui diversas terminações nervosas sensitivas que permitem a sensibilidade através do tato (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2008).

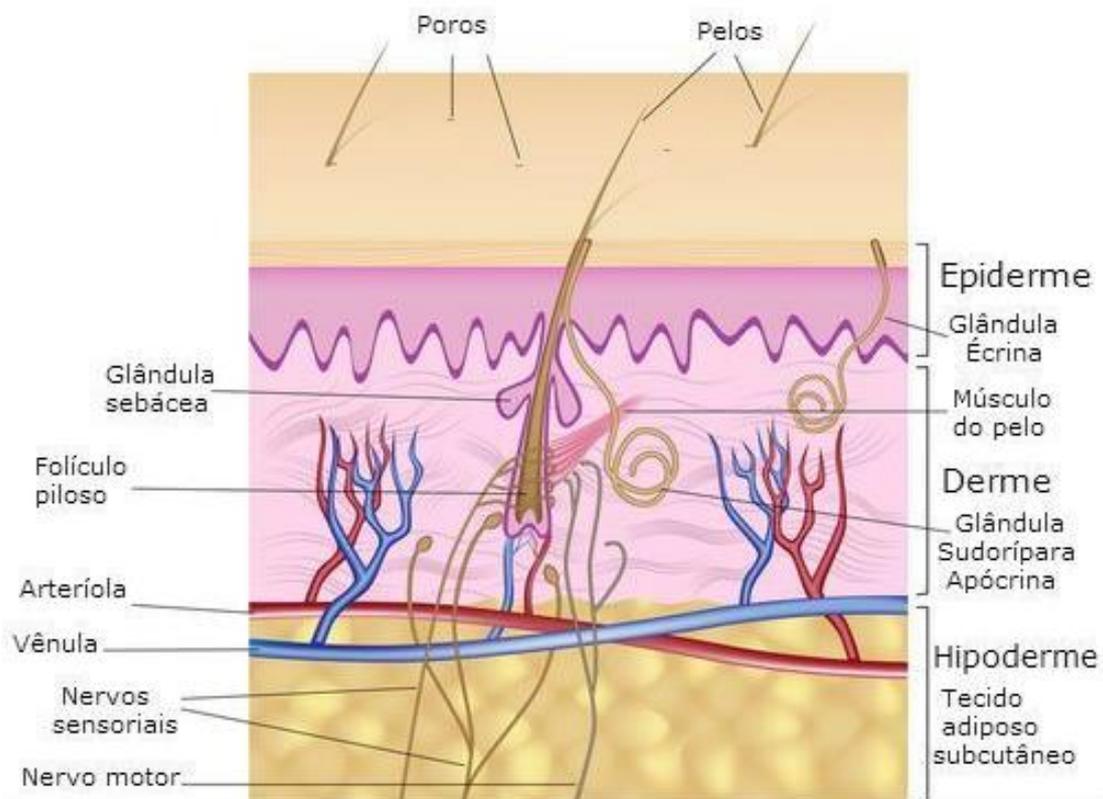


Figura 1. Camadas da pele: epiderme, derme e hipoderme (adaptado de <https://www.todamateria.com.br/pele-humana/>).

Na Figura 2 estão apresentadas as camadas ou estratos da epiderme. A primeira camada externa, camada córnea é composta por corneócitos. Em seguida dispõem-se a camada lúcida e a camada granulosa, que são formados pelos queratinócitos (ricos em lipídeos e proteínas) que diferenciam e migram da camada basal. A camada espinhosa vem logo após e é onde a queratinização começa, possui também as células de Langerhans, um tipo de célula dendrítica apresentadora de antígeno. Por último, mas não menos importante, a camada basal rica em melanócitos produtores de melanina (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2008).

A derme é constituída por tecido conjuntivo dividido em duas camadas, a mais superficial, camada papilar é delgada e possui diversas reentrâncias em direção da epiderme e é responsável por liberar sinais para definição do tamanho, forma e coloração do cabelo (ENSHELL-SEIJFFERS; LINDON; MORGAN, 2008; CHI; WU; MORGAN, 2013). A camada reticular é composta por tecido conjuntivo denso. Ambas são irrigadas por vasos sanguíneos e

linfáticos, dessa maneira são responsáveis por nutrir e oxigenar a epiderme (SCHEUPLEIN; BLANK, 1971; ZHANG et al., 2013).

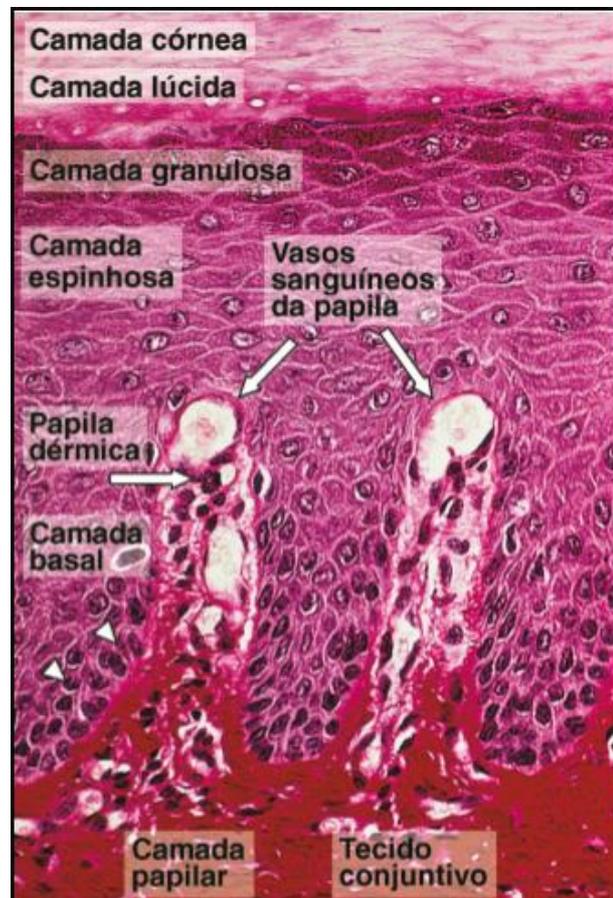


Figura 2. Camadas da epiderme: Camada córnea, lúcida, granulosa, espinhosa e basal. (adaptado de Junqueira; Carneiro, 2008).

O folículo piloso é formado pela invaginação da epiderme na derme e é composto pela papila dérmica, bulbo, matriz, raiz do pelo e pele. O pelo apresenta-se como uma estrutura importante na proteção, bem como na dispersão de feromônios. Desempenha um papel extremamente impactante no psicológico das pessoas que sofrem da alopecia ou de hipertricose (PAUS; COTSARELIS, 1999). Ainda é responsável por produzir células-tronco que são importantes para o processo de regeneração dérmica e reepitelização. Entre outros anexos da pele estão, a glândula sebácea produtora de sebo que mantêm a pele e o cabelo hidratados e a glândula sudorípara que ajuda regular a temperatura corporal (ZHANG et al., 2013).

O fio de cabelo é constituído pela cutícula (porção mais externa estruturada por diversas camadas de queratina sobrepostas), pela medula

(camada mais interna, possui estrutura semelhante ao favo de mel) e pelo córtex (porção intermediária responsável pela coloração do pelo) (DEBELICA; THIES, 2009; AHMED; ALI; GHALLAB, 2018).

3.1.1. Ciclo capilar

O ciclo capilar é induzido pela proliferação e diferenciação das células tronco epiteliais e pelas células germinais secundárias do folículo piloso (estrutura transitória localizada no bulbo e predominante na fase telógena) e integra três fases: anágena (crescimento), catágena (regressão) e telógena (repouso), Figura 3 (COTSARELIS; SUN; LAVKER, 1990; PANTELEYEV, 2018). Na anágena, os melanócitos diferenciados do bulbo são responsáveis por produzir melanina e transferi-la para as células epiteliais que se diferenciam em cabelo (NISHIMURA et al., 2002). Já na fase telógena, os melanócitos diferenciados entram em apoptose e a parte inferior do folículo é degenerada (SHAROV et al., 2005). Para dar início a um novo ciclo capilar, as células tronco epiteliais reconstróem a parte destruída do folículo, assim as células tronco dos melanócitos reabitam o bulbo com células diferenciadas produtoras de pigmento. (RABBANI et al., 2011).

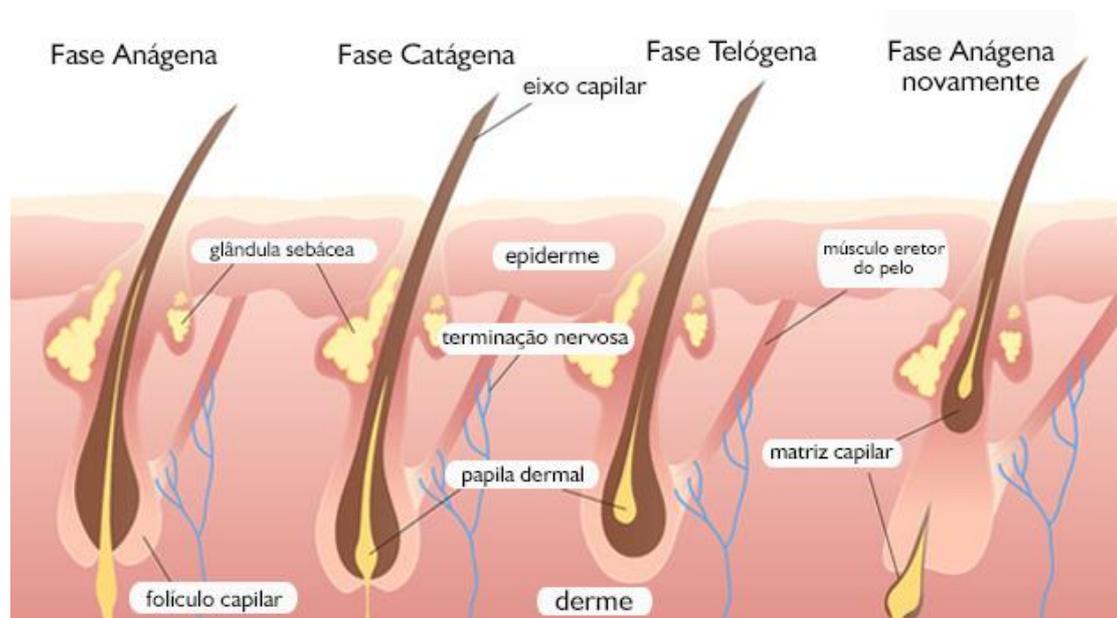


Figura 3. Ciclo de crescimento capilar (adaptado de <https://www.superdicasartvitta.com.br/2017/03/ciclo-de-vida-do-cabelo/>).

3.1.2. Alopecia androgênica

A alopecia androgênica (AGA) é considerada uma doença poligenética hereditária cuja patofisiologia envolve o afinamento dos cabelos de homens e mulheres geneticamente pré-dispostos, devido à miniaturização do folículo piloso e alteração do ciclo capilar (COURTOIS et al., 1994). AGA pode começar a se manifestar em homens na faixa dos 20 anos e aumenta a severidade proporcionalmente à idade. Quando comparados às etnias africanas e asiáticas, os homens brancos são os mais propensos a desenvolver a AGA e com maior extensão da área de queda de cabelo, sendo que aproximadamente 30% dos homens brancos são afetados na idade de 30 anos e 80% na idade de 70 anos (HAMILTON, 1951; ELLIS; SINCLAIR; HARRAP, 2002).

A AGA é caracterizada por uma fase catágena prolongada, ou seja, um prolongamento do período de regressão folicular e por uma fase de crescimento folicular reduzida, o que resulta em transição mais rápida da fase anágena para a telógena minimizando o folículo piloso e reduzindo a quantidade de fios de cabelo no couro cabeludo (COURTOIS et al., 1994).

O couro cabeludo possui as isozimas 5-alfa redutase 1 e 2 responsáveis por transformar a testosterona em DHT (SAWAYA; PRICE, 1997; PRICE, 1999). Essa forma mais ativa da testosterona se liga aos receptores androgênicos nucleares que possuem um domínio dedicado ao ligante e outro domínio ligante ao DNA celular, podendo assim iniciar a transcrição de genes. Dessa forma, as pessoas que sofrem da alopecia apresentam níveis elevados de DHT, de 5-alfa redutase e de receptores androgênicos no couro cabeludo (SAWAYA; PRICE, 1997; PRICE, 1999). Os receptores androgênicos estão 30% a mais em folículos pilosos na área frontal da cabeça quando comparado com a área occipital em homens e mulheres. Devido ao fato de as mulheres apresentarem 40% de receptores a menos que os homens, encontra-se o motivo pelo qual a AGA se faz menos presente no sexo feminino (SAWAYA; PRICE, 1997).

3.2. Epidemiologia

A AGA representa 1,5% das principais causas de consultas dermatológicas registradas no Brasil entre os setores público e privado, segundo uma pesquisa feita pela Sociedade Brasileira de Dermatologia. Essa patologia encontra-se na 17ª posição entre as doenças dermatológicas que mais ocorrem no Brasil (SOCIEDADE BRASILEIRA DE DERMATOLOGIA, 2006)

Em homens japoneses a AGA aparece 10 anos mais tarde do que nos caucasianos e a probabilidade de desenvolver a condição é 1,4 vezes mais baixa em cada década comparados aos europeus (TAKASHIMA M, IJU K, 1981). Em homens coreanos a prevalência é de 46,9% (grau III ou acima) acima dos 70 anos de idade, mas ainda sim menor que nos europeus (PAIK et al., 2001).

Em mulheres, a prevalência é bem menor quando comparada aos homens e manifesta-se em grau I ou II. Em caucasianas, na nona década de vida, a incidência chega a 32% (NORWOOD, O'TAR, T., 2001), em australianas a prevalência é de 54% na oitava década de vida (GAN; SINCLAIR, 2005) e em mulheres coreanas a taxa é de 24,7% acima dos 70 anos de idade e não apresentam grau III na escala Hamilton-Norwood (PAIK et al., 2001). As mulheres chinesas por sua vez, demonstram um perfil similar de ocorrência às coreanas (WANG et al., 2010).

3.3. Impacto social da AGA

A AGA produz um impacto psicossocial negativo nos indivíduos afetados influenciando na qualidade de vida dessas pessoas (CASH, 1990). O cabelo, muitas vezes, é essencial na identidade das mulheres devido ao fato de representar simbolicamente, feminidade, sexualidade, atratividade e personalidade (HUNT; MCHALE, 2005). Particularmente em mulheres, diminui a autoestima e a autoconfiança podendo desenvolver em ansiedade e depressão (WILLIAMSON; GONZALEZ; FINLAY, 2001). Estudos mostram que 52% das mulheres com AGA estão realmente muito tristes com a

condição, enquanto de 28% dos homens estão preocupados (CASH; PRICE; SAVIN, 1993; CASH, 2001).

3.4. Tratamentos existentes e efeitos adversos

3.4.1. Inibidores da 5-alfa redutase

A finasterida 1 mg oral e a dutasterida 0,5 mg oral são fármacos que atuam através da inibição da 5-alfa redutase e são usados no tratamento da AGA. Os Inibidores da 5-alfa redutase são azasteroides com baixa solubilidade em água e que se ligam à enzima 5-alfa redutase irreversivelmente.

A finasterida (Figura 4) é aprovada pela FDA para o tratamento da AGA na dose oral de 1mg por dia. Ela se liga seletivamente à isozima tipo 2, e assim inibe a conversão da testosterona em DHT, hormônio responsável pela formação da genitália masculina, pelo desenvolvimento fetal e que encontra-se relacionado com o surgimento da hiperplasia prostática benigna e com a AGA (CLARK et al., 2004). A DHT possui de 2 a 5 vezes mais afinidade pelos receptores androgênicos que a testosterona e também é 10 vezes mais potente em induzir a cascata de sinalização dos receptores androgênicos (SAARTOK; DAHLBERG; GUSTAFSSON, 1984).

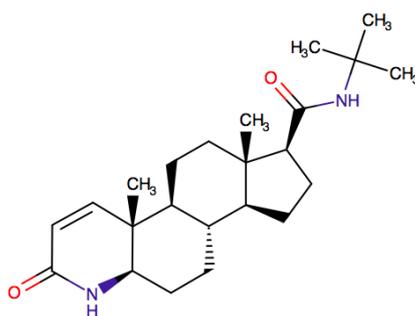


Figura 4. Fórmula estrutural da finasterida (Peso molecular 372,553 g/mol).

Os homens que foram tratados com a dose oral de 5mg de finasterida diária apresentaram após 42 dias, níveis de DHT do sêrum e do couro cabeludo reduzidos mais de 60% em comparação com o grupo placebo (DRAKE et al., 1999). Depois de 2 anos ininterruptos de tratamento com a finasterida, não houve um aumento significativo na quantidade capilar, mas

estabilizou-se a queda de cabelo, mantendo a densidade capilar (WHITING, 2001).

Apesar de apresentar resultados promissores, a finasterida possui efeitos adversos sexuais. Em um estudo prospectivo, os pacientes receberam 5mg/dia de finasterida via oral em um período de 6 meses. Com 3 meses de tratamento, 22% dos pacientes manifestaram disfunção erétil e no sexto mês, 33% dos pacientes também reportaram o mesmo efeito adverso (UYGUR et al., 1998). Em um estudo duplo-cego com duração de 2 anos, 15,8% dos pacientes reportaram disfunção ejaculatória, enquanto que no grupo placebo foi de 6,3% (NICKEL et al., 1996).

Outro estudo duplo-cego randomizado de 4 anos demonstrou no primeiro ano que os pacientes sob uso oral de finasterida 5mg apresentaram, no geral, algum efeito sexual adverso, quando comparados ao grupo placebo. Após o primeiro ano, não constataram aumento na incidência dos efeitos adversos entre os grupos (WESSELLS et al., 2003). Isso pode ser atribuído à tolerância que ocorre quando o medicamento é utilizado repetidamente e assim, o corpo se adapta à presença constante do fármaco levando a uma amenização dos efeitos adversos relacionados à este (LYNCH, 2017).

Segundo uma análise retrospectiva de farmacovigilância em que foram utilizadas informações do banco de dados americano da FDA, a finasterida em dose baixa (1mg) causou efeitos adversos sexuais (11,8%), bem como instigou pensamentos suicidas em 7,9% nos pacientes (ALI; HERAN; ETMINAN, 2015). Além desses efeitos adversos muito reportados pelos pacientes, há relatos de um risco aumentado de causar ginecomastia (RATHNAYAKE; SINCLAIR, 2010) e teratogenicidade (VAROTHAI; BERGFELD, 2014).

A dutasterida, outro inibidor da 5-alfa redutase (Figura 5), revela-se como um tratamento promissor para AGA e algumas de suas propriedades estão listadas na Tabela 1. Atualmente é aprovada somente para o tratamento de Hiperplasia Prostática Benigna e utilizada *off-label* para AGA. Em alguns países como o México e a Coréia, a administração por via oral é

aprovada para o tratamento de AGA em homens (KELLY; BLANCO; TOSTI, 2016).

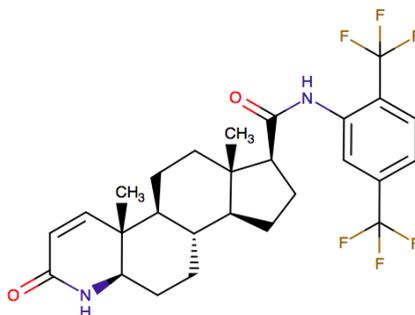


Figura 5. Fórmula estrutural da dutasterida (Peso molecular 528,539 g/mol).

A dutasterida é um 6-azasteroide cujo mecanismo de ação envolve a inibição da enzima 5-alfa redutase 1 localizada na pele, incluindo glândulas sebáceas e folículo piloso e da isozima tipo 2 encontrada na região peitoral, genital, prostática e também na região peribulbar dos folículos pilosos (URYSIAK-CZUBATKA; KMIEĆ; BRONIARCZYK-DYŁA, 2014).

Tabela 1. Propriedades da molécula de dutasterida.

Solubilidade H ₂ O	0.000908 mg/mL
LogP	5,79
pKa ácido	12,56
pKa básico	2,17

Quando comparada com a finasterida, a dutasterida inibe três vezes mais a isozima tipo 2 e cem vezes mais a isozima tipo 1 (OLSEN et al., 2006). Em um estudo duplo-cego, pacientes em uso de dutasterida (0,5mg/dia) foram acompanhados durante 24 meses. No primeiro ano, houve uma diferença significativa entre o grupo tratado e o sem tratamento, o número de efeitos adversos reportados foi maior em pacientes recebendo dutasterida. Já no ano seguinte, os casos de impotência, diminuição da libido, ginecomastia e disfunção ejaculatória do grupo em tratamento não tiveram diferença estatística quando comparados ao grupo controle. Porém, os períodos analisados em conjunto, ou seja, 2 anos de pesquisa, demonstram ser coerentes com os outros estudos feitos até então, o grupo tratado com dutasterida apresentou mais efeitos adversos que os controles. Além disso, a

concentração sérica de DHT dos pacientes tratados com a dutasterida apresentou uma redução de 90% *versus* o grupo placebo que obteve um aumento de 9,6% (ROEHRBORN et al., 2002).

Em um ensaio clínico controlado por placebo, pacientes receberam dutasterida (0,5 mg/dia) ou placebo por 2 anos; nos primeiros 6 meses, pacientes reportaram impotência sexual, diminuição da libido, disfunção ejaculatória, ginecomastia e todos os pacientes que estavam de fato recebendo a medicação reportaram uma porcentagem maior de efeitos adversos que os pacientes não medicados (ANDRIOLE; KIRBY, 2003).

Em outra parte desse mesmo estudo, foi feita a comparação entre a dutasterida (0,5mg/dia) e a finasterida (5mg/dia), 7% dos pacientes apresentaram impotência sexual usando a dutasterida e 8% com a finasterida. A diminuição da libido também foi constatada em 5% e 6% dos pacientes tratados com dutasterida e finasterida, respectivamente. Com relação à disfunção ejaculatória, a porcentagem foi de 1% para ambos grupos (ANDRIOLE; KIRBY, 2003).

Um estudo duplo-cego em que 0,5mg/dia de dutasterida foi utilizado, a disfunção erétil também prevaleceu, 3 dentre os 73 indivíduos manifestaram tal efeito, representando 4,1% e no grupo controle 2,7% dos pacientes relataram o mesmo efeito adverso (EUN et al., 2010).

Em estudo randomizado controlado, três grupos receberam diferentes doses de dutasterida (0,02mg/dia; 0,1mg/dia; 0,5mg/dia), um grupo placebo e outro grupo finasterida 1mg por 24 semanas. Os resultados mostraram que os pacientes que utilizaram tanto a dutasterida como a finasterida apresentaram alterações na libido. Considerando a impotência sexual, 3,9% dos pacientes placebo manifestaram-na; 4,3%, 3,7%; 5,4% dos pacientes com as doses de 0,02mg; 0,1mg; 0,5mg, respectivamente e por fim, 6,1% dos pacientes utilizando finasterida apresentaram impotência. Para a disfunção ejaculatória, as porcentagens variaram de 2,2% a 4,8%, sendo a porcentagem menor representativa da dose 0,02mg de dutasterida e a maior porcentagem para 0,1mg de dutasterida (GUBELIN HARCHA et al., 2014).

Em um estudo observacional, foi constatado que 1,3% dos homens apresentaram diminuição da libido; 1,0% mostrou impotência; 0,6% disfunção sexual; 0,1% disfunção ejaculatória e 0,3% ginecomastia (CHOI et al., 2016).

3.5. Vias de permeação

A pele atua como uma grande barreira de proteção contra a entrada de substâncias exógenas. Ainda assim, a via tópica possui inúmeras vantagens como por exemplo, diminuição de efeitos adversos, eliminação do efeito de primeira passagem, além disso do aumento da adesão do tratamento pelo paciente (ROBERTS; CROSS; PELLETT, 2002).

Existem três vias de permeação de fármacos (Figura 6), a via transcelular, na qual o fármaco passa através dos corneócitos e da matriz lipídica intercelular; a via intercelular, em que o fármaco difunde entre os corneócitos passando pela matriz lipídica e a via dos apêndices cutâneos onde o fármaco se deposita nos folículos pilosos, glândulas sebácea e sudorípara. As moléculas pequenas hidrofílicas são mais suscetíveis a difundirem-se pela via transcelular, enquanto as moléculas mais lipofílicas são mais aptas a passarem via intercelular. (GRATIERI; GELFUSO; LOPEZ, 2008; NG; LAU, 2015)

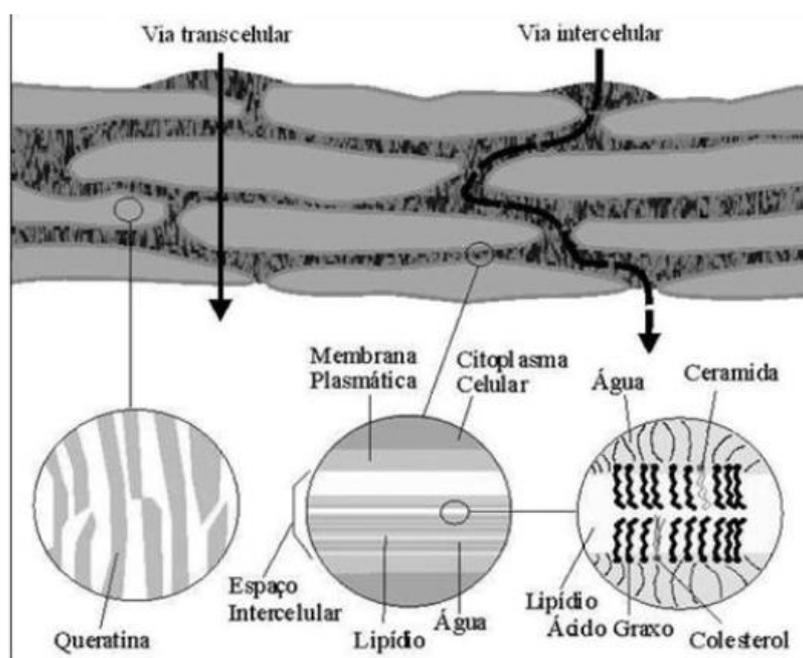


Figura 6. Vias de permeação de fármacos pela pele: via transcelular e intercelular (adaptado de MOSER et al., 2001).

A penetração intrafolicular de fármacos está se tornando cada vez mais importante devido à possibilidade de armazenamento por longos períodos e uma entrega sustentada do fármaco no local de ação (LADEMANN et al., 2008)

3.5.1. Fatores Intrínsecos da pele

O nível de hidratação da pele pode interferir na penetração de substâncias através dela. Uma das técnicas utilizadas comumente para aumentar a penetração é a oclusão. É especulado que com o aumento da hidratação da pele, os lipídeos do estrato córneo sejam rearranjados e isso faz com que as substâncias passem mais facilmente (BENSON, 2005). O estrato córneo possui uma relação inversamente proporcional à TEWL (perda de água transdérmica), quanto menos hidratado o estrato córneo, maior é a TEWL, que serve como indicador do estado da pele (PROKSCH; BRANDNER; JENSEN, 2008).

Outros fatores que influenciam a permeação através da pele são a idade, etnia e o gênero da pessoa. Ao envelhecer, a epiderme vai se tornando fina, os queratinócitos ficam menos aderentes uns aos outros e

ocorrem alterações no colágeno e elastina (LEITE-SILVA et al., 2012). A pele danificada ou com alguma doença apresenta uma maior penetração das substâncias quando comparada a uma pele sem danos (JAKASA et al., 2006).

3.5.2. Fatores inerentes à formulação

O veículo altera a interação da substância com pele, por isso é extremamente importante na permeação. O tipo da formulação precisa ser compatível com a hidrofiliabilidade / hidrofobicidade do fármaco em questão, de acordo com a área de tratamento. Outro ponto que precisa ser destacado são as propriedades táteis da formulação, pois são os consumidores que ditam a tendência de mercado. Sendo assim, as emulsões óleo-em-água são mais procuradas que as pomadas. O pH, a viscosidade e a carga da formulação também desempenham um papel fundamental no desenvolvimento do veículo para que se obtenha um perfil de difusão ótimo do fármaco através da pele (LEITE-SILVA et al., 2012).

Devido às inúmeras vantagens da penetração folicular, principalmente no tratamento de doenças relacionadas aos apêndices cutâneos, como a acne e a alopecia, essa via tem adquirido mais visibilidade na pesquisa (FANG; LI; FANG, 2014). E para que ocorra uma entrega mais direcionada do fármaco, as nanopartículas de diversos tipos de materiais (metais, polímeros) têm sido extensivamente utilizadas (PEREIRA et al., 2018).

3.5.3. Fatores externos contribuintes à permeação

Existem várias técnicas físicas que podem ser aplicadas para melhorar a penetração dérmica como: o microagulhamento que produz canais microscópicos na pele, a iontoforese que ajuda do transporte de substâncias pela aplicação de uma corrente elétrica de baixa intensidade e também o ultrassom que através de ondas ultrassônicas consegue melhorar a penetração de moléculas. (LEITE-SILVA et al., 2012; PETRILLI; LOPEZ, 2018)

As técnicas mais recorrentes no cotidiano são a massagem e a depilação, esta última consiste em eliminar a barreira estrato córneo para aumentar a penetração na pele. Já a massagem, consegue promover uma penetração mais profunda das partículas, devido ao fato de a movimentação dos cabelos agirem como bombas e promoverem uma maior entrada de substâncias. Dessa maneira, é previsto que a combinação de um nanosistema com a técnica simples de massagem pode aperfeiçoar a entrega de ativos na pele (LEITE-SILVA et al., 2012).

3.6. Vantagens de um nanosistema

No campo da medicina, as nanopartículas oferecem inúmeros benefícios na detecção e prevenção de doenças pelo avanço no diagnóstico e no acompanhamento da progressão da condição (KRISHNA; GAYATHRI; PRIYA, 2017).

Especificamente, na entrega de fármacos, as nanopartículas têm demonstrado ter uma grande capacidade carreadora tanto para moléculas hidrofóbicas quanto para hidrofílicas, apresentando uma estabilidade prolongada, bem como uma liberação sustentada e controlada do fármaco a partir da matriz. Além disso, as nanopartículas podem aumentar a biodisponibilidade do fármaco e, portanto reduzir a frequência de administração e, ainda diminuir os efeitos adversos relacionados ao uso do medicamento (GELPERINA et al., 2005).

As nanopartículas podem ser utilizadas de três diferentes maneiras: entrega de substâncias diretamente em áreas específicas no folículo piloso através da escolha de tamanhos diferentes de partículas; translocação de substâncias da partícula para a epiderme viável; entrega de substâncias dependente de estímulo externo ou interno levando à liberação do fármaco (PATZELT; LADEMANN, 2013). Uma formulação contendo partículas pode ser estocada no interior do folículo por até 10 dias, enquanto uma formulação sobreposta à pele não consegue resistir mais de 1 dia (LADEMANN et al., 2008). O folículo piloso demonstra ser um ótimo local de entrega de

fármacos, as aplicações podem ser reduzidas e assim aumentar a adesão do paciente e as chances de cura.

Para que os fármacos consigam penetrar nos folículos pilosos, é interessante que sejam incorporados em micro e nanopartículas devido ao fato de a penetração ser tamanho-dependente, como apresentado na Figura 7. As partículas com tamanhos menores que 100nm são capazes de penetrar mais fundo nos folículos e se depositar sobre o bulbo capilar, já as partículas entre a faixa de tamanho de 200nm a 300nm liberaram o fármaco na parte do istmo folicular, enquanto que as partículas com maior tamanho se acumulam na superfície da pele ao redor dos folículos (SCHAEFER; LADEMANN, 2001; PATZELT; LADEMANN, 2013; PEREIRA et al., 2018). Um fator que ajuda na propulsão das nanopartículas para dentro do folículo piloso, é a própria estrutura do pelo e dos folículos pilosos, empurrando-as, quando os pelos se movimentam. E esse movimento também pode ser contribuído com a aplicação de massagem sobre a pele (LADEMANN et al., 2009).

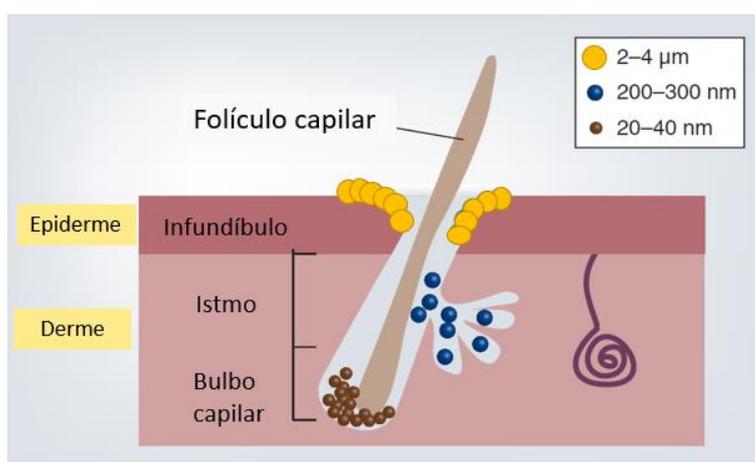


Figura 7. Penetração de partículas através do folículo piloso (PEREIRA et al., 2018).

As nanopartículas poliméricas têm despertado a atenção por demonstrarem um grande potencial de direcionamento aos folículos pilosos (FANG; LI; FANG, 2014). No começo, as NPs eram obtidas por polímeros não biodegradáveis como o poliestireno e a poliacrilamida, mas devido à necessidade de se produzir algo que gerasse menos impacto ambiental e que fosse atóxico, surgiram os polímeros biodegradáveis, que podem ser obtidos de fontes naturais como a quitosana, gelatina, alginato e albumina, e

aqueles adquiridos sinteticamente, como a policaprolactona (PCL), poli(ácido láctico-co-ácido glicólico) (PLGA) (BANIK; FATTAHI; BROWN, 2016).

3.6.1 Nanopartículas contendo dutasterida

Nanoestruturas de hidroxipropil β ciclodextrina (HP- β -CD) contendo dutasterida aumentaram a solubilidade do fármaco e assim, a biodisponibilidade dele com ou sem aditivos hidrofílicos envolvendo a nanoestrutura (KIM, 2013a). No mesmo ano, outro estudo foi desenvolvido para otimizar a formulação oral da dutasterida com NPs de Eudragit[®] E. O Eudragit[®] E100 é um copolímero catiônico extensivamente utilizado em NPs pH sensíveis e por sua capacidade de melhorar a performance de fármacos pouco hidrossolúveis. Essa nova formulação foi testada em ratos e aumentou a biodisponibilidade da dutasterida em 550% quando comparada à formulação original (KIM, 2013b; PARK et al., 2013).

Estudos mostram que com o aumento do revestimento com quitosana faz com que o perfil de liberação do fármaco pela nanopartícula fique mais lento, enquanto que na permeação as NPs que continham maior proporção de quitosana, apresentaram maior fluxo permeado tanto de finasterida quanto de dutasterida (MADHESWARAN et al., 2015). Outro estudo feito com carreadores lipídicos nanoestruturados (NLCs) envolvendo a dutasterida, a liberação das NPs sem revestimento de quitosana mostrou 72% do fármaco liberado em 36 horas. No entanto, as NPs que continham revestimento apresentaram um perfil de liberação mais lento que as NPs não revestidas (NOOR et al., 2017).

Nanopartículas de óxido de ferro cobertas com bicamada de ácido láurico e dutasterida incorporada na região hidrofóbica da bicamada, foram desenvolvidas, aumentando a solubilidade, biodisponibilidade, promovendo controle da liberação com 62% do fármaco liberado em 96 horas e permeação da dutasterida em todas as camadas da pele analisadas: estrato córneo, folículo piloso e epiderme viável, havendo maior retenção do fármaco no folículo piloso em 12 e 24 horas de permeação (AFIUNE, 2019).

3.6.2. Nanopartículas com núcleo lipídico e revestidas por quitosana

A policaprolactona (PCL) é um polímero semicristalino, hidrofóbico, solúvel em temperatura ambiente, possui alta compatibilidade em misturas, baixo ponto de fusão, o que o torna um polímero extremamente interessante de ser utilizado na área biomédica (NAIR; LAURENCIN, 2007). Devido ao fato de ser biocompatível, biodegradável e possuir baixa taxa de degradação, a PCL é extensivamente pesquisada para futuros sistemas de liberação controlada como, por exemplo, implantes. Ao entrar no processo de metabolização, a PCL sofre hidrólise e gera dois metabólitos, a ácido 6-hidroxicaproico e a Acetil-CoA, que por sua vez entram no ciclo do ácido cítrico e são eliminados do corpo (WOODRUFF; HUTMACHER, 2010). A PCL é aprovada pela FDA para utilização em aparelhos médicos, bem como para entrega de fármacos (NAIR; LAURENCIN, 2007; LOWERY; DATTA; RUTLEDGE, 2010).

A PCL, Figura 8, apresenta vastas finalidades já pesquisadas como: suturas, cobertura para feridas, regeneração de nervos, aparelhos conceptivos, vasos sanguíneos artificiais, podendo ser aplicada também em engenharia tecidual e na área dentária (NAIR; LAURENCIN, 2007).

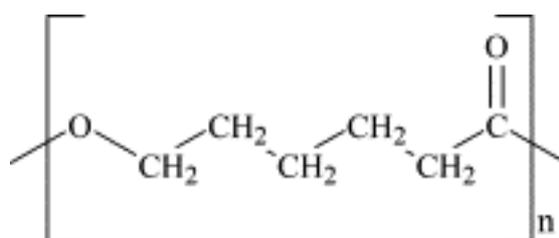


Figura 8. Fórmula estrutural da Policaprolactona

Já a quitosana, Figura 9, é um polissacarídeo de origem natural proveniente da desacetilação da quitina presente no exoesqueleto de crustáceos. Sua estrutura é composta por D-glucosamina e N-acetil-D-glucosamina, dois grupos hidroxil (OH) e um grupo amino (HOPPE-SEYLER, 1894), que lhe confere característica catiônica, é também biocompatível e biodegradável, por isso tem sido bastante utilizado na preparação de nanopartículas. Além disso, tem a capacidade de se aderir a superfícies mucosas e de penetrar entre as células epiteliais, tornando-a um material

promissor na entrega de fármacos (KIM et al., 2001). Pelo fato de o cabelo apresentar carga negativa, é possível que o revestimento das nanopartículas com quitosana as direcione para o folículo (AHMED; ALJAEID, 2016).

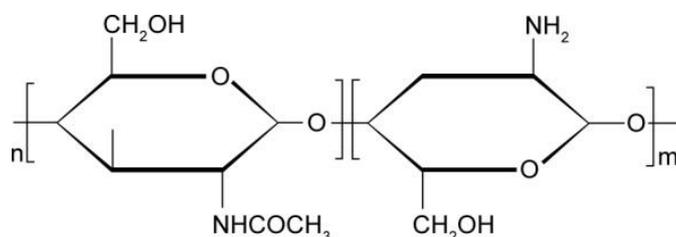


Figura 9. Fórmula estrutural da quitosana (AHMED; ALJAEID, 2016).

A quitosana é degradada em vertebrados através da lisozima e por algumas enzimas bacterianas presentes no colo (KEAN; THANOU, 1823). Para que haja a metabolização da quitosana, um importante fator deve ser levado em consideração, a taxa de degradação, que depende do grau de desacetilação, ou seja, quanto maior for o grau de desacetilação, menor a taxa de degradação (YANG et al., 2007).

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Determinação do comprimento de onda de absorção máxima da dutasterida (DUTA)

Para a determinação do comprimento de onda de absorção máxima, a DUTA foi solubilizada em metanol e feita uma varredura da solução em um espectrofotômetro de UV/Vis (Shimadzu, UV 1800) na faixa de comprimento de onda entre 200 – 600 nm.

4.2. Método analítico para quantificação da DUTA permeada e recuperada da pele

A dutasterida foi quantificada com auxílio de um Cromatógrafo Líquido de Alta Eficiência (CLAE), modelo Shimadzu LC 20-AD. Foi utilizada uma coluna de fase reversa C₁₈ (15cm x 4,6mm) e fase móvel composta por uma mistura de acetonitrila: ácido fosfórico 0,01M (62:38, v/v). A vazão foi de 0,8 mL/min, o volume de injeção das amostras foi de 20μL, o forno foi utilizado à

temperatura de 40 °C e a detecção foi feita em 280 nm, de acordo com a determinação do comprimento de onda de absorção máxima feita através do espectrofotômetro de UV/Vis (Shimadzu. UV 1800).

4.3. Validação do método analítico para quantificação de DUTA

Segundo a legislação vigente, o método padronizado foi validado em termos de linearidade, precisão, exatidão, especificidade/seletividade e limite de detecção e quantificação através do equipamento de Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), segundo a legislação vigente (ANVISA, 2003).

4.3.1. Especificidade/Seletividade

Ensaio de seletividade foram executados para assegurar a capacidade do método em quantificar o fármaco na presença de impurezas (ANVISA, 2003). Dessa maneira, amostras dos interferentes: Estrato Córneo (EC), Folículo Piloso (FP) e Epiderme viável (EP), bem como da nanopartícula e o meio Água:TWEEN[®]80:Etilenoglicol (60:0,5:40) foram preparadas. A solução de dutasterida em metanol a 7,5µg/mL foi contaminada com os interferentes de pele de orelha de porco, nanopartícula e meio e, posteriormente analisada por CLAE.

4.3.2. Linearidade

Para verificar a linearidade do método três curvas de calibração foram preparadas a partir da diluição de uma solução padrão de dutasterida a 50µg/mL em metanol (grau HPLC, JT Baker[®], Brasil). As concentrações do fármaco utilizadas nas curvas de calibração foram 0,5; 1,0; 2,5; 5,0; 7,5; 10,0; 15,0 µg/mL. Dessa maneira, as curvas analíticas foram construídas relacionando a concentração de DUTA com a área do pico fornecida pelo equipamento após a injeção das amostras. A análise estatística foi realizada de acordo com os parâmetros propostos pela ANVISA para o método de

regressão linear, obtendo-se uma equação da reta ($y = a x + b$), em que: a corresponde ao coeficiente angular e b ao coeficiente linear.

4.3.3. Precisão

A precisão foi avaliada por meio do estudo de repetitividade e precisão intermediária, nas concentrações 0,5; 7,5 e 15,0 $\mu\text{g/mL}$ de DUTA as quais equivalem às concentrações mínima, média e máxima da curva de calibração. Os resultados foram expressos pelo coeficiente de variação (CV%), representada pela Equação 1:

$$\text{CV\%} = \left(\frac{\text{Desvio Padrão}}{\text{Concentração Média}} \right) \times 100 \quad (1)$$

Onde: CV% corresponde ao coeficiente de variação; desvio padrão é a estimativa do desvio padrão da média e concentração média é obtida considerando-se a média das medidas em sextuplicata para cada concentração analisada.

A repetitividade foi avaliada considerando-se a dispersão dos valores das áreas dos picos obtidos para amostras nas concentrações 0,5; 7,5; 15 $\mu\text{g/mL}$ obtidas no mesmo dia, com o mesmo equipamento e analista.

A precisão intermediária foi avaliada considerando a variação dos valores das áreas dos picos nas concentrações 0,5; 7,5; 15 $\mu\text{g/mL}$, obtidas em 2 dias diferentes com o mesmo equipamento e analistas diferentes.

4.3.4. Exatidão

A exatidão representa o grau de concordância entre os resultados encontrados na análise e um valor de referência ou teórico aceito como verdadeiro (ANVISA, 2003). Os resultados foram expressos em termos de porcentagem de recuperação de DUTA nas camadas da pele, conforme a Equação 2:

$$\text{E\%} = \left(\frac{\text{concentração média}}{\text{concentração teórica}} \right) \times 100 \quad (2)$$

Onde: E% corresponde à percentagem de recuperação de DUTA das camadas da pele; concentração média experimental é a média das medidas em sextuplicata para cada concentração analisada; e concentração teórica corresponde à concentração que deveria ser obtida após a análise.

Para a realização desse ensaio, seis fragmentos de pele da orelha de porco foram inicialmente esticados e presos sobre um suporte de isopor. O Estrato Córneo (EC) de cada um dos pedaços de pele foi removido pela técnica de *tape stripping* diferencial com auxílio de 10 tiras de fita adesiva (TEICHMANN et al., 2005). Para retirada do Folículo Piloso (FP), 2 gotas de cola cianoacrilato foi colocada sobre a pele e uma tira de fita adesiva sobre as gotas, sendo pressionada até que estivesse completamente seca. A fita foi retirada em um único movimento para a remoção dos FPs. Esse passo foi repetido mais uma vez. Por fim, a epiderme viável (EP) foi picotada.

As fitas adesivas contendo EC, FP e EP foram picotadas, colocadas em frascos e adicionou-se uma solução padrão de DUTA em metanol (50 µg/mL), correspondente às concentrações de 0,5; 7,5; 15 µg/mL. O metanol foi evaporado e em seguida, para extração da DUTA das camadas da pele, 3 mL de metanol foi adicionado e mantido sob agitação magnética por 3h. Após esse período, as amostras foram filtradas e analisadas por CLAE para quantificação da DUTA. Esse ensaio foi feito em sextuplicata para cada concentração analisada.

4.3.5. Limite de detecção (LD) e quantificação (LQ)

Os LD e LQ dos fármacos foram estimados considerando-se a proporção de ruído de fundo e o sinal analítico (ICH, 2005), com base nas curvas de calibração e calculados de acordo com as Equações 3 e 4:

$$LD = 3,3 \sigma / S \quad \text{Equação 3}$$

$$LQ = 10 \sigma / S \quad \text{Equação 4}$$

Onde: σ = desvio padrão da resposta, S = inclinação da curva de calibração.

4.4. Obtenção das nanopartículas

As nanopartículas de policaprolactona (PCL) revestidas ou não com quitosana foram obtidas usando a técnica de deposição interfacial de polímeros pré-formados. A fase etanólica contendo 0,03g de lecitina e 5mL de etanol foi vertida sobre a fase orgânica contendo 0,1g de PCL, 0,04g de Span[®] 60, 0,12g de triglicerídeo caprílico, 0,01g do fármaco dissolvido em 25mL de acetona. A mistura foi adicionada em uma fase aquosa contendo 0,08g de TWEEN[®]80 e 50mL de água e então, as nanopartículas são formadas, tornando a suspensão translúcida.

A mistura final foi rotaevaporada à 40°C para eliminar os solventes até 10 mL, resultando nas nanopartículas sem revestimento de quitosana. Parte dessas nanopartículas foram separadas e revestidas com quitosana na proporção de 1:5 e os diferentes tipos de nanopartículas obtidas foram avaliadas quanto ao tamanho, potencial zeta, eficiência de encapsulação, pH e índice de polidispersividade (PDI)(BENDER et al., 2012).

Foram testadas diferentes concentrações do fármaco durante a obtenção das nanopartículas: 12,5mg; 15mg; 20mg; 30mg de DUTA, o que corresponde a uma proporção fármaco/polímero de (1:8), (1:6,66), (1:5), (1:3,33) respectivamente, para poder estabelecer qual seria a concentração ótima que implicaria em uma boa estabilidade para prosseguir com os experimentos.

4.5. Morfologia das nanopartículas

A morfologia das nanopartículas foram analisadas por Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET). No preparo das amostras, uma gota da suspensão coloidal de nanopartículas foi colocada sobre uma grade de cobre e deixada à temperatura ambiente para completa evaporação da água. Em seguida, as nanopartículas poliméricas foram coradas com ácido fosfotúngstico a 1%, cora os polímeros, e analisadas por MET (JEOL JEM-2100 a 200keV). O processamento da imagem foi realizado utilizando o software ImageJ em diferentes imagens de microscopia.

4.6. Eficiência de encapsulação

O protocolo para a determinação da eficiência de encapsulação das nanopartículas foi estabelecido após testes, nos quais os parâmetros de velocidade de rotação e temperatura foram avaliados. As concentrações de DUTA na suspensão total e no sobrenadante após a centrifugação foram quantificadas por CLAE.

Para a quantificação da concentração total de DUTA nas suspensões de nanopartículas (C_{total}), 100 μ L das suspensões em triplicata foram diluídas em metanol (1:10), filtradas em filtros de porosidade 0,45 μ m acoplados à seringa e quantificada por CLAE.

Para a quantificação de DUTA presente no sobrenadante ($C_{sobrenadante}$), alíquotas de 1 mL da suspensão de nanopartícula em triplicatas foram submetidas à centrifugação a 15.000 rpm por meia hora à 4°C. Após a conclusão da separação, 100 μ L de sobrenadante das amostras foram diluídos em metanol (1:10) e filtrados em filtros de porosidade de 0,45 μ m acoplados às seringas. A DUTA quantificada por CLAE no sobrenadante corresponde a concentração de DUTA não encapsulada nas nanopartículas.

A eficiência de encapsulação da DUTA nas nanopartículas (EE%) foi determinada pela diferença entre a concentração do fármaco quantificada na suspensão total (C_{total}) e a concentração de DUTA não encapsulado presente no sobrenadante ($C_{sobrenadante}$), conforme Equação 5:

$$EE\% = [(C_{total}) - (C_{sobrenadante}) / C_{total}] \times 100 \quad \text{Equação 5}$$

4.7. Estudo de estabilidade

A estabilidade das suspensões de NPs vazias e com DUTA foram investigadas por espalhamento dinâmico de luz e mobilidade eletroforética utilizando os parâmetros de diâmetro hidrodinâmico (D_H), índice de polidispersão (PDI) e potencial zeta (ζ) empregando um equipamento Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments, Reino Unido), além da

determinação da EE% por CLAE e do pH para explorar potenciais mudanças na distribuição de tamanho, carga superficial e concentração de DUTA.

Para a realização do estudo de estabilidade as formulações de NPs com revestimento de quitosana (1 mL) e NPs sem revestimento de quitosana (1 mL) com e sem DUTA foram seladas em ampolas de vidro em triplicata e armazenadas em refrigerador 4 - 8 °C e em temperatura ambiente. Os parâmetros D_H , PDI, potencial ζ , pH e EE% foram verificados e comparados nos dias 0, 7, 15, 30, 60 e 90. O pH das NPs sem revestimento de quitosana foi ajustado com ácido clorídrico para se igualar ao pH das NPs com QS (pH 4,7), que apresenta um pH levemente mais acidificado, necessário para a protonação dos grupos amino da QS.

4.8. Determinação da solubilidade da DUTA em diferentes meios

A solubilidade da DUTA foi avaliada em temperatura ambiente para garantir que a liberação *in vitro* ocorresse dentro das condições *sink*, ou seja, que a concentração de fármaco no meio receptor não ultrapasse 10% da solubilidade desse no meio, garantindo assim que não houvesse a saturação do meio receptor o que prejudicaria os ensaios de liberação da DUTA pelas NPs.

Sendo assim, um excesso de DUTA foi adicionado a frascos contendo 2mL de diferentes meios:

- Água : Etanol (80:20); (MADHESWARAN et al., 2015)
- TWEEN[®] 20 (2%);
- Pluronic[®] F-127 (1%);
- SDS : Pluronic[®] F-127 (0,5:0,2);
- Pluronic[®] F-127 (0,2%);
- 60 Água : 0,5 TWEEN[®] 80 : 40 PEG4000; (FONTANA et al., 2009)
- 60 Água : 0,5 TWEEN[®] 80 : 40 Etilenoglicol. (FONTANA et al., 2009)

As soluções foram mantidas em temperatura ambiente sob agitação magnética (1000rpm) por 24 horas. Após a decantação do fármaco em excesso, as amostras foram filtradas em filtros hidrofóbicos com porosidade

de $0,45\mu\text{m}$ acoplados a seringas e diluídas 10 vezes para análise por CLAE. O estudo foi realizado em triplicata.

4.9. Estudo *in vitro* de liberação da DUTA a partir das nanopartículas

Devido à limitada solubilidade da DUTA em água e após a realização dos testes de solubilidade dessa em diferentes meios, foi escolhido para a realização do estudo de liberação da DUTA o meio (60 Água : 0,5 TWEEN[®] 80 : 40 Etilenoglicol), seguindo as condições *sink*. Sendo assim, em balão volumétrico contendo 24mL de meio, foram colocados 1mL do controle (CTY) ou das NPs sem quitosana (NPY) ou com quitosana (NPYQS) contendo DUTA encapsulada (125 $\mu\text{g}/\text{mL}$). O estudo foi realizado em sextuplicata para CTY, NPY e NPY-QS sendo deixados sob agitação com auxílio de barra magnética (600 rpm) em banho-maria à 34°C, Figura 10. Alíquotas (1mL) foram retiradas em diferentes tempos 2, 4, 6, 8, 10, 12, 24, 48, 72 e 96 horas, sendo repostos 1 mL do meio fresco imediatamente após cada retirada de amostra. Em seguida, essas foram submetidas à centrifugação, o sobrenadante foi recuperado, diluído em metanol na proporção de 1:10, filtrado e a DUTA quantificada por CLAE para se estabelecer a influência das NPs desenvolvidas no perfil de liberação da DUTA ao longo do tempo de estudo.



Figura 10. Ensaio de liberação da DUTA.

4.10. Permeação cutânea *in vitro* da DUTA a partir das suspensões de nanopartículas com e sem quitosana

Os experimentos de permeação *in vitro* foram realizados utilizando células de difusão do tipo Franz modificadas e fragmentos de pele da orelha de porcos. Estudos anteriores demonstraram que a pele de porco é um modelo que mimetiza a pele humana. A pele foi excisada da parte exterior das orelhas de porco obtidas a partir de um matadouro local, o tecido subcutâneo foi removido, as orelhas foram lavadas com água destilada e congeladas para utilização posterior. A área de difusão disponível do compartimento doador das células de Franz é de $5,72 \text{ cm}^2$. A célula de Franz foi montada com a pele da orelha do porco separando o compartimento doador (preenchido com 2mL) do compartimento receptor (preenchido com 75mL de SDS 0,5%). Após 6h, 6h com massagem e 12h de permeação, EC, FP e EP foram removidos usando um método de fita adesiva, como descrito em 4.3.4. O FP foi removido com auxílio de cola de cianoacrilato. Epiderme/derme foi cortada em pequenos pedaços e deixados sob agitação magnética por 3 horas em 3 mL de metanol. A solução foi filtrada e injetada no CLAE para quantificação de DUTA permeada na pele.

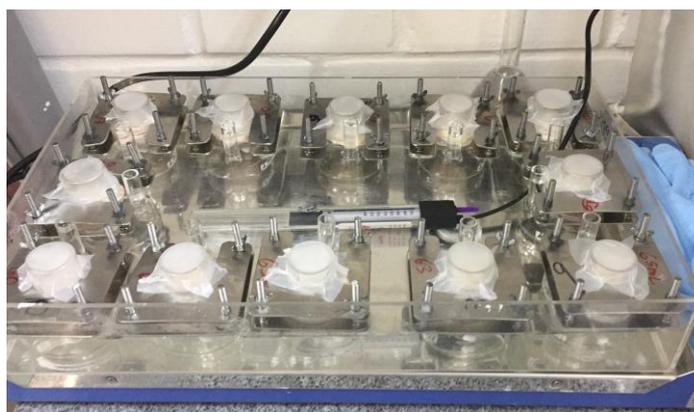


Figura 11. Ensaio de permeação por célula de Franz modificada.

Posteriormente, para podermos analisar melhor o direcionamento aos folículos pilosos, foi feito um cálculo onde a concentração obtida no folículo piloso foi dividida pela concentração do estrato córneo juntamente com a

concentração da epiderme viável. Então, o fator de direcionamento aos folículos pilosos = FP/EC+EP.

4.11. Análise dos dados

Os dados foram expressos como média \pm desvio padrão (DP) e analisados pelo software GraphPad Prism®. Diferenças significativas entre o conjunto de dados foram obtidas por análise de variância (*two-way ANOVA*), seguido pelo teste de comparação múltipla de Tukey para comparar mais de dois grupos experimentais e teste não pareado T de Student para comparação de dois grupos experimentais. O nível de significância foi estabelecido como $p < 0,05$.

5. Resultados e Discussão

5.1. Determinação do comprimento de absorção máxima para a DUTA

Uma varredura foi feita entre a faixa de comprimento de onda de 200 a 600nm de uma solução estoque com concentração igual a $100\mu\text{g/mL}$. O comprimento de onda de máxima absorção para DUTA foi de 280nm, em que apresentou ser mais seletivo por mostrar menos interferência do próprio solvente e referente a outros picos no cromatograma.

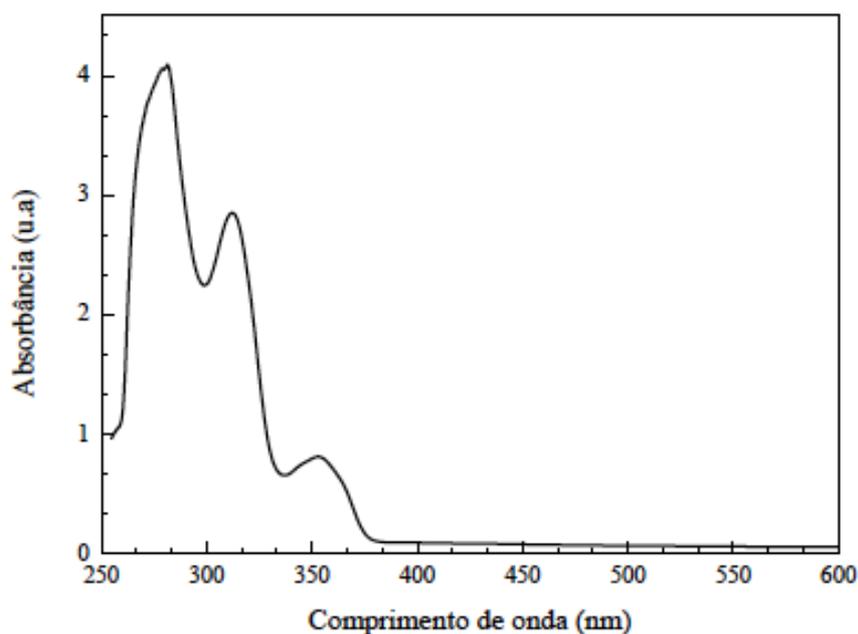


Figura 12. Espectro de absorvância no UV/Vis de uma solução em metanol a 100µg/mL. Faixa de varredura: 200 a 600nm.

5.2. Método analítico para quantificação da DUTA

A DUTA foi quantificada com auxílio de um Cromatógrafo Líquido de Alta Eficiência (CLAE), modelo Shimadzu LC 20-AD. Foi utilizada uma coluna de fase reversa C₁₈ (15cm x 4,6mm) e fase móvel composta por acetonitrila: ácido fosfórico 0,01M (62:38). A vazão foi de 0,8mL/min, o volume de injeção das amostras foi de 20µL, o forno foi utilizado à temperatura de 40°C e a detecção realizada em 280 nm, de acordo com a determinação do comprimento de onda de absorção máxima feita através do espectrofotômetro de UV/Vis (Shimadzu. UV 1800), apresentando tempo de retenção da DUTA em 11,9 minutos.

5.3. Validação do método analítico para quantificação de DUTA

5.3.1. Especificidade/Seletividade

A capacidade do método de quantificar a DUTA na presença dos interferentes da pele (EC, FP, EP), dos componentes das nanopartículas e do meio foi avaliada. Os resultados das análises podem ser observados nos

cromatogramas abaixo, Figura 13 e 14. O fármaco DUTA apresenta tempo de retenção em 11,9 minutos.

A Figura 13 apresenta os cromatogramas referentes à injeção de 20 μL da solução de DUTA 7,5 $\mu\text{g/mL}$ em metanol e dos interferentes da pele (EC, FP, EP) (5,72 cm^2 de pele/3 mL de metanol, 3 horas).

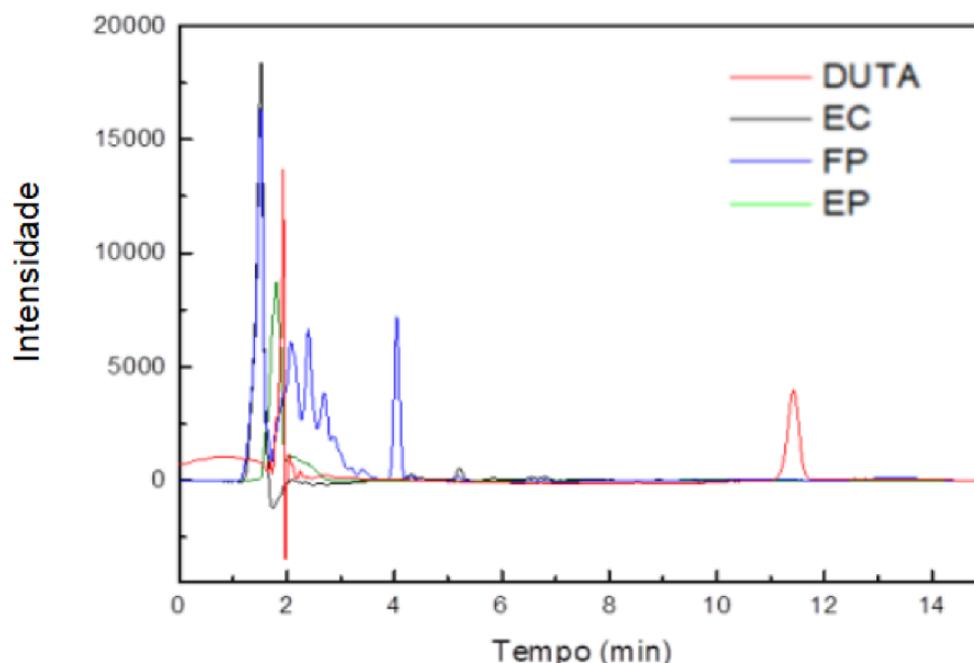


Figura 13. Cromatogramas referentes à injeção de uma solução de DUTA (7,5 $\mu\text{g/mL}$) em metanol e os interferentes da pele (EC, FP, EP).

A Figura 14 mostra os cromatogramas referentes à injeção de 20 μL das soluções: DUTA 7,5 $\mu\text{g/mL}$ em metanol, meio (60 Água : 0,5 TWEEN[®] 80: 40 EG) e os componentes das NPs.

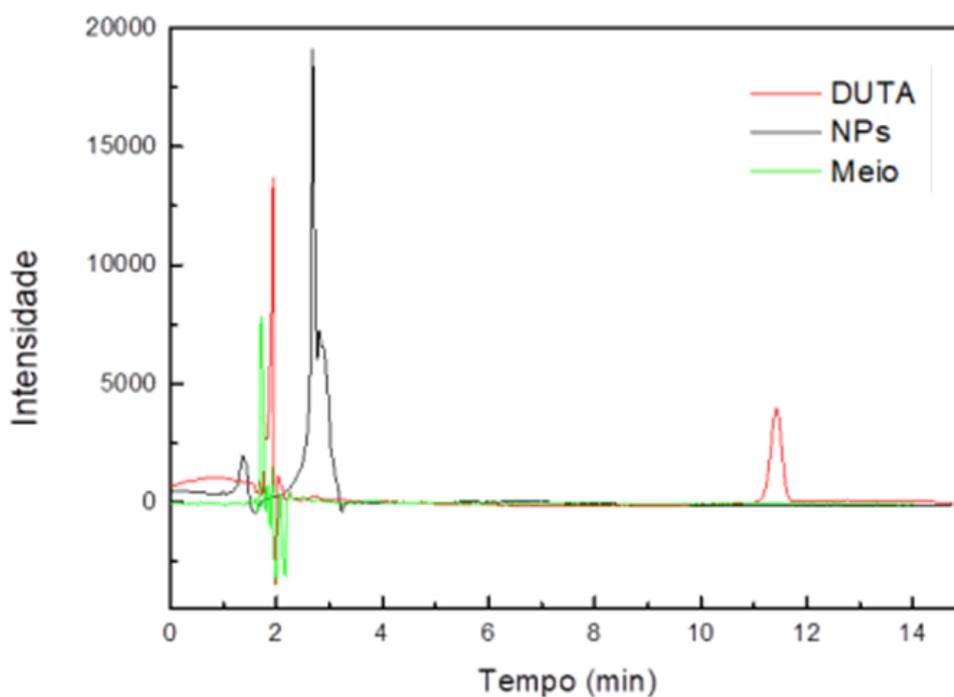


Figura 14. Cromatogramas referentes à injeção de uma solução de DUTA (7,5 µg/mL) em metanol, meio e dos componentes das nanopartículas (NPs).

5.3.2. Linearidade

A análise da linearidade de um método visa verificar a capacidade deste obter dentro de um intervalo definido resultados diretamente proporcionais às concentrações do analito (RIBANI et al., 2004). As curvas analíticas obtidas para a quantificação da DUTA em metanol e no meio (60 Água : 0,5 TWEEN[®] 80: 40 EG) estão apresentadas nas Figuras 15 e 16, respectivamente.

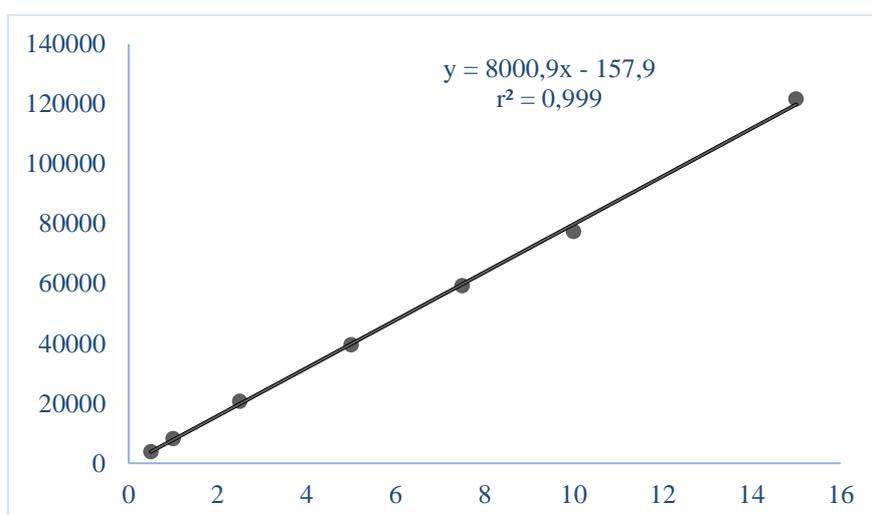


Figura 15. Representação gráfica da curva analítica obtida para a DUTA por CLAE. Concentrações diluídas de metanol. Equação da reta: $y = 8000,9x - 157,9$ e coeficiente de correlação linear: $r^2 = 0,999$.

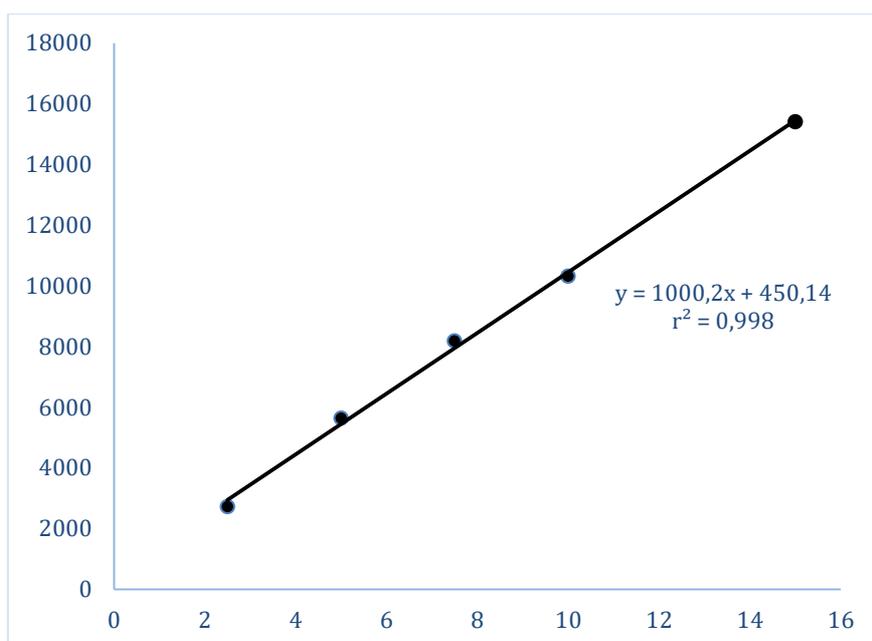


Figura 16. Representação gráfica da curva analítica obtida para a DUTA por CLAE. Concentrações diluídas em meio. Equação da reta: $y = 1000,2x + 450,14$ e coeficiente de correlação linear: $r^2 = 0,998$.

A partir da análise da regressão linear foi possível verificar que o método desenvolvido pode ser considerado linear para a quantificação de DUTA na faixa de concentração de 0,5 – 15 μ g/mL em metanol (0,999) e no meio (0,998), apresentando coeficiente de correlação linear de acordo com o critério mínimo aceitável de 0,99 estabelecido pela ANVISA (ANVISA, 2003).

5.3.3. Precisão

A precisão é a avaliação da proximidade dos resultados obtidos em uma série de medidas de uma amostragem múltipla de uma mesma amostra (ANVISA, 2003), como apresentado na Tabela 2.

Tabela 2. Análise da precisão e exatidão intra e intercorrida do método de quantificação em CLAE da DUTA diluída em metanol.

Concentração Teórica (µg/mL)	Concentração Experimental (média ± DP; µg/mL)	Precisão CV (%)	Exatidão E (%)
Intracorrida (n=6)			
0,5	0,52 ± 0,02	4,61	104,36
7,5	7,37 ± 0,25	3,35	98,23
15,0	14,72 ± 0,28	1,91	98,16
Intercorrida (n=6)			
0,5	0,50 ± 0,02	4,20	100,73
7,5	7,43 ± 0,18	2,38	99,02
15,0	15,01 ± 0,42	2,81	100,10

A precisão foi avaliada e os valores de CV % para as concentrações 0,5; 7,5 e 15 µg/mL de DUTA em metanol, apresentados na Tabela 3, estão de acordo com os limites determinados, sendo esses abaixo do valor máximo aceitável para CV% de 5%.

5.3.4. Exatidão

Os valores de exatidão, apresentados na Tabela 3, foram expressos em termos de porcentagem de recuperação de DUTA das camadas da pele (EC, FP e EP) por 3 mL de metanol estando dentro dos limites aceitáveis para validação de métodos bioanalíticos entre 85,0% e 115,0% (ANVISA, 2003; ICH, 2005).

Os testes de recuperação foram realizados com o objetivo de validar o processo de extração do fármaco das camadas da pele, bem como analisar a capacidade extratora do metanol para DUTA.

Tabela 3. Porcentagem de recuperação da DUTA do EC, FP e EP utilizando 3 mL de metanol como solvente extrator.

Amostras	Concentração Teórica DUTA ($\mu\text{g/mL}$)	Concentração Média DUTA ($\mu\text{g/mL}$)	DP	Recuperação E(%)
EC	0,5	0,50	0,16	99,92
FP		0,51	0,01	101,04
ER		0,49	0,02	97,34
EC	7,5	7,28	0,66	97,02
FP		7,59	0,56	101,26
ER		7,61	0,46	101,44
EC	15,0	14,72	0,18	98,14
FP		14,93	0,71	99,54
ER		14,80	0,28	98,66

5.3.5. Limite de detecção (LD) e quantificação (LQ)

Os valores de LD e LQ encontrados para o método desenvolvido estão apresentados na Tabela 4. Estes valores representam as menores quantidades de DUTA que podem ser detectadas e quantificadas com precisão e exatidão. Sendo assim, o método é adequado para quantificação das amostras de DUTA em metanol e no meio, as quais apresentaram valores superiores aos de LD e LQ.

Tabela 4. Limite de Quantificação e Detecção teóricos da DUTA diluída em metanol e meio

Solvente	LQ $\mu\text{g/mL}$	LD $\mu\text{g/mL}$
Metanol	0,26	0,09
60 Água: 0,5 TWEEN® 80: 40 EG	0,28	0,09

5.4. Obtenção das nanopartículas

As nanopartículas foram obtidas através do processo de deposição interfacial de polímeros pré-formados e no intuito de se estabelecer a melhor proporção polímero/fármaco que resultasse em uma suspensão de NPs com alta eficiência de encapsulação e estabilidade. As quantidades dos polímeros policaprolactona (100mg) e quitosana (30mg), nas NPs com cobertura, foram mantidas, enquanto diferentes concentrações de DUTA foram testadas,

sendo essas: 10mg; 12,5mg; 15mg; 20mg; 30mg, como apresentado na Tabela 5.

Tabela 5. Testes de diferentes proporções polímero/fármaco na obtenção das nanopartículas.

Policaprolactona (mg)	DUTA (mg)	polímero/fármaco
100	10	10:1
100	12,5	8:1
100	15	6,66:1
100	20	5:1
100	30	3,33:1

Após a obtenção das NPs com (NPYQS) e sem cobertura de quitosana (NPY) apresentando diferentes proporções de DUTA, essas foram avaliadas nos tempos 1, 2, 5 e 10 dias utilizando os parâmetros de diâmetro hidrodinâmico (D_H), índice de polidispersão (PDI), potencial zeta (ζ) e EE%, Tabelas 6 e 7.

Tabela 6. Estabilidade e EE% das NPY sem QS no período de 10 dias.

DUTA	10mg	12,5mg	15mg	20mg	30mg
NPY	Dia 1				
D_H (nm)	199,03±0,51	182,36±2,68	185,46±2,04	220,8±1,13	220,43±2,22
PDI	0,116±0,006	0,172±0,003	0,273±0,008	0,266±0,004	0,391±0,002
Potencial ζ	-13,63±0,64	-19,3±0,95	-22,06±1,51	-23,7±1,93	-19,16±2,11
EE%	96,69±1,81	97,67±0,23	98,07±0,14	98,43±0,22	97,63±0,24
	Dia 2				
D_H (nm)	199,1±1,33	201,26±2,42	202,2±2,66	192,56±3,82	210,1±3,8
PDI	0,103±0,002	0,234±0,007	0,259±0,003	0,269±0,002	0,292±0,002
Potencial ζ	-12,03±0,42	-16,9±2,62	-18,9±1,17	-18,5±0,4	-17,19±1,33
EE%	98,17±1,18	98,30±0,25	98,86±0,13	98,99±0,13	98,88±0,02
	Dia 5				
D_H (nm)	198,46±0,31	215,4±1,95	197,56±2,71	222,3±1,57	212,66±1,68
PDI	0,135±0,005	0,273±0,004	0,288±0,002	0,395±0,004	0,406±0,008
Potencial ζ	-17,4±0,46	-18,6±0,73	-17,6±0,73	-20,26±1,08	-18,3±0,73
EE%	97,45±1,44	99,21±0,06	99,18±0,09	99,45±0,06	99,06±0,08
	Dia 10				
D_H (nm)	201,83±1,15	221,46±2,42	215,63±2,91	223,46±3,02	255,46±3,77
PDI	0,133±0,002	0,275±0,003	0,440±0,011	0,394±0,004	0,512±0,008
Potencial ζ	-17,1±1,8	-10,37±1,5	-16,86±1,02	-17,53±1,17	-16,33±1,28
EE%	98,45±1,80	99,96±0,00	98,87±0,74	98,79±0,16	98,94±0,10

D_H (nm), PDI, potencial ζ e EE% (média/DP)

Conforme os resultados apresentados nas Tabelas 6 e 7, as nanopartículas sem (NPY) e com cobertura de quitosana (NPYQS) que continham 20mg e 30mg de DUTA, em 10 dias de estabilidade, apresentaram um PDI mais altos que as partículas de 10mg. Esses nanossistemas estavam polidispersos apresentando corpo de fundo nos tubos Falcon e apesar da eficiência de encapsulação das nanopartículas em questão terem sido maiores que 80%, isto mostra que os sistemas não eram estáveis.

Tabela 7. Estabilidade e EE% das NPYQS no período de 10 dias.

DUTA	10mg QS	12,5mg QS	15mg QS	20mg QS	30mg QS
NPY-QS	Dia 1				
D_H (nm)	224,93±3,44	279,3±0,67	270,53±3,64	326,5±4,2	313±2,6
PDI	0,231±0,001	0,308±0,002	0,310±0,007	0,449±0,004	0,366±0,007
Potencial ζ	40,23±0,8	42,86±2,35	42,73±1,22	40,9±0,93	40,86±1,48
EE%	94,73±2,97	76,32±4,6	83,81±0,79	78,16±0,31	97,07±0,52
	Dia 2				
D_H (nm)	234,03±1,4	309±2,8	303,13±3,62	335,2±1,8	326,4±4,06
PDI	0,251±0,011	0,335±0,003	0,336±0,002	0,454±0,003	0,413±0,002
Potencial ζ	39,93±0,28	41,63±0,95	42,53±0,91	40,3±1,66	42,36±1,31
EE%	95,11±3,34	73,47±3,06	88,69±0,81	83,21±1,05	96,02±0,18
	Dia 5				
D_H (nm)	247,13±1,6	316,6±1,95	298,23±3,68	348,1±1,6	329,63±5,00
PDI	0,256±0,015	0,388±0,001	0,367±0,018	0,406±0,002	0,397±0,005
Potencial ζ	41,53±1,24	41,6±0,86	43,93±1,51	40,66±0,51	42,43±2,0
EE%	95,94±2,75	79,65±2,17	94,09±0,48	92,96±0,73	98,01±0,19
	Dia 10				
D_H (nm)	227,76±2,17	313,06±2,15	290,63±5,37	328,1±1,86	404±2,53
PDI	0,259±0,015	0,303±0,004	0,345±0,009	0,44±0,013	0,543±0,007
Potencial ζ	41,46±0,91	42,46±1,71	44,46±1,88	41,21±1,65	42,25±1,52
EE%	94,72±2,02	97,26±3,60	96,73±4,32	99,14±0,34	81,50±1,61

DH (nm), PDI, potencial ζ e EE% (média/DP)

Já as outras nanopartículas com 10mg; 12,5mg e 15mg demonstraram estar dentro dos parâmetros aceitáveis de PDI e apresentaram uma eficiência de encapsulação maior de 90%. Para a continuidade aos estudos as NPs contendo 10mg de DUTA foram escolhidas por apresentarem uma boa eficiência de encapsulação, PDI mais baixo entre todas as partículas, o que aparentemente, demonstra que o sistema está mais monodisperso, portanto, mais estável. Por se tratar de uma aplicação tópica é possível que a menor

proporção de fármaco seja considerada ideal pelo fato de a aplicação ser no local de ação.

Um estudo randomizado com a solução tópica da finasterida a 0,25% (2,275mg) demonstrou uma redução de aproximadamente 70% no nível de DHT no sêrum e no couro cabeludo (CASERINI et al., 2016). Por fim, se a finasterida em uma dose de 2,2375mg conseguiu uma redução de 70% de DHT no couro cabeludo. Pode-se esperar que a dutasterida apresente uma inibição ainda maior por ser capaz de inibir os dois tipos de isozima na área afetada.

5.5. Morfologia das nanopartículas

As imagens obtidas por MET, Figura 17, das NPY (A) e NPYQS (B), mostram que essas apresentam formato esférico e tamanho próximo aos obtidos pela técnica de espalhamento dinâmico de luz (200 nm) estando em conformidade com outros estudos de NPs poliméricas obtidas pelo método de deposição interfacial de polímeros pré-formados (DE BRUM et al., 2015). O formato esférico e o tamanho das NPs resultam da viscosidade do óleo que influencia na formação de gotículas durante a adição da fase orgânica na fase aquosa (FONTANA et al., 2009).

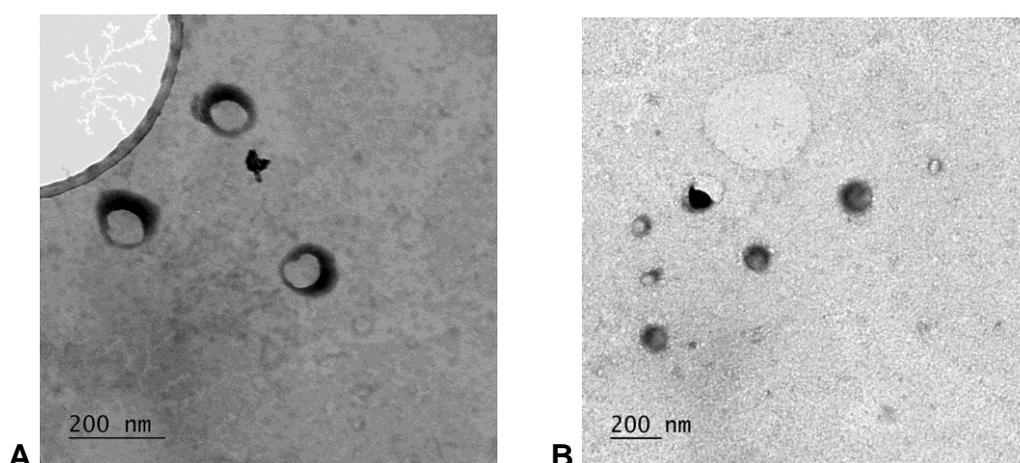


Figura 17. Fotomicrografia das NPY (A) e NPYQS (B) obtidas por microscopia eletrônica de transmissão.

5.6. Eficiência de encapsulação

A seguir, estão os gráficos resultantes dos testes realizados variando os parâmetros de velocidade e temperatura após 30 minutos de centrifugação para estabelecer o protocolo de preparação das amostras para a determinação da EE% de DUTA pelas NPs.

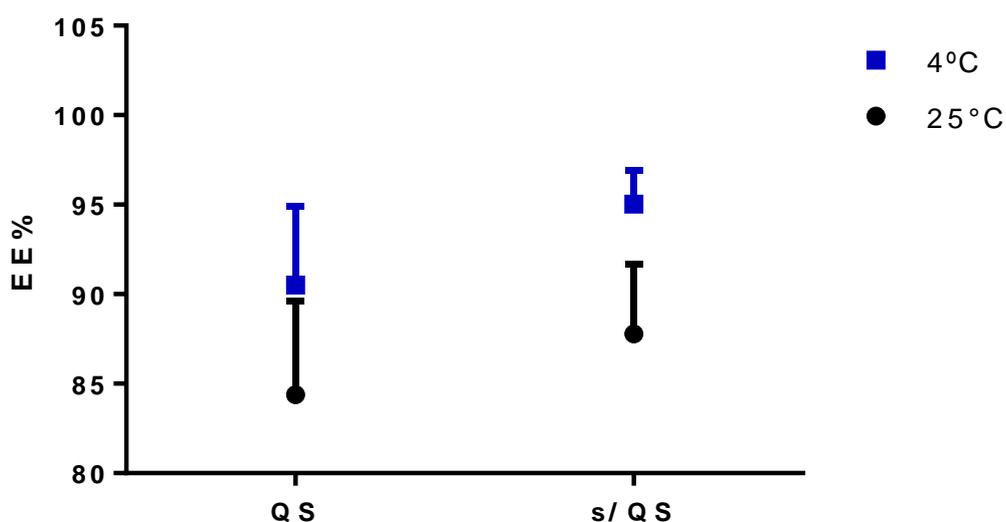


Figura 18. Comparação da eficiência de encapsulação da partícula com e sem QS entre Temperatura ambiente e geladeira a 4000 rpm.

Como apresentado na Figura 18, a centrifugação das amostras a 4°C é mais eficiente que a temperatura ambiente, o que resultou em uma melhor quantificação da EE% de DUTA nas NPs à 4000 rpm por 90 minutos.

Para reduzir o tempo de centrifugação, sem prejudicar a quantificação da EE% das NPs, diferentes velocidades de rotação (4.000; 10.000 e 15.000 rpm) foram testadas por 30 minutos a 4°C, conforme Figura 19.

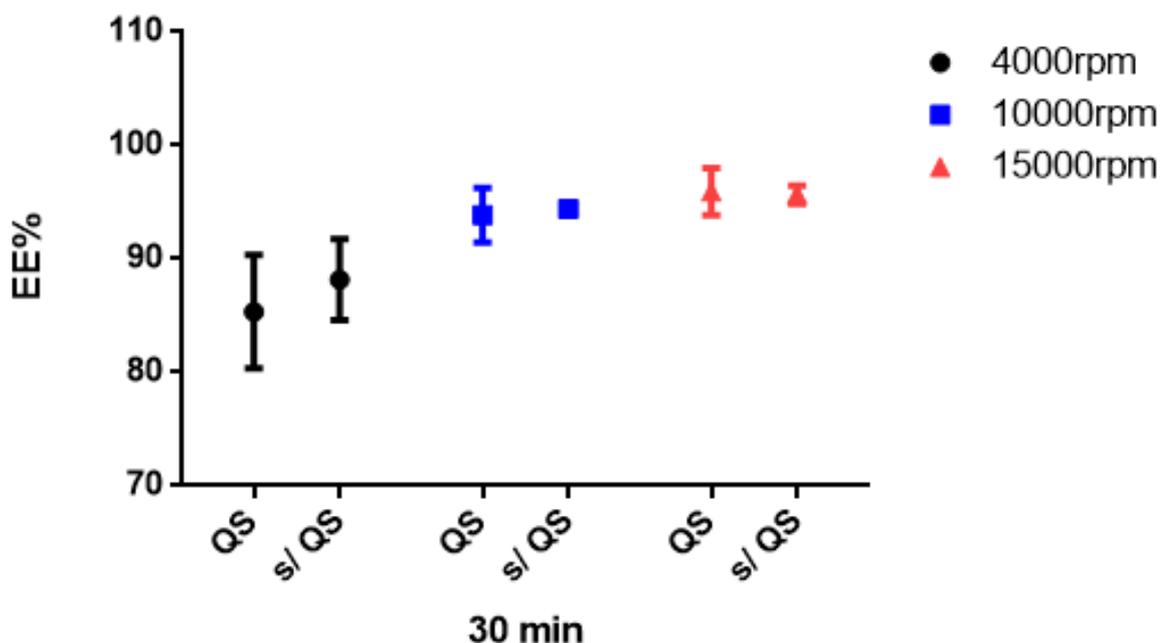


Figura 19. Comparação da eficiência de encapsulação da partícula com e sem QS em diferentes rotações (rpm).

Comparando a EE% obtida em diferentes forças de centrifugação analisadas por 30 minutos a 4°C (Figura 19), verificou-se que com 10.000 e 15.000 rpm foi possível obter uma avaliação da EE% mais fidedigna, devido ao fato de a maior força centrífuga garantir que todas as nanopartículas tenham precipitado. Sendo assim, o protocolo estabelecido para a quantificação de DUTA encapsulada nas NPs foi de 4°C, 30 minutos a 15.000 rpm.

Em concordância com estudos prévios, as NPs com (QS) e sem quitosana (s/QS) obtidas apresentaram uma boa eficiência de encapsulação da DUTA sendo essa superior a 90% (NOOR et al., 2017).

5.7. Estudo de Estabilidade

Os parâmetros diâmetro hidrodinâmico (D_H), PDI, potencial ζ , pH e EE% das NPs (NPY e NPY-QS) foram verificados nos dias 0, 7, 15, 30, 60 e 90 dias em temperatura ambiente (TA) e geladeira (GEL) para avaliar a estabilidade das NPs durante esse período nas diferentes condições. O pH

também foi monitorado permanecendo durante o período de estudo, em torno de 4,7 para ambas NPs.

Como pode ser observado nas figuras 20, 21 e 22, o D_H , PDI e potencial zeta também se mostraram estáveis nas nanopartículas NPY-QS e NPY em temperatura ambiente e geladeira durante o período de 90 dias.

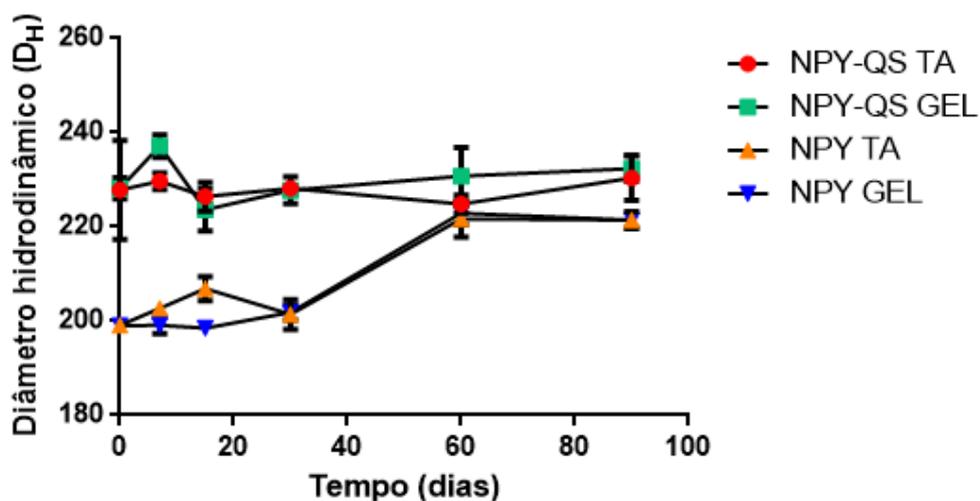


Figura 20. Diâmetro hidrodinâmico das NPYQS e NPY por 90 dias em temperatura ambiente e geladeira.

As nanopartículas NPY apresentaram D_H aproximado de 200 nm e as NPY-QS próximo aos 230nm, devido ao revestimento de quitosana. Os D_H observados em ambas NPs encontram-se de acordo com estudos prévios (DE BRUM et al., 2015; NOOR et al., 2017). Esse tamanho pode ser explicado pela viscosidade do óleo que influencia a formação da gotícula durante a adição da fase orgânica na fase aquosa (FONTANA et al., 2009).

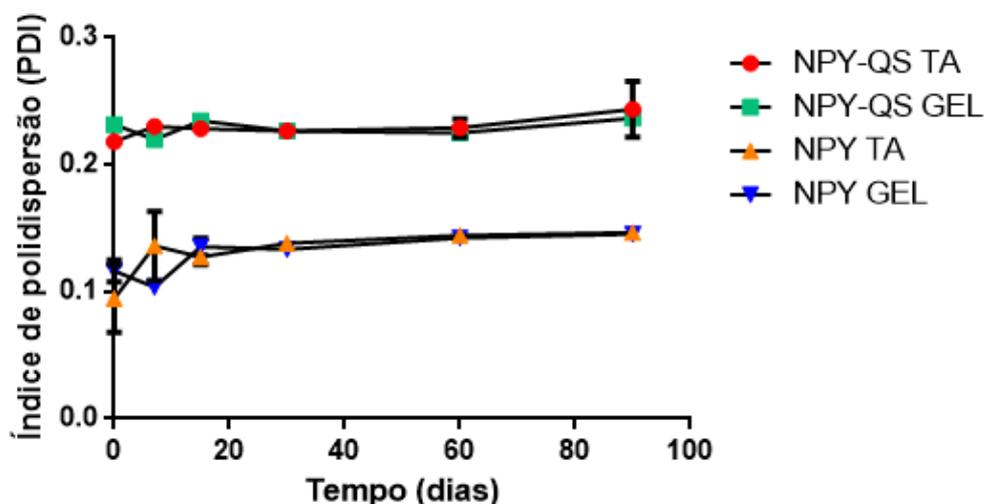


Figura 21. Índice de polidispersão das NPYQS e NPY por 90 dias em temperatura ambiente e geladeira.

As NPY em temperatura ambiente e geladeira se apresentaram mais monodispersas que as NPY-QS, Figura 21.

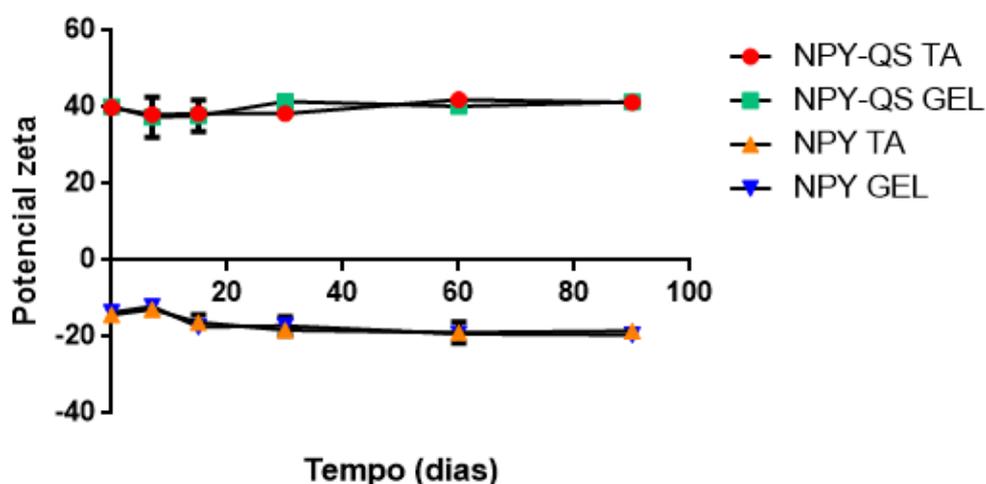


Figura 22. Potencial zeta das NPYQS e NPY por 90 dias em temperatura ambiente e geladeira.

As NPY apresentaram carga superficial negativa em torno de -15mV devido a presença do ácido fosfatídico da lecitina e do monoestearato de sorbitano na fase orgânica sendo coerente com outros estudos feitos com essa mesma nanopartícula (BENDER et al., 2012). Por sua vez, as NPY-QS adquirem carga positiva (~40mV), quando se adiciona a camada de quitosana para recobrir a partícula, que antes era carregada negativamente.

Estudos mostram que as partículas carregadas negativamente, como é o caso da partícula em questão, sofrem interação eletrostática com a quitosana carregada positivamente (RIDOLFI et al., 2012). A carga superficial positiva das NPY-QS pode facilitar a interação dessa com as membranas biológicas (CALVO et al., 1997).

Os resultados obtidos demonstram estar de acordo com estudos que utilizaram a quitosana para revestir nanopartículas e mostram que os potenciais zeta apresentam valores acima de +30mV. Assim, pode-se inferir que a suspensão de nanopartículas está estável, pois as cargas superficiais acima de 30mV (em módulo) evitam aglomeração entre as nanopartículas (SCHAFFAZICK et al., 2003).

Ambas NPs apresentaram alta eficiência de encapsulação sendo essa superior a 90%. Estudos relatam que a alta eficiência de encapsulação de fármacos hidrofóbicos nesse tipo de nanopartícula polimérica está relacionada a maior solubilidade desses no núcleo oleoso. Quanto mais apolar for o fármaco, maior será a eficiência de encapsulação (CALVO; VILAJATO; ALONSO, 1996).

Sendo assim, a DUTA encapsulada nas NPs se encontram solubilizadas no núcleo oleoso que, devido a sua grande lipofilicidade, reduz a perda de fármaco para o meio hidrofílico.

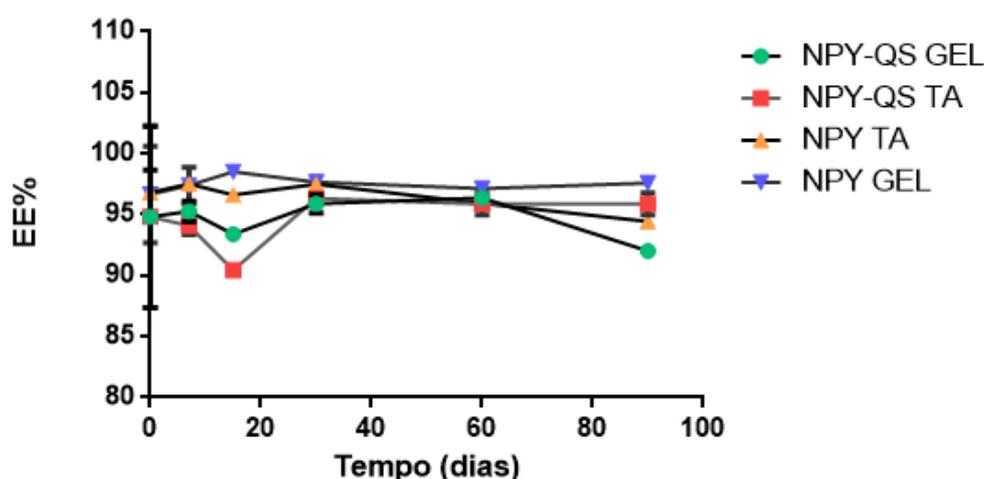


Figura 23. Eficiência de encapsulação das NPYQS e NPY por 90 dias em temperatura ambiente e geladeira.

5.8. Determinação da solubilidade da DUTA em diferentes meios

Pelo fato de a DUTA apresentar um elevado coeficiente de partição $\text{LogP}=5,79$, o que lhe confere uma grande hidrofobicidade, alguns meios foram testados para que a DUTA estivesse mais bem solubilizada sem que houvesse a adição de solventes orgânicos. Dessa forma, o meio em que a DUTA se encontrou mais bem solubilizada foi o composto por 60 Água: 0,5 TWEEN[®] 80: 40 EG, Tabela 8.

Tabela 8. Solubilidade da DUTA em diferentes meios.

Solubilidade DUTA Meios	Média (µg/mL)	DP	10% (µg/mL)
Água : Etanol (80:20)	1,70	0,48	0,17
TWEEN [®] 20 (2%)	22,63	0,44	2,26
Pluronic [®] F127 (1%)	25,75	0,32	2,58
SDS 0,5% - Pluronic [®] F127 0,2%	26,22	0,90	2,62
Pluronic [®] F127 0,2%	31,61	2,35	3,16
60Água:0,5TWEEN [®] 80:1PEG4000	71,76	0,91	7,18
60Água:0,5 TWEEN [®] 80:40 EG	120,58	1,14	12,06

Sendo assim, no ensaio de liberação *in vitro* da DUTA a partir das NPs, o meio 60 Água:0,5 TWEEN[®] 80:40 EG, foi utilizado para que o ensaio ocorresse dentro das condições *sink*, ou seja, que a concentração de fármaco no meio receptor não ultrapasse 10% da solubilidade desse no meio, garantindo assim que não houvesse a saturação do meio receptor, o que prejudicaria os ensaios de liberação da DUTA pelas NPs.

5.9. Estudo *in vitro* de liberação da DUTA a partir das nanopartículas

O estudo de liberação foi realizado para avaliar o perfil de liberação da DUTA a partir das NPs. A liberação foi feita sem membrana em um balão volumétrico de 25mL contendo o meio: 60 Água:0,5 TWEEN[®] 80:40 EG, escolhido pelo ensaio de solubilidade da DUTA, para garantir que o experimento ocorresse em condição *sink*. O controle (CTY) utilizado no ensaio de liberação foi constituído pelo meio apresentando o mesmo pH de 4,7 e a mesma concentração de DUTA (125µg/mL) presente nas nanopartículas (NPY e NPYQS).

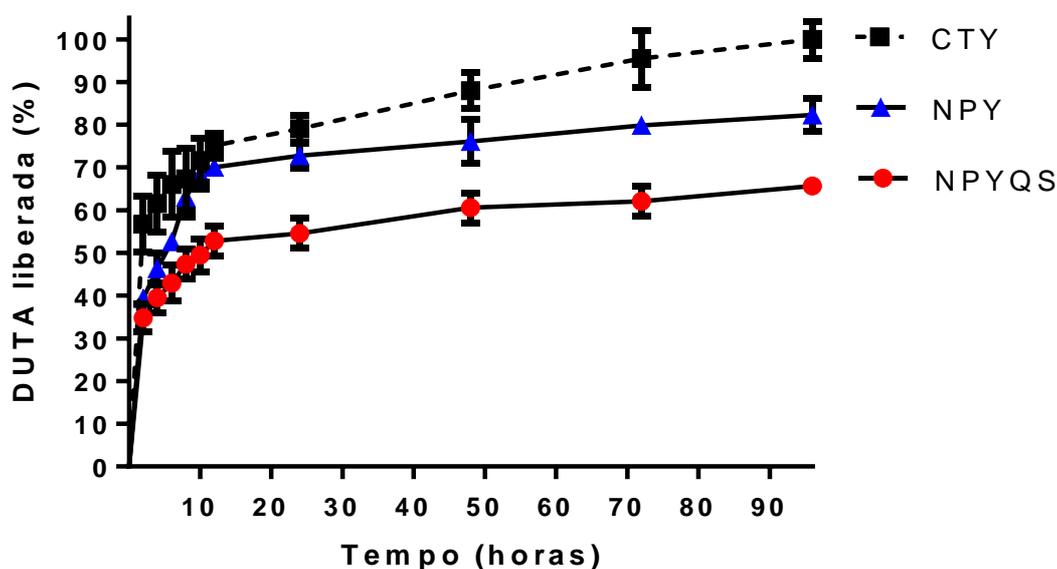


Figura 24. Perfil de liberação da DUTA a partir do CTY, NPY e NPYQS contendo 125µg/mL do fármaco, pH 4,7.

As NPY e NPYQS apresentaram 82% e 65% de DUTA liberada, respectivamente, após 96 horas de experimento (Figura 24). Nas primeiras 6 horas de estudo, as NPY e NPYQS apresentaram um padrão semelhante de liberação da DUTA não havendo diferença significativa entre elas. Entretanto, com relação ao CTY estas apresentaram uma liberação mais controlada da DUTA nesse mesmo período ($p < 0,0001$).

O perfil de liberação controlada de DUTA pela NPY é significativo quando comparado ao CTY nas 6 horas iniciais e 48 horas finais do experimento ($p < 0,0001$). Enquanto, as NPYQS, a partir da oitava hora de estudo, apresentaram uma liberação mais controlada do fármaco em relação as NPY e CTY ($p < 0,0001$), permanecendo assim até o final do estudo.

A taxa de liberação lenta pode ser dada pelo fato da policaprolactona ser altamente hidrofóbica e cristalina que associada à característica lipofílica da dutasterida implica em uma difusão lenta do fármaco do núcleo oleoso para o meio, já que este é liberado da estrutura mediante difusão através da parede polimérica (SCHAFFAZICK et al., 2003; FONTANA et al., 2009).

Como pode ser visto na Figura 24, o revestimento da NP com quitosana retardou a liberação da DUTA. Estudos prévios avaliaram o efeito

do revestimento com quitosana em micropartículas, assim notaram que com o aumento do peso molecular da quitosana, proporcionalmente, houve um aumento da viscosidade e conseqüentemente, uma diminuição da taxa de liberação do fármaco no experimento (CHIOU et al., 2001).

Em outro estudo, o revestimento de quitosana também retardou a liberação da DUTA em carreadores lipídicos sendo 72% dessa liberada em 36h de estudo (NOOR et al., 2017).

5.10. Estudos de permeação *in vitro*

Os estudos de permeação foram realizados com pele de orelha de porco devido à similaridade da estrutura folicular com a da pele humana, onde seus infundíbulos se estendem profundamente na derme (PRAÇA et al., 2018).

Os resultados apresentados nos gráficos 25, 26, 27 e 28 mostram a quantificação de DUTA presente nas camadas da pele após 6h, 6h com massagem de 3 minutos e 12h de permeação, além do direcionamento folicular do fármaco nas permeações realizadas.

No estrato córneo (gráfico 25), em 6h de permeação, não houve diferença significativa na quantificação de DUTA entre CTY e nanopartículas. Ao contrário do ocorrido anteriormente, na permeação de 6h com massagem, as nanopartículas demonstraram ter diferença significativa do CTY. A massagem resultou em uma retenção de DUTA 3 vezes maior no estrato córneo para ambas nanopartículas. Comparando a quantificação de DUTA na permeação de 6h com a de 12h para NPYQS, há um aumento significativo de fármaco no EC. Na permeação de 6h de NPYQS, a estimulação mecânica proporcionou uma retenção de DUTA no EC similar à obtida em 12h.

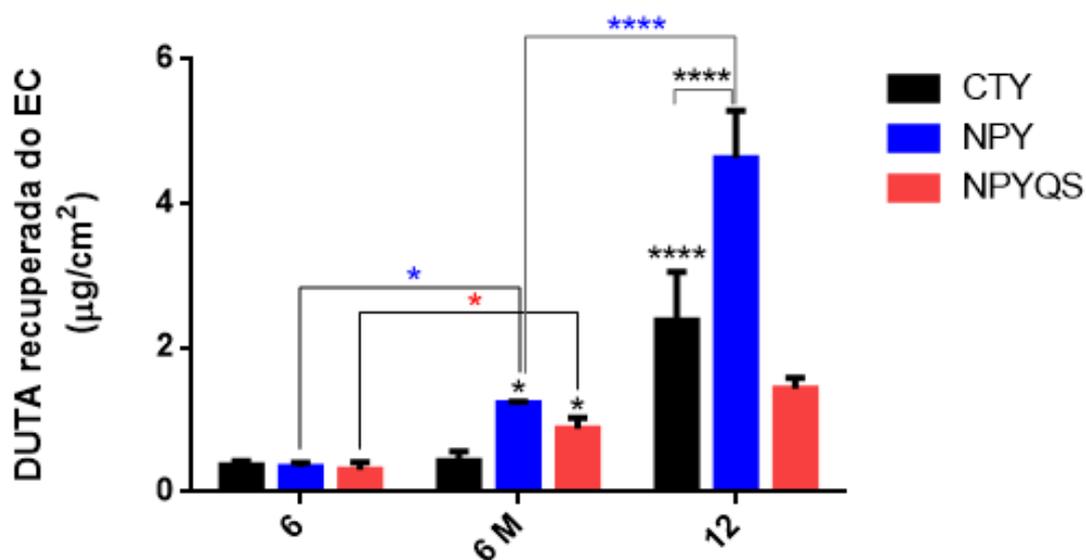


Figura 25. Quantidade de DUTA retida no EC em 6h, 6h com massagem e 12 horas de permeação passiva a partir das NPY-QS, NPY e do CTY (média \pm DP, n = 6).

No folículo piloso (gráfico 26), em 6h de permeação, não houve diferença significativa na quantificação de DUTA entre CTY e nanopartículas. Já na permeação de 6h com massagem houve diferença significativa entre CTY e NPs.

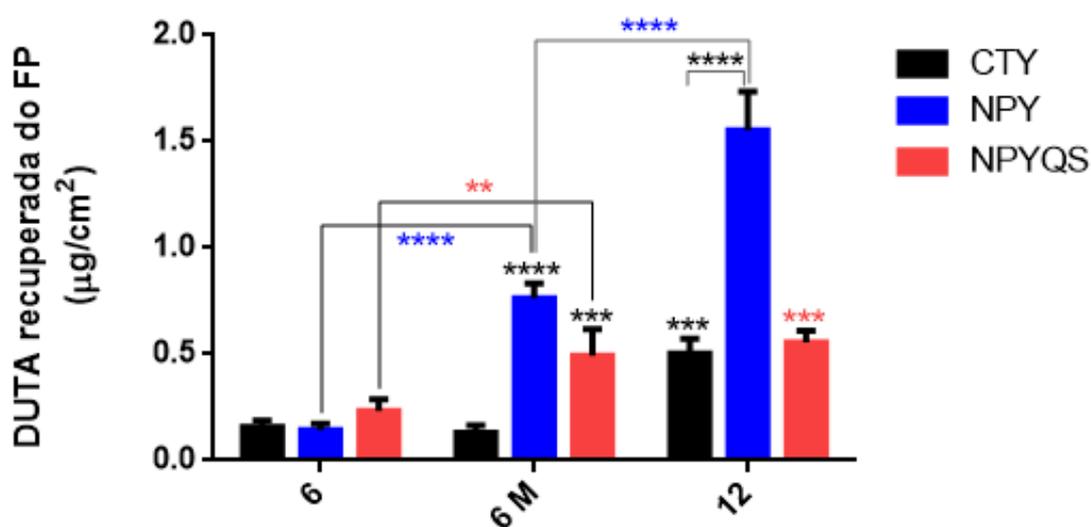


Figura 26. Quantidade de DUTA retida no FP em 6h, 6h com massagem e 12 horas de permeação passiva a partir das NPY-QS, NPY e do CTY (média \pm DP, n=6)

Os resultados da permeação de 6h com e sem massagem, quando comparados, evidenciam que a estimulação mecânica aumentou em 5 e 2

vezes a penetração folicular da DUTA veiculada por NPY e NPYQS, respectivamente. Em relação à permeação de 12h, a estimulação mecânica proporcionou uma penetração folicular de DUTA em NPYQS similar à obtida em 12h, enquanto na NPY a DUTA recuperada correspondeu à aproximadamente 50% do valor quantificado em 12h.

Na epiderme viável (gráfico 27), a quantificação de DUTA não apresentou diferença significativa entre as permeações de 6h com e sem massagem para CTY e NPs. Na comparação de 6h de permeação com massagem e 12h houve diferença significativa apenas para NPY e CTY e manutenção da quantidade de DUTA em EP para NPYQS.

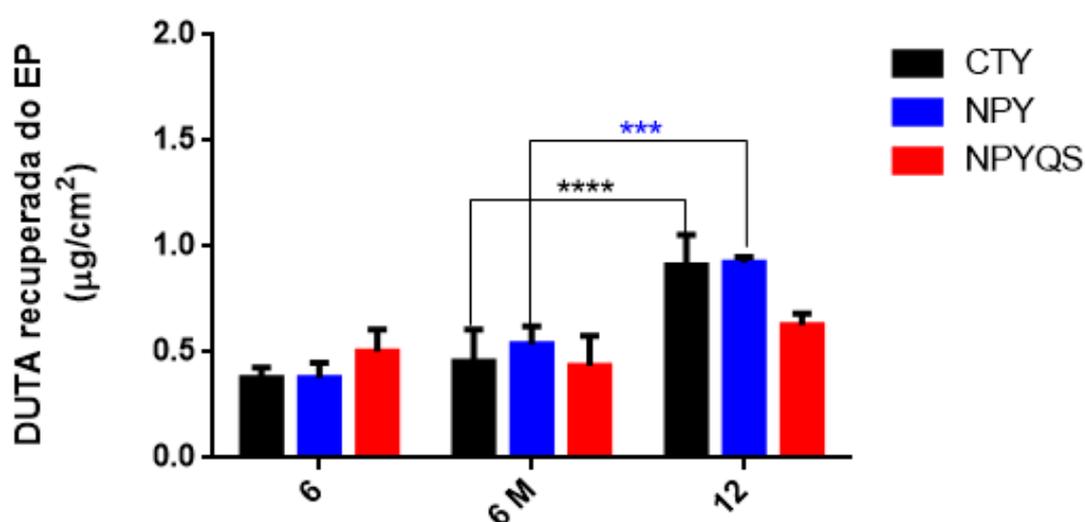


Figura 27. Quantidade de DUTA retida no EP em 6h, 6h com massagem e 12 horas de permeação passiva a partir das NPY-QS, NPY e do CTY (média \pm DP, n = 6).

Para analisar melhor a quantidade de DUTA direcionada para o folículo piloso, um fator de direcionamento foi utilizado (Fator FP). Através deste, foi possível verificar que a massagem proporcionou um direcionamento similar da DUTA para o folículo piloso em ambas nanopartículas, não apresentando diferença significativa entre elas. Comparando as permeações de 6h com e sem massagem, o estímulo mecânico induziu um direcionamento 2 vezes maior da DUTA para o folículo piloso em ambas NPs. O fator de direcionamento folicular obtido em 6h de

permeação com massagem é significativamente maior comparado ao de 12h de permeação para NPY e NPYQS. Já em 12h de permeação passiva, a NPY proporciona um direcionamento semelhante da DUTA para o folículo em relação à NPYQS, sendo esse em ambas significativamente maior que no CTY.

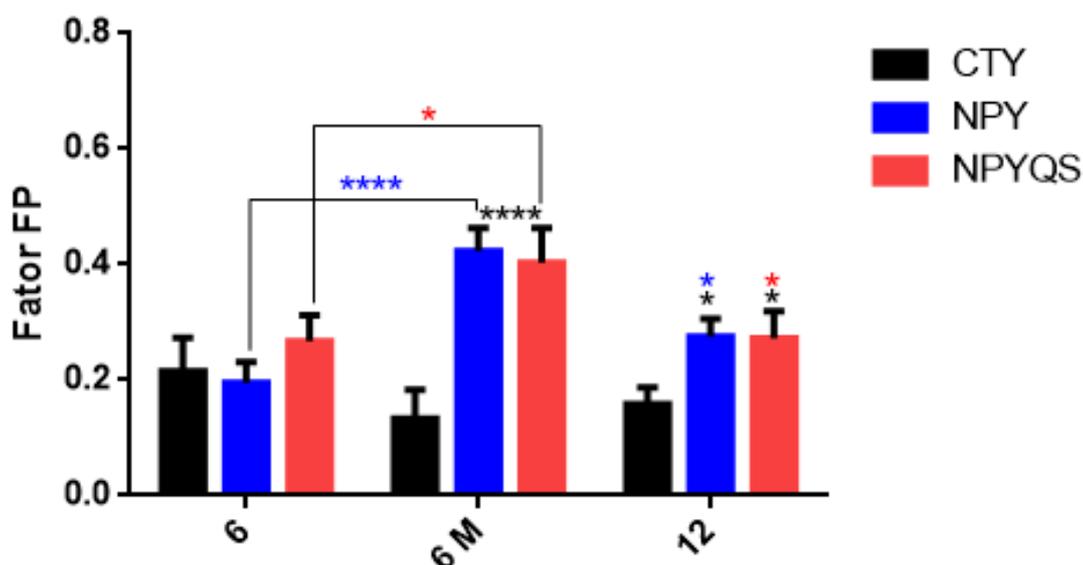


Figura 28. Fator de direcionamento folicular em 6h, 6h com massagem e 12 horas de permeação passiva a partir das NPY-QS, NPY e do CTY (média \pm DP, n = 6).

Os dados apresentados nas Figuras 25, 26, 27 e 28 mostram que todas as formulações mantiveram a dutasterida nas camadas superficiais da pele. Como foi observado em outros estudos com células Franz modificadas, nos quais a DUTA nanoencapsulada não foi capaz de atravessar a barreira cutânea, assim como a DUTA incorporada nos nanocarreadores estudados (DE BRUM et al., 2015; MADHESWARAN et al., 2017; NOOR et al., 2017).

Um fator bastante relevante no direcionamento para os folículos é o tamanho das nanopartículas. Trabalhos recentes mostram que partículas entre 400 a 700nm conseguem penetrar profundamente nos folículos pilosos e as partículas entre 200 e 300nm, por sua vez, tendem a se acumular na região folicular das glândulas sebáceas (PATZELT et al., 2011). De acordo com estudos prévios, nanopartículas de quitosana contendo minoxidil sulfato com diâmetro aproximado de 200nm aumentaram duas vezes mais a

concentração do fármaco no folículo piloso em comparação com a solução etanólica controle após 6h de experimento (MATOS et al., 2015). No presente estudo, ensaios de permeação foram feitos, onde observou-se que as nanopartículas com e sem revestimento de quitosana, com diâmetro hidrodinâmico próximo à 200 nm, tiveram um acúmulo significativo nos folículos pilosos.

O estresse mecânico aplicado através da massagem, abrasão e depilação da pele, podem ocasionar um aumento na penetração de nanopartículas, devido ao fato de provocar uma perturbação da barreira do estrato córneo. De modo semelhante, doenças cutâneas também são responsáveis por ditar um perfil alterado na penetração das partículas (ZHANG; MONTEIRO-RIVIERE, 2008). Efetivamente, micropartículas com diâmetro hidrodinâmico de 750nm penetraram melhor nos folículos pilosos que partículas maiores, quando a massagem foi aplicada (TOLL et al., 2004). De fato, amostras de nanopartículas de *quantum dots* que receberam estimulação mecânica, quando comparadas com as amostras sem estímulo demonstraram o dobro da intensidade de fluorescência na pele (GRATIERI et al., 2010).

Além disso, estudos existentes mostram a profundidade que as partículas conseguem chegar no folículo piloso, e aquelas que sofreram a estimulação alcançaram uma profundidade bem maior que as partículas ausentes de estímulo (TRAUER et al., 2014). Em concordância com estudos anteriores, duas formulações foram comparadas, nanopartículas contendo corante e corante não particulado, as quais foram estimuladas através da massagem, e constataram que a formulação particulada penetrou mais profundamente nos folículos que a não particulada (LADEMANN et al., 2007). Esse perfil de penetração através do estímulo mecânico também foi comprovado neste estudo pelas permeações realizadas, em que os resultados obtidos estão em consonância com estudos prévios, a massagem manual aumentou a penetração folicular em duas vezes comparada à permeação passiva.

Outro fator importante na permeação, bastante controverso, é a carga da nanopartícula. Devido ao fato da pele possuir carga negativa no pH fisiológico em condições normais, espera-se que as partículas catiônicas permeiem mais e que tenham uma retenção e penetração maior que as carregadas negativamente ou as anfifílicas (ABDEL-MOTTALEB et al., 2012). Por exemplo, uma comparação de permeação entre carreadores lipídicos nanoestruturados contendo dutasterida com e sem cobertura de quitosana foi feita, obtiveram uma retenção do fármaco maior das NPs sem cobertura (NOOR et al., 2017). Em discrepância com os resultados anteriores, carreadores lipídicos nanoestruturados contendo clobetasol propionato com cobertura de quitosana mostrou uma retenção maior na epiderme que os carreadores sem revestimento (SILVA et al., 2016). A natureza anfotérica da pele queratinizada pode explicar a tendência da atração das partículas de diferentes cargas pela pele. Nos modelos experimentais para dermatite, ambas partículas com carga exibiram um perfil de retenção maior que as NPs sem carga (ABDEL-MOTTALEB et al., 2012). Nesse estudo, também não se obteve um resultado conclusivo a respeito da carga das nanopartículas, pois não houve diferença significativa no direcionamento folicular na permeação de ambas partículas NPY e NPYQS.

6. Conclusão

As nanopartículas contendo dutasterida com e sem revestimento de quitosana desenvolvidas apresentaram estabilidade durante o período avaliado, não mostraram diferenças significativas nos parâmetros avaliados. No entanto, a estratégia de revestimento da nanopartícula com quitosana não ofereceu vantagem tecnológica no direcionamento da dutasterida para o folículo piloso, uma vez que o direcionamento foi semelhante para as nanopartículas em todas as permeações realizadas. A veiculação da DUTA pelas nanopartículas desenvolvidas com aplicação da massagem manual potencializou o direcionamento para o folículo piloso em duas vezes quando comparadas à permeação passiva. Logo, as nanopartículas promoveram o direcionamento e prolongaram o tempo de liberação do fármaco nos folículos

pilosos podendo estas, serem consideradas como possíveis avanços tecnológicos para o direcionamento intrafolicular.

7. Referências bibliográficas

ABDEL-MOTTALEB, M. M. A.; MOULARI, B.; BEDUNEAU, A.; PELLEQUER, Y.; LAMPRECHT, A. Surface-Charge-Dependent Nanoparticles Accumulation in Inflamed Skin. **Journal of pharmaceutical sciences.**, v. 101, n. 11, p. 4231–9, 2012.

AFIUNE, L. A. de F. **SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DE COMPLEXOS NANOESTRUTURADOS PARA APLICAÇÃO TÓPICA.** 2019. Universidade de Brasília -UnB, 2019.

AHMED, T. A.; ALJAEID, B. M. Preparation, characterization, and potential application of chitosan, chitosan derivatives, and chitosan metal nanoparticles in pharmaceutical drug delivery. **Drug Design, Development and Therapy**, v. 10, p. 483—507, 2016.

AHMED, Y. A.; ALI, S.; GHALLAB, A. HAIR HISTOLOGY AS A TOOL FOR FORENSIC IDENTIFICATION OF SOME DOMESTIC ANIMAL SPECIES. **EXCLI journal.**, v. 17, p. 663–670, 2018.

ALI, A. K.; HERAN, B. S.; ETMINAN, M. Persistent Sexual Dysfunction and Suicidal Ideation in Young Men Treated with Low-Dose Finasteride : A Pharmacovigilance Study. **Pharmacotherapy.**, v. 35, n. 7, p. 687–95, 2015.

ANDRIOLE, G. L.; KIRBY, R. Safety and tolerability of the dual 5 alpha-reductase inhibitor dutasteride in the treatment of benign prostatic hyperplasia. **European Urology**, v. 44, n. 1, p. 82–88, 2003.

ANVISA. **Resolução - RE nº 899, de 29 de maio de 2003.** [s.l: s.n.]

BANIK, B. L.; FATTAHI, P.; BROWN, J. L. Polymeric nanoparticles : the future of nanomedicine. **Nanomedicine and Nanobiotechnology**, v. 8, n. 2, p. 271–299, 2016.

BENDER, E. A.; ADORNE, M. D.; COLOMÉ, L. M.; ABDALLA, D. S. P.; GUTERRES, S. S.; POHLMANN, A. R. Hemocompatibility of poly(E-caprolactone) lipid-core nanocapsules stabilized with polysorbate 80-lecithin and uncoated or coated with chitosan. **International Journal of**

Pharmaceutics, v. 426, n. 1–2, p. 271–279, 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ijpharm.2012.01.051>>.

BENSON, H. Transdermal drug delivery: penetration enhancement techniques. **Current drug delivery.**, v. 2, n. 1, p. 23–33, 2005.

CALVO, P.; REMUNÁN-LÓPEZ, C.; VILA-JATO, J. .; ALONSO, M. J. Development of positively charged colloidal drug carriers: chitosan-coated polyester nanocapsules and submicron-emulsions. **Colloid and Polymer Science**, v. 275, n. 1, p. 46–53, 1997.

CALVO, P.; VILA-JATO, J. L.; ALONSO, M. J. Comparative in Vitro Evaluation of Several Colloidal Systems , Nanoparticles , Nanocapsules , and Nanoemulsions , as Ocular Drug Carriers. **Journal of pharmaceutical sciences.**, v. 85, n. 5, p. 530–6, 1996.

CASERINI, M.; RADICIONI, M.; LEURATTI, C.; TERRAGNI, E.; IORIZZO, M.; PALMIERI, R. Effects of a novel finasteride 0.25% topical solution on scalp and serum dihydrotestosterone in healthy men with androgenetic alopecia. **International Journal of clinical pharmacology and therapeutics**, v. 54, n. 1, p. 19–27, 2016.

CASH, T. F. Losing Hair, Losing Points?: The Effects of Male Pattern Baldness on Social Impression Formation¹. **Journal of Applied Social Psychology**, v. 20, n. 2, p. 154–167, 1990.

CASH, T. F. The Psychology of Hair Loss and Its Implications for Patient Care. **Clinics in dermatology.**, v. 19, n. 2, p. 161–6, 2001.

CASH, T.; PRICE, V.; SAVIN, R. Psychological effects of androgenetic alopecia on women: comparisons with balding men and with female control subjects. **Journal of the American Academy of Dermatology.**, v. 29, n. 4, p. 568–75, 1993.

CHI, W.; WU, E.; MORGAN, B. A. Dermal papilla cell number specifies hair size , shape and cycling and its reduction causes follicular decline. **Development**, v. 140, n. 8, p. 1676–1683, 2013.

CHIOU, S.; WU, W.; HUANG, Y.; CHUNG, T. Effects of the characteristics of chitosan on controlling drug release of chitosan coated PLLA microspheres. **Journal of microencapsulation**, v. 18, n. 5, p. 613–

625, 2001.

CHOI, G. S.; KIM, J. H.; OH, S. Y.; PARK, J. M.; HONG, J. S.; LEE, Y. S.; LEE, W. S. Safety and tolerability of the dual 5-alpha reductase inhibitor dutasteride in the treatment of androgenetic alopecia. **Annals of Dermatology**, v. 28, n. 4, p. 444–450, 2016.

CHU, D. H. Development and Structure of Skin. In: **Fitzpatrick's Dermatology in General Medicine**. [s.l: s.n.]p. 93–131.

CLARK, R. V.; HERMANN, D. J.; CUNNINGHAM, G. R.; WILSON, T. H.; MORRILL, B. B.; HOBBS, S. Marked Suppression of Dihydrotestosterone in Men with Benign Prostatic Hyperplasia by Dutasteride , a Dual 5 α -Reductase Inhibitor. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 89, n. 5, p. 2179–2184, 2004.

COTSARELIS, G.; SUN, T.; LAVKER, R. M. Label-Retaining Cells Reside in the Bulge Area of Pilosebaceous Unit : Implications for Follicular Stem Cells , Hair Cycle , and Skin Carcinogenesis. **Cell**, v. 61, p. 1329–1337, 1990.

COURTOIS; LOUSSOUARN; HOURSEAU; GROLLIER. Hair cycle and alopecia. **Skin pharmacology: the official journal of the Skin Pharmacology Society.**, v. 7, n. 1–2, p. 84–9, 1994.

DE BRUM, T. L.; FIEL, L. A.; CONTRI, R. V; GUTERRES, S. S.; POHLMANN, A. R. Polymeric Nanocapsules and Lipid-Core Nanocapsules Have Diverse Skin Penetration. **Journal of Nanoscience and Nanotechnology**, v. 15, n. 1, p. 773–780, 2015.

DEBELICA, A.; THIES, M. **Atlas and key to the hair of terres-trial Texas mammals**. [s.l: s.n.]

DRAKE, L.; HORDINSKY, M.; FIEDLER, V.; SWINEHART, J.; UNGER, W. P.; COTTERILL, P. C.; THIBOUTOT, D. M.; LOWE, N.; JACOBSON, C.; WHITING, D.; STIEGLITZ, S.; KRAUS, S. J.; GRIFFIN, E. I.; WEISS, D.; CARRINGTON, P.; GENCHEFF, C.; COLE, G. W.; PARISER, D. M.; EPSTEIN, E. S.; TANAKA, W.; DALLOB, A.; VANDORMAEL, K.; GEISSLER, L.; WALDSTREICHER, J. The effects of finasteride on scalp skin and se rum andorgen levels in men with androgenetic alopecia. **Journal of**

the American Academy of Dermatology., v. 41, n. 4, p. 550–4, 1999.

ELLIS, J. A.; SINCLAIR, R.; HARRAP, S. B. Androgenetic alopecia : pathogenesis and potential for therapy. **Expert reviews in molecular medicine.**, v. 4, n. 22, p. 1–11, 2002.

ENSHELL-SEIJFFERS, D.; LINDON, C.; MORGAN, B. A. The serine protease Corin is a novel modifier of the agouti pathway. **Development.**, v. 135, n. 2, p. 217–225, 2008.

EUN, H. C.; KWON, O. S.; YEON, J. H.; SHIN, H. S.; KIM, B. Y.; RO, B. I.; CHO, H. K.; SIM, W. Y.; LEW, B. L.; LEE, W.; PARK, H. Y.; HONG, S. P.; JI, J. H. Efficacy, safety, and tolerability of dutasteride 0.5 mg once daily in male patients with male pattern hair loss: A randomized, double-blind, placebo-controlled, phase III study. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 63, n. 2, p. 252–258, 2010. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jaad.2009.09.018>>.

FANG, C.; LI, Y.; FANG, J. Delivery and targeting of nanoparticles into hair follicles. **Therapeutic Delivery**, v. 5, n. 9, p. 991–1006, 2014.

FONTANA, M. C.; CORADINI, K.; GUTERRES, S. S.; POHLMANN, A. R.; BECK, R. C. R. Nanoencapsulation as a Way to Control the Release and to Increase the Photostability of Clobetasol Propionate: Influence of the Nanostructured System. **Journal of Biomedical Nanotechnology**, v. 5, p. 254–263, 2009.

GAN, D. C. C.; SINCLAIR, R. D. Prevalence of Male and Female Pattern Hair Loss in Maryborough. **The journal of investigative dermatology. Symposium proceedings**, v. 10, n. 3, p. 184–189, 2005. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1111/j.1087-0024.2005.10102.x>>.

GELPERINA, S.; KISICH, K.; ISEMAN, M. D.; HEIFETS, L. The Potential Advantages of Nanoparticle Drug Delivery Systems in Chemotherapy of Tuberculosis. **American journal of respiratory and critical care medicine.**, v. 172, n. 12, p. 1487–1490, 2005.

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, p. 1490–1498, 2008.

GRATIERI, T.; SCHAEFER, U. F.; JING, L.; GAO, M.; KOSTKA, K. H.; LOPEZ, R. F. V; SCHNEIDER, M. Penetration of Quantum Dot Particles Through Human Skin. **Journal of Biomedical Nanotechnology**, v. 6, p. 586–595, 2010.

GUBELIN HARCHA, W.; BARBOZA MARTÍNEZ, J.; TSAI, T. F.; KATSUOKA, K.; KAWASHIMA, M.; TSUBOI, R.; BARNES, A.; FERRON-BRADY, G.; CHETTY, D. A randomized, active- and placebo-controlled study of the efficacy and safety of different doses of dutasteride versus placebo and finasteride in the treatment of male subjects with androgenetic alopecia. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 70, n. 3, p. 489–498, 2014.

HAMILTON, J. B. PATTERNED LOSS OF HAIR IN MAN: TYPES AND INCIDENCE. **Annals of The New York Academy of Sciences**, 1951.

HOPPE-SEYLER, F. Chitin and chitosan. **European Journal of Inorganic Chemistry**, v. 27, n. 3, p. 3329–3331, 1894.

HUNT, N.; MCHALE, S. The psychological impact of alopecia. **BMJ : British medical journal / British Medical Association.**, v. 331, n. 7522, p. 951–953, 2005.

ICH. ICH HARMONISED TRIPARTITE GUIDELINE VALIDATION OF ANALYTICAL PROCEDURES: TEXT AND METHODOLOGY Q2(R1) Guideline on Validation of Analytical Procedures: Methodology developed to complement the Parent Guideline. 2005.

JAKASA, I.; JONGH, C. de; VERBERK, M.; BOS, J.; KEZIĆ, S. Percutaneous penetration of sodium lauryl sulphate is increased in uninvolved skin of patients with atopic dermatitis compared with control. **The British Journal of Dermatology**, v. 155, n. 1, p. 104–9, 2006.

JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. **Histologia Básica**. [s.l: s.n.]

KEAN, T.; THANOU, M. Chitin and Chitosan : Sources , Production and Medical Applications. In: **Desk reference of natural polymers, their sources, chemistry and applications**. [s.l: s.n.]p. 292–318.

KELLY, Y.; BLANCO, A.; TOSTI, A. Androgenetic Alopecia : An Update of Treatment Options. **Drugs**, v. 76, n. 14, p. 1349–1364, 2016.

KIM, M. Influence of hydrophilic additives on the supersaturation and bioavailability of dutasteride-loaded hydroxypropyl- β -cyclodextrin nanostructures. **International Journal of Nanomedicine**, v. 8, p. 2029–2039, 2013a.

KIM, M. Soluplus-coated colloidal silica nanomatrix system for enhanced supersaturation and oral absorption of poorly water-soluble drugs. **Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology**, v. 41, n. 6, p. 363–7, 2013b.

KIM, Y.; GIHM, S.; PARK, C.; LEE, K.; KIM, T.; KWON, I.; CHUNG, H.; JEONG, S. Structural characteristics of size-controlled self-aggregates of deoxycholic acid-modified chitosan and their application as a DNA delivery carrier. **Bioconjugate chemistry.**, v. 12, n. 6, p. 932–8, 2001.

KRISHNA, R. N.; GAYATHRI, R.; PRIYA, V. Nanoparticles and Their Applications – A Review. **Journal of Pharmaceutical Sciences and Research**, v. 9, n. 1, p. 24–27, 2017.

LADEMANN, J.; KNORR, F.; RICHTER, H.; BLUME-PEYTAVI, U.; VOGT, A.; ANTONIOU, C.; STERRY, W.; PATZELT, A. Hair Follicles – An Efficient Storage and Penetration Pathway for Topically Applied Substances 1. **Skin pharmacology and physiology.**, v. 21, n. 3, p. 150–155, 2008.

LADEMANN, J.; PATZELT, A.; RICHTER, H.; ANTONIOU, C.; STERRY, W.; KNORR, F. Determination of the cuticula thickness of human and porcine hairs and their potential influence on the penetration of nanoparticles into the hair follicles. **Journal of Biomedical Optics**, v. 14, n. 2, 2009.

LADEMANN, J.; RICHTER, H.; TEICHMANN, A.; OTBERG, N.; BLUME-PEYTAVI, U.; LUENGO, J.; WEIS, B.; SCHAEFER, U. F.; LEHR, C.; WEPF, R.; STERRY, W. Nanoparticles – An efficient carrier for drug delivery into the hair follicles. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 66, p. 159–164, 2007.

LEITE-SILVA, V. R.; ALMEIDA, M. M. de; FRADIN, A.; GRICE, J. E.; ROBERTS, M. S. Delivery of drugs applied topically to the skin. **Expert Review of Dermatology**, v. 7, n. 4, p. 383–397, 2012.

LOWERY, J.; DATTA, N.; RUTLEDGE, G. Effect of fiber diameter, pore size and seeding method on growth of human dermal fibroblasts in electrospun poly(epsilon-caprolactone) fibrous mats. **Biomaterials.**, v. 31, n. 3, p. 491–504, 2010.

LYNCH, S. S. **Tolerância e resistência a medicamentos**. MSD, 2017. Disponível em: <<https://www.msmanuals.com/pt-br/casa/medicamentos/fatores-que-afetam-a-resposta-medicamentosa/tolerancia-e-resistencia-a-medicamentos>>. Acesso em: 11 de ago. de 2019.

MADHESWARAN, T.; BASKARAN, R.; SUNDARAMOORTHY, P.; YOO, B. K. Enhanced skin permeation of 5 α -reductase inhibitors entrapped into surface-modified liquid crystalline nanoparticles. **Archives of pharmacal research**, v. 38, n. 4, p. 534–542, 2015.

MADHESWARAN, T.; BASKARAN, R.; YOO, B. K.; KESHARWANI, P. In vitro and in vivo skin distribution of 5 α -reductase inhibitors loaded into liquid crystalline nanoparticles. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 106, n. 11, p. 3385–3394, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.xphs.2017.06.016>>.

MATOS, B. N.; REIS, T. A.; GRATIERI, T.; GELFUSO, G. M. Chitosan nanoparticles for targeting and sustaining minoxidil sulphate delivery to hair follicles. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 75, p. 225–229, 2015.

NAIR, L. S.; LAURENCIN, C. T. Biodegradable polymers as biomaterials. **Progress in Polymer Science**, v. 32, p. 762–798, 2007.

NG, K. W.; LAU, W. M. Skin deep: The basics of human skin structure and drug. In: **Percutaneous Penetration Enhancers Chemical Methods in Penetration Enhancement**. [s.l: s.n.]p. 3–11.

NICKEL, J. C.; FRADET, Y.; BOAKE, R. C.; POMMERVILLE, P. J.; PERREAULT, J.; AFRIDI, S. K.; ELHILALI, M. M. Efficacy and safety of finasteride therapy for benign prostatic hyperplasia: results of a 2-year randomized controlled trial (the PROSPECT Study). **CMAJ: Canadian Medical Association journal**, v. 155, n. 9, p. 1251–1259, 1996.

NISHIMURA, E. K.; JORDAN, S. A.; OSHIMA, H.; YOSHIDA, H.; OSAWA, M.; MORIYAMA, M.; JACKSON, I. J.; BARRANDON, Y.; MIYACHI, Y.; NISHIKAWA, S.-I. Dominant role of the niche in melanocyte stem-cell fate determination. **Nature**, v. 416, n. 6883, p. 854–60, 2002.

NOOR, N. M.; SHEIKH, K.; SOMAVARAPU, S.; TAYLOR, K. M. G. Preparation and Characterization of Dutasteride-loaded Nanostructured Lipid Carriers coated with Stearic Acid-Chitosan Oligomer for Topical Delivery. **European journal of pharmaceutics and biopharmaceutics: official journal of Arbeitsgemeinschaft für Pharmazeutische Verfahrenstechnik e.V.**, n. 17, p. 30457–5, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ejpb.2017.04.012>>.

NORWOOD, O'TAR, T., M. Incidence of Female Androgenetic Alopecia (Female Pattern Alopecia): January 2001 - Volume 27 - Issue 1 - p 53–54. **Dermatologic Surgery**, v. 27, n. 1, p. 53–54, 2001.

OLSEN, E. A.; HORDINSKY, M.; WHITING, D.; STOUGH, D.; HOBBS, S.; ELLIS, M. L.; WILSON, T.; RITTMASER, R. S. The importance of dual 5 α -reductase inhibition in the treatment of male pattern hair loss: Results of a randomized placebo-controlled study of dutasteride versus finasteride. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 55, n. 6, p. 1014–1023, 2006.

PAIK, J.-H.; YOON, J.-B.; SIM, W.-Y.; KIM, B.-S.; KIM, N.-I. The prevalence and types of androgenetic alopecia in Korean men and women. **The British Journal of Dermatology**, v. 145, n. 1, p. 95–99, 2001.

PANTELEYEV, A. A. Functional Anatomy of the Hair Follicle: the Secondary Hair Germ. **Experimental dermatology**, v. 27, n. 7, p. 701–720, 2018.

PARK, S.; CHOO, G.; HWANG, S.; KIM, M. Quality by design: screening of critical variables and formulation optimization of Eudragit E nanoparticles containing dutasteride. **Archives of pharmacal research**, v. 36, n. 5, p. 593–601, 2013.

PATZELT, A.; LADEMANN, J. Drug delivery to hair follicles. **Expert opinion on drug delivery**, v. 10, n. 6, p. 787–97, 2013.

PATZELT, A.; RICHTER, H.; KNORR, F.; SCHÄFER, U.; LEHR, C.; DÄHNE, L. Selective follicular targeting by modification of the particle sizes. **Journal of Controlled Release**, v. 150, n. 1, p. 45–48, 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jconrel.2010.11.015>>.

PAUS, R.; COTSARELIS, G. H AIR F OLLICLES. **The New England journal of medicine.**, v. 341, n. 7, p. 491–497, 1999.

PEREIRA, M. N.; USHIROBIRA, C. Y.; CUNHA-FILHO, M. S. S.; GELFUSO, G. M.; GRATIERI, T. Nanotechnology advances for hair loss. **Therapeutic Delivery**, v. 9, n. 8, p. 593–603, 2018.

PETRILLI, R.; LOPEZ, R. F. V. Physical methods for topical skin drug delivery: concepts and applications. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 54, p. 1–19, 2018.

PRAÇA, F. S. G.; MEDINA, W. S. G.; ELOY, J. O.; PETRILLI, R.; CAMPOS, P. M.; ASCENSO, A.; BENTLEY, M. V. L. B. Evaluation of critical parameters for in vitro skin permeation and penetration studies using animal skin models. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 111, p. 121–132, 2018. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ejps.2017.09.034>>.

PRICE, V. H. TREATMENT OF HAIR LOSS. **The New England Journal of Medicine**, v. 341, n. 13, p. 964–973, 1999.

PROKSCH, E.; BRANDNER, J. M.; JENSEN, J. The skin: an indispensable barrier. **Experimental dermatology.**, v. 17, n. 12, p. 1063–1072, 2008.

RABBANI, P.; TAKEO, M.; CHOU, W.; MYUNG, P.; BOSENBERG, M.; CHIN, L.; TAKETO, M. M.; ITO, M. Coordinated Activation of Wnt in Epithelial and Melanocyte Stem Cells Initiates Pigmented Hair Regeneration. **Cell**, v. 145, n. 6, p. 941–955, 2011.

RATHNAYAKE, D.; SINCLAIR, R. Male Androgenetic Alopecia. **Expert opinion on pharmacotherapy.**, v. 11, n. 8, p. 1295–1304, 2010.

RIBANI, M.; BOTTOLI, C. B. G.; COLLINS, C. H.; JARDIM, I. C. S. F.; MELO, L. F. C. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Química Nova**, v. 27, n. 5, p. 771–780, out. 2004.

RIDOLFI, D.; MARCATO, P.; JUSTO, G.; CORDI, L.; MACHADO, D.; DURÁN, N. Chitosan-solid lipid nanoparticles as carriers for topical delivery of tretinoin. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 93, p. 36–40, 2012.

ROBERTS, M.; CROSS, S.; PELLETT, M. **Dermatological and Transdermal Formulations**. NY, USA: Marcel Dekker Inc., 2002.

ROEHRBORN, C. G.; BOYLE, P.; NICKEL, J. C.; HOEFNER, K.; ANDRIOLE, G. Efficacy and safety of a dual inhibitor of 5-alpha-reductase types 1 and 2 (dutasteride) in men with benign prostatic hyperplasia. **Adult Urology**, v. 60, n. 3, p. 434–441, 2002.

SAARTOK, T.; DAHLBERG, E.; GUSTAFSSON, J.-Å. Relative Binding Affinity of Anabolic-Androgenic Steroids: Comparison of the Binding to the Androgen Receptors in Skeletal Muscle and in Prostate, as well as to Sex Hormone-Binding Globulin. **Endocrinology**, v. 114, n. 6, p. 2100–2106, 1984.

SAWAYA, M. E.; PRICE, V. H. Different Levels of 5 α -Reductase Type I and II, Aromatase, and Androgen Receptor in Hair Follicles of Women and Men with Androgenetic Alopecia. **The Journal of investigative dermatology**., v. 109, n. 3, p. 296–300, 1997.

SCHAEFER, H.; LADEMANN, J. The role of follicular penetration. A differential view. **Skin pharmacology and applied skin physiology**., v. 14, n. 1, p. 23–7, 2001.

SCHAFFAZICK, S. R.; GUTERRES, S. S.; FREITAS, L. D. L.; POHLMANN, A. R. CARACTERIZAÇÃO E ESTABILIDADE FÍSICO-QUÍMICA DE SISTEMAS POLIMÉRICOS NANOPARTICULADOS PARA ADMINISTRAÇÃO DE FÁRMACOS. **Quimica Nova**, v. 26, n. 5, p. 726–737, 2003.

SCHEUPLEIN, R. J.; BLANK, I. H. Permeability of the Skin. **Physiological Reviews**, v. 51, n. 4, 1971.

SHAROV, A.; TOBIN, D. J.; SHAROVA, T. Y.; ATOYAN, R.; BOTCHKAREV, V. A. Changes in Different Melanocyte Populations During Hair Follicle Involution (Catagen). **The Journal of investigative dermatology**., v. 125, n. 6, p. 1259–1267, 2005. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1111/j.0022-202X.2005.23959.x>>.

SILVA, L. A. D.; ANDRADE, L. M.; SÁ, F. A. P. de; MARRETO, R. N.; LIMA, E. M.; GRATIERI, T.; TAVEIRA, S. F. Clobetasol-loaded nanostructured lipid carriers for epidermal targeting. **Journal of Pharmacy And Pharmacology**, v. 68, n. 6, p. 742–750, 2016.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE DERMATOLOGIA. Perfil nosológico das consultas dermatológicas no Brasil. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 81, n. 6, p. 549–558, 2006.

TAKASHIMA M, IJU K, S. M. Alopecia androgenica: its incidence in Japanese and associated conditions. p. 287–293, 1981.

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. **The Journal of investigative dermatology.**, v. 125, n. 2, p. 264–269, 2005.

TOLL, R.; JACOBI, U.; RICHTER, H.; LADEMANN, J.; SCHAEFER, H.; BLUME-PEYTAVI, U. Penetration Profile of Microspheres in Follicular Targeting of Terminal Hair Follicles. **The Journal of investigative dermatology.**, v. 123, n. 1, p. 168–176, 2004.

TRAUER, S.; RICHTER, H.; KUNTSCHKE, J.; BÜTTEMEYER, R.; LIEBSCH, M.; LINSCHKEID, M.; FAHR, A.; SCHÄFER-KORTING, M.; LADEMANN, J.; PATZELT, A. Influence of massage and occlusion on the ex vivo skin penetration of rigid liposomes and invasomes. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 86, n. 2, p. 301–306, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ejpb.2013.11.004>>.

URYSIAK-CZUBATKA, I.; KMIEĆ, M. L.; BRONIARCZYK-DYŁA, G. Assessment of the usefulness of dihydrotestosterone in the diagnostics of patients with androgenetic alopecia. **Postępy Dermatologii i Alergologii**, v. 31, n. 4, p. 207–216, 2014.

UYGUR, M. C.; ARIK, A. I.; ALTUG, U.; EROL, D. Effects of the 5 α -reductase inhibitor finasteride on serum levels of gonadal, adrenal, and hypophyseal hormones and its clinical significance: A prospective clinical study. **Steroids.**, v. 63, n. 4, p. 208–13., 1998.

VAROTHAI, S.; BERGFELD, W. F. Androgenetic Alopecia: An

Evidence-Based Treatment Update. **American journal of clinical dermatology**, v. 15, n. 3, p. 217–230, 2014.

WANG, T. L.; ZHOU, C.; SHEN, Y. W.; WANG, X. Y.; DING, X. L.; TIAN, S.; LIU, Y.; PENG, G. H.; XUE, S. Q.; ZHOU, J. E.; WANG, R. L.; MENG, X. M.; PEI, G. D.; BAI, Y. H.; LIU, Q.; LI, H.; ZHANG, J. Z. Prevalence of androgenetic alopecia in China : a community-based study in six cities. **The British Journal of Dermatology**, v. 162, n. 4, p. 843–7, 2010.

WESSELLS, H.; ROY, J.; BANNOW, J.; GRAYHACK, J.; MATSUMOTO, A. M.; TENOVER, L.; HERLIHY, R.; FITCH, W.; LABASKY, R.; AUERBACH, S.; PARRA, R.; RAJFER, J.; CULBERTSON, J.; LEE, M.; BACH, M. A.; WALDSTREICHER, J. INCIDENCE AND SEVERITY OF SEXUAL ADVERSE EXPERIENCES IN FINASTERIDE AND PLACEBO-TREATED MEN WITH BENIGN PROSTATIC HYPERPLASIA. **Urology**, v. 61, n. 3, p. 579–84, 2003.

WHITING, D. Advances in the treatment of male androgenetic alopecia: a brief review of finasteride studies. **European journal of dermatology : EJD**, v. 11, n. 4, p. 332–4., 2001.

WILLIAMSON, D.; GONZALEZ, M.; FINLAY, A. The effect of hair loss on quality of life. **Journal of The European Academy of Dermatology and Venereology**, v. 15, n. 2, p. 137–139, 2001.

WOODRUFF, M. A.; HUTMACHER, D. W. The return of a forgotten polymer — Polycaprolactone in the 21st century. **Progress in Polymer Science**, v. 35, p. 1217–1256, 2010.

YANG, Y. M.; W. HU; WANG, X. D.; GU, X. S. The controlling biodegradation of chitosan fibers by N-acetylation in vitro and in vivo. **Journal of materials science. Materials in medicine**, v. 18, n. 11, p. 2117–2121, 2007.

ZHANG, L. W.; MONTEIRO-RIVIERE, N. A. Assessment of Quantum Dot Penetration into Intact , Tape-Stripped , Abraded and Flexed Rat Skin. **Skin Pharmacology and Physiology**, v. 21, n. 3, p. 166–180, 2008.

ZHANG, Z.; TSAI, P.-C.; RAMEZANLI, T.; MICHNIAK-KOHN, B. B. NIH Public Access. **Wiley interdisciplinary reviews. Nanomedicine and**

nanobiotechnology., v. 5, n. 3, p. 205–218, 2013.