



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PÓS-GRADUAÇÃO EM NANOCIÊNCIA E NANOBIOTECNOLOGIA

TESE DE DOUTORADO

**SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DE COMPLEXOS NANOESTRUTURADOS
PARA APLICAÇÃO TÓPICA**

LUANA ALVES DE FREITAS AFIUNE

BRASÍLIA – DF

2019



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PÓS-GRADUAÇÃO EM NANOCIÊNCIA E NANOBIOTECNOLOGIA

LUANA ALVES DE FREITAS AFIUNE

**SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DE COMPLEXOS NANOESTRUTURADOS
PARA APLICAÇÃO TÓPICA**

Tese de Doutorado submetida ao Programa de Pós-Graduação em Nanociência e Nanobiotecnologia da Universidade de Brasília como parte integrante dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Nanociência e Nanobiotecnologia.

Orientadora
Professora Maria Aparecida Godoy Soler
Coorientadora
Profa. Dra. Taís Gratieri

BRASÍLIA – DF

2019



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PÓS-GRADUAÇÃO EM NANOCIÊNCIA E NANOBIOTECNOLOGIA

LUANA ALVES DE FREITAS AFIUNE

SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DE COMPLEXOS NANOESTRUTURADOS
PARA APLICAÇÃO TÓPICA

BANCA EXAMINADORA

Professora Maria Aparecida Godoy Soler
(Orientadora – Instituto de Física/UnB)

Doutor Paulo Eduardo Narcizo de Souza
(Instituto de Física / UnB)

Doutor Samuel Vidal Mussi
**(Coordenador do NILE - Nanotechnology Innovation Laboratory Enterprise,
Aché Laboratórios Farmacêuticos)**

Professora Sonia Maria de Freitas
(Instituto de Ciências Biológicas / UnB)

Professor Sebastião William da Silva
(Instituto de Física / UnB) - Suplente

BRASÍLIA – DF

2019

Aos meus pais, **Ester** e **Saulo**, aos meus irmãos **Kalley** e **Saulo Júnior** e ao meu esposo **Elton Jorge**, por todo o amor incondicional e por nunca pouparem esforços para que eu tivesse a melhor educação, além de todo apoio e incentivo em todas as minhas decisões.

Amo muito vocês!

AGRADECIMENTO

À Deus, pela vida. Por me conceder sabedoria, paciência e acima de tudo forças para permanecer firme nos meus ideais.

Aos meus pais Ester e Saulo, que com muito amor, simplicidade, sacrifícios e determinação, idealizaram uma vida melhor para os filhos fundamentada na educação. Meus pais não tiveram a oportunidade de estudar e mesmo assim, investiram tempo, suor, lágrimas e a saúde para que eu e meus irmãos pudéssemos ter a oportunidade de uma vida melhor. Tenho certeza que os resultados de toda dedicação e amor incondicional deles para a nossa formação como seres humanos e profissionais de sucesso, já superou todas as expectativas que eles puderam sonhar para o nosso futuro e hoje quero dedicar mais essa vitória pessoal e profissional a eles, que foram os meus primeiros mestres na escola da vida.

À minha irmã Kalley e ao meu irmão Saulo Júnior, meus melhores amigos de infância, vocês são presentes de Deus na minha vida, muito grata, pelo amor incondicional e apoio em todos os meus projetos.

Ao meu cunhado Fernando meu coaching pessoal e de valor inestimável que juntamente com a minha irmã, sempre iluminaram a minha mente, coração e o meu caminho, usando sempre as palavras certas, que me ajudaram a amadurecer e aprender a contornar as pedras, espinhos e armadilhas que vivenciei durante toda essa minha jornada.

Ao meu esposo Jorge por todo amor, atenção e cuidado dedicados a mim nesses 12 anos de relacionamento e 10 anos de casamento. Com toda certeza esses foram os melhores anos da minha vida. Você é a testemunha ocular da minha vida, você multiplicou tudo de melhor que eu poderia sonhar. Muito grata, por acreditar nos meus sonhos e me incentivar a torná-los realidade. Te amo muito!

A toda minha família! Gratidão eterna, por serem minha base e o meu porto seguro em todos os momentos. Muito grata pelas orações.

Gratidão à minha professora e orientadora Maria Aparecida, por ter me aberto as portas do doutorado nessa universidade tão maravilhosa, pelo carinho com que me recebeu, a confiança depositada em mim e por ter me guiado na elaboração deste trabalho juntamente com a professora e coorientadora Taís Gratieri. Gratidão pelas discussões que abrilhantaram esse trabalho, por terem me permitido vivenciar, em seus grupos de pesquisa, experiências maravilhosas na companhia de pessoas extremamente capacitadas e disponíveis para transmitir conhecimentos que muito contribuíram para a minha formação acadêmica e científica.

Aos nanoworkers do meu coração, integrantes do grupo de pesquisa da Professora Maria Aparecida do Laboratório de Nanofilmes e Nano Dispositivos, pela amizade e conhecimentos compartilhados: Rafael, Jaqueline, Antônia, Deise Coelho, Larissa e Luísa. Em especial, ao Professor Elton Brito da UFMT de Sinop, meu amigo desde a Graduação, que me apresentou a Professora Maria Aparecida, proporcionando à minha vida toda essa felicidade e riquíssima experiência, pelas oportunidades que tive de conhecer pessoas tão especiais e competentes na Universidade de Brasília – UNB. Ao amigo Luís Miguel e às minhas amigas irmãs Deizilene, Débora e Camila Letti pelo apoio na realização de experimentos, uso de equipamentos, metodologias de análise e tratamento de dados e muitos momentos maravilhosos e especiais que compartilhamos... Às demais amigadas que conquistei durante esses anos de UnB, entre elas, a Lucélia e a Isis.

Ao professor Sebastião por toda disponibilidade e dedicação juntamente com o Hermano. Hermano, grata pela amizade e pelas medidas e o apoio na realização de experimentos no Laboratório “Cnano” do Instituto de Física da UnB, pela companhia extremamente agradável e inúmeras conversas descontraídas, acompanhadas de chás, cafés, almoço ou lanche da tarde.

A toda família LTMAC! Começando pelos professores do LTMAC pelo exemplo de competência e dedicação. Muito grata à Professora Tais Gratieri, ao professor Guilherme e ao professor Marcílio, pessoas admiráveis que mantém toda uma complexa infraestrutura, que proporciona aos discentes do laboratório formação acadêmica e científica, bem como condições para se desenvolverem. Sou muito grata por terem me permitido fazer parte desse grupo de pesquisa que ficará para sempre na minha história. Quero agradecer especialmente à Tamara, Breno, Thaiene, Ricardo, Ludmila, pela amizade, disponibilidade e por todos os treinamentos, procedimentos, metodologias, experimentos, experiências e conhecimentos compartilhados. Sou muito grata a todos os discentes que eu tive a oportunidade de conhecer e conviver diariamente no laboratório: Paula, Fernando, Lorena, Maíra Teixeira, Maíra Miranda, Maíra Nunes, Geisa, Seila, Devana, Felipe, Giselly, Wanessa, Bárbara. Ao Thiago e ao André pelo excelente trabalho que vêm desenvolvendo, muito grata pela disponibilidade e apoio.

À minha querida amiga-irmã Camila Yumi, companheira de laboratório, que com certeza levarei para vida. Agradeço a Deus por ter colocado você no meu caminho. Encontrei na sua amizade, a paz e todas as boas energias que eu precisava para restabelecer as minhas forças depois de um ano muito difícil. Você é sincera, parceira, determinada e busca assim como eu, ser melhor a cada dia, tirando de todas as circunstâncias, por mais adversas que sejam, só o que é positivo e contribua para o nosso crescimento pessoal, espiritual e profissional.

A todos do Laboratório de Nanociência e Nanobiotecnologia do Instituto de Biologia da UnB. Ao professor Ricardo Bentes Azevedo e professor João Paulo pelo apoio, juntamente com

a Karen e o Diogo que sempre com muita atenção e disposição deram o apoio necessário para a realização dos experimentos.

Ao Willi, a Ludmilla, a Mara, a Márcia, o Geraldo e o Odair que iniciaram as disciplinas da Pós comigo e nunca saíram do meu coração e nem foram esquecidos apesar da pouca convivência que tivemos. À Laíse pela amizade e pela disponibilidade de compartilhar seus conhecimentos comigo.

À Ingrid do Laboratório de Microscopia e Microanálise, pelo apoio na realização das imagens de Microscopia Eletrônica de Transmissão, do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília.

Ao professor Paulo Souza do Instituto de Física pela colaboração para a realização dos experimentos de ressonância ferromagnética, cujos resultados contribuíram para valorizar o trabalho. À Professora Carolina Lucci do Depto. de Ciências Fisiológicas do Instituto de Biologia – UnB que compartilhou as metodologias desenvolvidas para a quantificação das nanopartículas por meio de experimentos de ressonância ferromagnética.

Ao professor Coaquira, Fermin e Mohan Chandra do Instituto de Física pelo apoio para a realização de medidas de magnetização.

À Professora Maria Inês do Laboratório de Métodos de Extração e Separação (LAMES) da Universidade Federal de Goiás que prontamente se disponibilizou para a realizar as análises termogravimétricas.

Ao professor Aparecido Ribeiro de Souza e ao doutor Matheus Oliveira da Silva do Instituto de Química da UFG, pelo apoio no processo de funcionalização das nanopartículas.

A todos que diretamente ou indiretamente contribuíram para a realização desse trabalho, que contou com a participação do Instituto de Biologia, Programa de Pós-Graduação em Nanociência e Nanobiotecnologia, ao qual pertencço; Instituto de Física; Faculdade de Saúde - UnB e o Instituto de Química da Universidade Federal de Goiás - UFG.

À Universidade de Brasília por me proporcionar essa a realização deste trabalho e de um sonho de família.

Às fontes de fomento FAPDF e CNPQ pelos auxílios financeiros recebidos durante o desenvolvimento deste projeto.

À CAPES pela bolsa de doutorado.

Se enxerguei mais longe, foi porque me apoiei nos ombros de gigantes.

ISAAC NEWTON

*" Confie no Senhor de todo o seu coração e não se apoie em seu próprio entendimento;
reconheça o Senhor em todos os seus caminhos, e ele conduzirá teus passos."*

Provérbios, 3:5-6.

RESUMO

Neste trabalho foram desenvolvidas nanoformulações com os inibidores da 5 alfa redutase, finasterida (FIN) e dutasterida (DT), ancorados em nanopartículas de maguemita coloidais funcionalizadas com uma bicamada de ácido láurico (ION) visando a prevenção ou o tratamento da perda de cabelo, em particular a alopecia androgênica, pela via de administração tópica. Todos os componentes presentes nas nanoformulações foram escolhidos para atuarem em associação com os fármacos. O ferro (Fe) presente no núcleo das nanopartículas é um agente nutracêutico importante para a saúde do fio de cabelo e o ácido láurico (AL), a FIN e a DT são inibidores da 5 α -redutase, que atuam diretamente sobre um dos principais desencadeadores do processo fisiopatológico da doença que resulta na perda do cabelo. A natureza anfifílica da cobertura das nanopartículas possibilitou a nanoencapsulação de quantidades elevadas dos fármacos hidrofóbicos FIN e DT, praticamente insolúveis em meio aquoso, incorporados na parte hidrofóbica da bicamada de ácido láurico. O diâmetro médio das nanopartículas obtido por microscopia eletrônica de transmissão foi de ~ 8 nm. As concentrações de ION, Fe, FIN e DT nas nanoformulações foram respectivamente iguais a 8,47 x10¹² NPs/mL; 6,85 μ g/mL; 250 μ g/mL e 125 μ g/mL, respectivamente. Métodos para a quantificação dos componentes das nanopartículas foram desenvolvidos e validados. As ION e Fe foram quantificados por espectroscopia de ressonância ferromagnética, associada à de absorção atômica e os fármacos por cromatografia líquida de alta eficiência. A estabilidade das nanoformulações foi avaliada por 90 dias, à temperatura ambiente e a 10°C, não apresentando diferenças significativas dos parâmetros monitorados: diâmetro hidrodinâmico, potencial zeta, pH e eficiência de encapsulação acima de 99%. Estudos de liberação foram realizados para ION-FIN e ION-DT os quais mostraram que ocorreu a liberação controlada dos fármacos durante 5 dias. Estudos de permeação cutânea *in vitro* com as nanoformulações ION-FIN e ION-DT, empregando o método Saarbrücken modificado, foram realizados por 12 e 24 horas. Os resultados mostraram que ocorreu a permeação e a retenção de ION, [Fe], FIN e DT nas três camadas da pele: estrato córneo, folículo piloso e pele remanescente. As características inovadoras das nanoformulações desenvolvidas e os resultados obtidos indicam que essas são uma alternativa promissora para o tratamento da alopecia, pois antes mesmo da ação dos ativos, a aplicação da nanoformulação promove um efeito de preenchimento devido à sua coloração escura.

Palavras-chave: Alopecia; nanoformulações; nanopartículas de óxido ferro; inibidores da 5 alfa redutase; administração tópica, finasterida, dutasterida.

ABSTRACT

In this work, nanoformulations comprising 5 alpha reductase inhibitors, such as, finasteride (FIN) and dutasteride (DT), were developed for topical administration aiming the treatment of hair loss, particularly androgenic alopecia. FIN or DT was anchored in colloidal magnetite nanoparticles functionalized with a bilayer of lauric acid bilayer (ION). All nanoformulations components were chosen to act in association with the drugs. Iron (Fe) present in nucleus of nanoparticles is an important nutraceutical agent for hair health and the lauric acid (LA), FIN and DT are inhibitors of 5 α -reductase, acting directly on one of the main triggers of pathophysiological process of the disease resulting in hair loss. The amphiphilic nature of nanoparticle coating made it possible to encapsulate high amounts of hydrophobic drugs such as FIN and DT, in the hydrophobic portion of lauric acid bilayer. Mean nanoparticle diameter obtained by transmission electron microscopy were ~ 8 nm. Concentrations of ION, Fe, FIN and DT in nanoformulations were respectively, $8,47 \times 10^{12}$ NPs / mL; 6,85 μ g / mL; 250 μ g / ml and 125 μ g / ml. Methods for quantification of nanoparticle components were developed and validated. ION and Fe were quantified by ferromagnetic resonance spectroscopy, associated with atomic absorption and drugs by high performance liquid chromatography. Stability of nanoformulations was evaluated during 90 days, at room temperature and at 10 °C, showing no significant differences of monitored parameters: hydrodynamic diameter, zeta potential, pH and encapsulation efficiency that was 99%. Release studies were performed for ION-FIN and ION-DT, showing controlled release of drugs during the time of 5 days. In vitro skin permeation study by modified Saarbrüecken method were performed for 12 and 24 hours with ION-FIN and ION-DT. Our findings showed permeation and retention of ION, Fe, FIN and DT in the three skin layers: stratum corneum, hair follicle and remacenant skin, that were extracted by differential tape stripping technique with aid of adhesive strips. ION, Fe, FIN and DT were quantified in each layer skin. Our findings indicate the developed nanoformulations are highly promising for future treatment of alopecia. Furthermore, the application of these formulations promotes a filling effect due to its dark coloration.

Keywords: Alopecia; nanoformulations; iron oxide nanoparticles; 5 alpha reductase inhibitors; topical administration, finasteride, dutasteride.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1 Ciclo normal do cabelo: fase anágena, fase catágena e fase telógena (CRANWELL; SINCLAIR, 2000).	2
Figura 1.2 Miniaturização progressiva do cabelo em cada ciclo (CRANWELL; SINCLAIR, 2000).	3
Figura 1.3 Estrutura molecular da finasterida (FIN) (EUROPEAN PHARMACOPOEIA, 2008a).	5
Figura 1.4 Estrutura molecular da Dutasterida (DT) (EUROPEAN PHARMACOPOEIA, 2008b).	6
Figura 1.5 Principais vias potenciais de entrega de fármacos na pele (CARAZO et al., 2018). ...	9
Figura 2.1 Processo de síntese das ION. Fonte: Ilustração da Autora.	17
Figura 2.2 (a) Imagem de MET obtida da amostra ION. (b) Histograma de distribuição do diâmetro da amostra ION.	23
Figura 2.3 Espectro Raman obtido da amostra de magnetita sintetizada.	25
Figura 2.4 Espectro Raman obtido da amostra de maguemita sintetizada.	25
Figura 2.5 Espectro FTIR obtido das amostras ION, MGM e AL.	26
Figura 2.6 Esquema da coordenação do carboxilato com íons metálicos. No exemplo, o íon metálico (NAKAMOTO, 2008).	27
Figura 2.7 Curva termogravimétrica (linha cheia) e DTG (linha pontilhada) obtidas das ION. ..	29
Figura 2.8 Curva M x H da amostra NPs de maguemita obtidas a 5 e 300K, conforme indicação.	30
Figura 3.1 Principais componentes do espectrômetro de ressonância ferromagnética. Figura modificada de (YALN, 2013).	33
Figura 3.2 Imagem típica de orelha de suíno inteira e da amostra da pele utilizada nos experimentos de permeação in vitro. Ilustração da Autora.	35
Figura 3.3 Imagem das amostras dispostas nos suportes para a realização do experimento de permeação in vitro utilizando o método Saarbrüecken modificado. Ilustração da Autora.	35
Figura 3.4 etapas de extração das camadas de pele por meio da técnica de tape stripping diferencial. Ilustração da autora.	36
Figura 3.5 Preparo das amostras para as varreduras. Ilustração da autora.	37
Figura 3.6 Intensidade do sinal de FMR em função do campo magnético para diferentes concentrações de ION, conforme indicado.	37
Figura 3.7 Curva de calibração da amplitude do sinal RFM em função da concentração de IONs. Equação da reta: $y = 1,74 \times 10^{-10} x - 0,08694$; $r = 0,9998$; $n = 3$	38

Figura 3.8 Curva de calibração da amplitude do sinal RFM em função da concentração [Fe]. Equação da reta: $y = 1,23 \times 10^{12} x - 243877$; $r = 0,9998$; $n = 3$.	38
Figura 3.9 Espectros do sinal RFM em função do campo magnético, obtidos de ION retidas no estrato córneo, folículo piloso e pele remanescente após 12 horas de permeação, conforme indicação.	39
Figura 3.10 Espectros do sinal RFM em função do campo magnético obtidos de ION retidas no folículo piloso e pele remanescente após 12 horas de permeação.	39
Figura 4.1 (a) Espectro de absorção no UV/Vis de uma solução de FIN e em (b) DT em metanol a 100 µg/mL. Faixa de varredura: 200 a 600 nm.	46
Figura 4.2 Cromatogramas referentes à injeção de soluções de FIN com concentração de 7,5 µg/mL em metanol, meio (60 água / 0,5 tween 80 / 40 EG) e os interferentes da pele (EC, FP, PR) e componentes da ION.	46
Figura 4.3 Cromatogramas referentes à injeção de soluções de DT com concentração de 7,5 µg/mL em metanol, meio (60 água / 0,5 tween 80 / 40 EG) e os interferentes da pele (EC, FP, PR) e componentes da ION.	46
Figura 4.4 Curva analítica obtida das áreas dos picos dos espectros UV-vis em 215 nm para a FIN por CLAE. Concentrações diluídas em metanol. Equação da reta: $y = 20938x - 338,61$ e coeficiente de correlação linear: $r = 0,9999$.	47
Figura 4.5 Representação gráfica da curva analítica obtida das áreas dos picos dos espectros UV-vis em 280 nm para a DUT por CLAE. Concentrações diluídas em metanol. Equação da reta: $y = 8192,15x + 330,77$ e coeficiente de correlação linear: $r = 0,9999$.	47
Figura 5.1 (a) Imagem de MET obtida da amostra ION-FIN. (b) Histograma de distribuição do diâmetro da amostra ION-FIN.	53
Figura 5.2 (a) Imagem de MET obtida da amostra ION-DT. (b) Histograma de distribuição do diâmetro da amostra ION-DT.	53
Figura 5.3 Espectros FTIR obtidos da FIN e do nanocoloide ION-FIN.	54
Figura 5.4 Espectros FTIR obtidos da DT e do nanocoloide ION-DT.	55
Figura 5.5 Curvas termogravimétricas (linha cheia) e DTG (linha pontilhada) de ION, ION-DT, ION-FIN.	57
Figura 6.1 Perfis de liberação da FIN a partir da ION-FIN contendo 250 µg/mL de FIN, pH 7,4 e de suspensão do fármaco na mesma concentração, $n = 3$, $p < 0,05$, conforme indicação.	62
Figura 6.2 Perfis de liberação da DT a partir da ION-DT contendo 125 µg/mL de DT, pH 7, 4, e de uma suspensão aquosa do fármaco na mesma concentração, $n = 3$, $p < 0,05$, conforme indicação.	63

Figura 6.3 Concentração de NPs/cm ² retidas em cada camada de pele após 12 e 24 horas de permeação com ION-FIN e ION-DT, n = 5, p < 0,05, conforme indicação.	64
Figura 6.4 Quantidade de [Fe] µg/cm ² retido nas camadas da pele após 12 e 24 horas de permeação com ION-FIN e ION-DT, n = 5, p < 0,05, conforme indicação.	65
Figura 6.5 Quantidade de FIN (µg/cm ²) retida nas camadas da pele após 12 e 24 horas de permeação com ION-FIN e ION-DT, n = 5, p < 0,05, conforme indicação.	66
Figura 6.6 Quantidade de DT (µg/cm ²) retida nas camadas da pele após 12 e 24 horas de permeação com ION-FIN e ION-DT, n = 5, p < 0,05, conforme indicação.	66

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.1 Principais contribuições dos nanosistemas para perda de cabelo (Adaptado de Pereira et al, 2018).	10
Tabela 2.1 Dados do estudo da estabilidade coloidal das ION registrada após 1 e 90 dias depois da síntese armazenadas a 10 e 30 °C.	24
Tabela 2.2 Modos vibracionais Raman magnetita e maguemita e seus números de ondas (cm ⁻¹)	25
Tabela 2.3 Bandas FTIR observadas nas amostras AL, MGM e ION e seus números de ondas (cm ⁻¹).	27
Tabela 2.4 Propriedades das ION.	28
Tabela 2.5 Valores das perdas de massa (Δm) totais obtidos na faixa de temperatura considerada (ΔT) e picos das derivadas das curvas termogravimétricas (DTG).	29
Tabela 2.6 Coeficiente de revestimento (ξ) das nanopartículas funcionalizadas com ácido láurico.	30
Tabela 3.1 Características dos métodos AP, ICP, MSM e RFM.	40
Tabela 4.1 Análise da precisão e exatidão intra e intercorrida do método de quantificação em CLAE da FIN diluída em metanol, em função da concentração.	48
Tabela 4.2 Análise da precisão e exatidão intra e intercorrida do método de quantificação em CLAE da DT diluída em metanol em função da concentração.	48
Tabela 4.3 Porcentagem de recuperação da FIN do EC, FP e ER utilizando 3 mL de metanol como solvente extrator.	49
Tabela 4.4 Porcentagem de recuperação da DUT do EC, FP e ER utilizando 3 mL de metanol como solvente extrator.	49
Tabela 4.5 Limite de Quantificação e Detecção teóricos da FIN e DT diluídas em metanol.	50
Tabela 5.1 Bandas FTIR observadas nas amostras FIN, ION-FIN, DT, ION-DT e seus números de ondas (cm ⁻¹).	56
Tabela 5.2 Dados obtidos do monitoramento dos parâmetros DH, PDI, potencial zeta, pH e EE% para avaliação da estabilidade coloidal das nanoformulações por 90 dias.	56
Tabela 5.3 Valores das perdas de massa (Δm) totais obtidos na faixa de temperatura considerada (ΔT) e picos das derivadas das curvas termogravimétricas (DTG) correspondentes.	58
Tabela 6.1 Solubilidade da FIN e DT no meio de liberação.	61

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

(ζ) - Potencial Zeta

(σ) - Índice de Polidispersão

AA - Alopecia Androgênica

AL - Ácido Láurico

ANOVA - Análise de Variância

BL - Bicamada de Ácido Láurico

CLAE - Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

CV - Coeficiente de Variação

DH - Diâmetro Hidrodinâmico

DHT - Dihidrotestosterona

DM - Diâmetro Médio obtido por Microscopia Eletrônica de transmissão

DP - Desvio Padrão

DT - Dutasterida

DTG - Derivada da Curva Termogravimétrica

EC - Estrato Córneo

FDA - Food and Drug Administration

FIN - Finasterida

FMR - Ferromagnetic Resonance

FP - Folículo Piloso

FTIR - Espectroscopia na Região do Infravermelho

ICP-MS - Espectrometria de Massa

ICP-OES - Espectrometria de Emissão Ótica

ION - Nanopartículas de Óxido de Ferro

LD - Limites de Detecção

LQ - Limites de Quantificação

M - Magnetização

MET - Microscopia Eletrônica de Transmissão

MGM - Maguemita

MNT – Magnetita

MSM - Medidas de Susceptibilidade Magnética

NPs - Nanopartículas

AP - Azul da Prússia

PDI - Índice de Polidispersão

PR - Pele Remanescente

RFM - Espectroscopia de Ressonância Ferromagnética

TG - Curva Termogravimétrica

VSM - Magnetômetro de Amostra Vibrante

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1	1
INTRODUÇÃO E OBJETIVOS	1
1.1 INTRODUÇÃO.....	1
1.2 TRATAMENTO FARMACOLÓGICO DA AA	3
1.3 NANOSISTEMAS.....	7
1.4 NANOPARTÍCULAS DE ÓXIDO DE FERRO	8
1.5 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	9
1.6 OBJETIVOS	16
1.6.1 Objetivo Geral.....	16
1.6.2 Objetivos Específicos.....	16
CAPÍTULO 2	17
NANOPARTÍCULAS DE ÓXIDO DE FERRO FUNCIONALIZADAS COM BICAMADA DE ÁCIDO LÁURICO: SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO	17
2.1 MATERIAIS.....	17
2.2 SÍNTESE DO NANOCOLOIDE	17
2.3 TÉCNICAS DE CARACTERIZAÇÃO	19
2.4 GRAU DE REVESTIMENTO ORGÂNICO DAS NPs.....	22
2.5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	22
2.5.1 Caracterização morfológica	22
2.5.2 Estabilidade coloidal das ION funcionalizadas.....	23
2.5.3 Espectroscopia Raman	24
2.5.4 Caracterização por espectroscopia na região do infravermelho.....	26
2.5.5 Concentração de ferro [Fe] e de NPs em ION por AAS	27
2.5.6 Análise termogravimétrica	28
2.5.7 Grau de revestimento das ION	29
2.5.8 Propriedades magnéticas das NPs de MGM sintetizadas	30
CAPÍTULO 3	31
QUANTIFICAÇÃO DE NPS DE MAGUEMITA NAS CAMADAS DA PELE POR MEIO DA ESPECTROSCOPIA DE RESSONÂNCIA FERROMAGNÉTICA	31
3.1 INTRODUÇÃO.....	31

3.2	MÉTODOS.....	33
3.2.1	Ressonância Ferromagnética.....	33
3.2.2	Validação de metodologia analítica para quantificação de ION por RFM	34
3.3	PERMEACÃO CUTÂNEA IN VITRO DO COLOIDE ION	35
3.4	TÉCNICA DO TAPE STRIPPING DIFERENCIAL	36
3.5	PREPARAÇÃO DAS AMOSTRAS PARA A QUANTIFICAÇÃO DE IONS NAS CAMADAS DA PELE POR RFM.....	36
3.6	RESULTADOS E DISCUSSÃO	37
CAPÍTULO 4.....		41
QUANTIFICAÇÃO DOS FÁRMACOS FINASTERIDA E DUTASTERIDA NAS CAMADAS DA PELE		41
4.1	MATERIAIS E MÉTODOS	41
4.2	CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA (CLAE)	41
4.3	DETERMINAÇÃO DOS COMPRIMENTOS DE ONDA DE ABSORÇÃO MÁXIMA DOS FÁRMACOS	41
4.4	MÉTODOS E CONDIÇÕES ANALÍTICAS PARA QUANTIFICAÇÃO DE FIN OU DT POR CLAE .	42
4.5	VALIDAÇÃO DOS MÉTODOS ANALÍTICOS PARA QUANTIFICAÇÃO DE FIN OU DT	42
4.6	RESULTADOS.....	44
CAPÍTULO 5.....		51
FORMULAÇÕES COM INIBIDORES DA 5 ALFA REDUTASE ANCORADOS EM NPS COLOIDAIIS DE MAGUEMITA: OBTENÇÃO E CARACTERIZAÇÃO		51
5.1	MÉTODOS.....	51
5.1.1	Incorporação dos fármacos nas ION	51
5.1.2	Estudo da estabilidade coloidal das nanoformulações	51
5.1.3	Eficiência de Encapsulação EE%	52
5.2	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	52
5.3	RESULTADOS E DISCUSSÃO	52
5.3.1	CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA	52
5.3.2	CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA POR ESPECTROSCOPIA NA REGIÃO DO INFRAVERMELHO..	53
5.3.3	ESTUDO DA ESTABILIDADE COLOIDAL DE ION, ION-FIN E ION-DT	56
5.3.4	ANÁLISE TERMOGRAVIMÉTRICA	57
CAPÍTULO 6.....		59

APLICAÇÃO TÓPICA IN VITRO DAS NANOFORMULAÇÕES DESENVOLVIDAS	59
6.1 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	59
6.2 ESTUDO IN VITRO DE LIBERAÇÃO DE FIN E DT PRESENTES NAS NANOFORMULAÇÕES	59
6.3 ESTUDO DE PERMEÇÃO CUTÂNEA IN VITRO DAS NANOFORMULAÇÕES	60
6.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	61
6.4.1 ESTUDO IN VITRO DE LIBERAÇÃO DE FIN E DT A PARTIR DAS NANOFORMULAÇÕES	61
6.4.2 ESTUDO DE PERMEÇÃO IN VITRO DE ION, [Fe], FIN E DT A PARTIR DAS NANOFORMULAÇÕES	63
CONCLUSÃO.....	68
PERSPECTIVAS.....	69
APÊNDICE 1 - PEDIDO DE PATENTE DEPOSITADO ORIGINADO DA TESE	70
REFERÊNCIAS	77

CAPÍTULO 1

INTRODUÇÃO E OBJETIVOS

1.1 Introdução

Na dinâmica normal do ciclo do cabelo o processo de perda e de substituição ocorre ciclicamente compreendendo as fases de crescimento, involução, quiescência e regeneração, conforme se observa na figura 1.1. A fase de crescimento (anágena) é caracterizada por intensa atividade mitótica da matriz do cabelo com duração de 2 a 6 anos. Durante esse período, o alongamento do cabelo é relativamente constante e igual a 1 cm por mês, e a duração desta fase determina o comprimento final do fio de cabelo. A fase involutiva (catágena) dura cerca de 2-3 semanas na qual as células da matriz param gradualmente de se dividir, eventualmente queratinizam e os folículos sofrem regressão de até 1/3 de suas dimensões. Quando ocorre a queratinização completa, o cabelo entra na última fase do ciclo, o período de quiescência do folículo capilar (telógena) que dura cerca de 3 a 4 meses, no qual o cabelo queratinizado cai e uma nova matriz é gradualmente formada, dando origem a um novo fio de cabelo que começa a crescer e o folículo reinicia a fase anágena (CRANWELL; SINCLAIR, 2000). No estado sadio, 85% dos cabelos do couro cabeludo encontram-se na fase anágena, 14% em catágena e 1% em telógena (MATOS, 2014). Vários fatores podem levar à queda anormal dos cabelos: questões genéticas (AHMAD et al., 1998; COTSARELIS; MILLAR, 2001; LUDWIG, 1977), autoimunes (AHMAD et al., 1998; LEW; SHIN; SIM, 2009; TARLOW et al., 1994), endócrinas (COTSARELIS; MILLAR, 2001; ROOK, 1965), metabólicas (COTSARELIS; MILLAR, 2001), nutricionais (TROST; BERGFELD; CALOGERAS, 2006), emocionais (LENANE et al., 2014; ROOK, 1965), uso de medicamentos (COTSARELIS; MILLAR, 2001), traumas mecânicos e térmicos (LEW; SHIN; SIM, 2009), infecções (SAKR et al., 2013), cicatrizes (COTSARELIS; MILLAR, 2001), entre outros.

Alopécia é a diminuição excessiva de cabelos e atinge um grande percentual da população humana. Estudos apontam que mais de 50% dos homens com idade na faixa de 30 a 50 anos (HIGGINS; CHRISTIANO, 2014; ROGERS; AVRAM, 2008), 15 a 30% das mulheres acima de 30 anos e mais de 80% das mulheres na pré-menopausa (BIRCH; MESSENGER; MESSENGER, 2001), são afetados pela alopecia. Especificamente, a alopecia androgênica (AA) é a forma mais comum de perda de cabelo em ambos os sexos (YIM; NOLE; TOSTI, 2014). O próprio termo, “AA”, reflete o conhecimento atual sobre o papel importante dos andrógenos e fatores genéticos na etiologia da doença (RATHNAYAKE; SINCLAIR, 2010;

ROSSI et al., 2016). A incidência e a gravidade são mais comuns em homens caucasianos do que de outras nacionalidades. Estima-se que as taxas de prevalência nas populações caucasianas sejam de 12% entre os homens com idade entre 18 e 29 anos, 50% entre os homens com idade entre 40 e 49 anos e aos 80 anos, mais de 90% dos homens caucasianos sejam afetados pela AA (RATHNAYAKE; SINCLAIR, 2010).

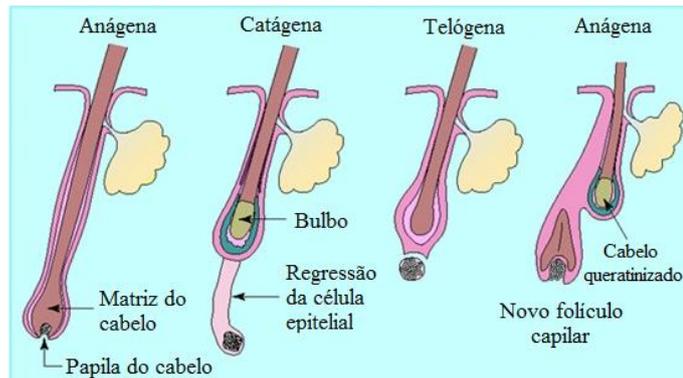


Figura 1.1 Ciclo normal do cabelo: fase anágena, fase catágena e fase telógena (CRANWELL; SINCLAIR, 2000).

O papel dos hormônios androgênicos na fisiopatologia da AA é bem conhecido, de modo que, o hormônio sexual testosterona presente nas células do folículo piloso é convertido em um metabólito biologicamente mais ativo, a dihidrotestosterona (DHT) por meio da ação da enzima 5 alfa redutase. A DHT liga-se aos receptores androgênicos com afinidade dez vezes maior do que a testosterona, ativando genes responsáveis pelo aumento da expressão dos receptores androgênicos na região, transformando gradualmente grandes folículos terminais em folículos miniaturizados (BANKA; BUNAGAN; SHAPIRO, 2013; MOFTAH; ABD - ELAZIZ; AHMED, 2013) conforme a ilustração da figura 1.2.

O aumento do nível de DHT sistêmico e a sua ação sobre os receptores androgênicos no folículo piloso, levam à alteração do ciclo do cabelo, provocam uma diminuição gradual da fase anágena, enquanto a duração da fase telógena permanece constante ou é prolongada, resultando na redução do número de folículos pilosos na fase anágena e um aumento relativo desses na fase telógena. Há também uma miniaturização progressiva de todo o aparato folicular, levando à conversão gradual de pelos grossos e pigmentados (terminais) para fios finos e pouco pigmentados (velus), com uma redução progressiva da densidade capilar, diminuição do diâmetro, do comprimento, da pigmentação do cabelo levando à interrupção do crescimento e à calvície, caracterizada pela ausência de cabelos na parte superior e frontal da cabeça, poupando as áreas laterais e posterior (BANKA; BUNAGAN; SHAPIRO, 2013).

O padrão típico descrito sobre a perda de cabelo característico da AA facilita o diagnóstico e distingue-o com facilidade de outros tipos de calvície. Esse padrão se deve ao fato de que os folículos pilosos nas regiões frontal e vértex da cabeça são sensíveis a androgênios devido à elevada expressão dos receptores androgênicos nessas regiões, enquanto que, as regiões occipital e temporal contêm folículos pilosos que não são sensíveis aos hormônios androgênicos (BANKA; BUNAGAN; SHAPIRO, 2013).

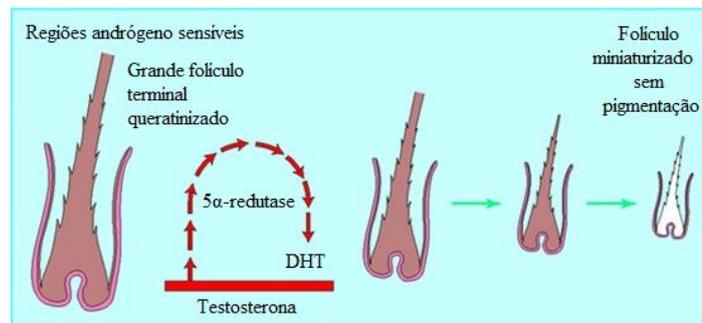


Figura 1.2 Miniaturização progressiva do cabelo em cada ciclo (CRANWELL; SINCLAIR, 2000).

Devido à natureza progressiva da AA, que pode resultar no desaparecimento do folículo piloso e consequente perda total do cabelo nas regiões afetadas, o tratamento deve ser iniciado precocemente, de maneira contínua e por tempo indeterminado, uma vez que o benefício não será mantido ao cessar a terapia.

1.2 Tratamento farmacológico da AA

O minoxidil administrado por via tópica e a finasterida por via oral são as terapias mais utilizadas para o tratamento da AA e os únicos medicamentos aprovados pela Food and Drug Administration (FDA) (BANKA; BUNAGAN; SHAPIRO, 2013; ROSSI et al., 2016). No entanto, a disponibilidade de tratamento farmacológico depende do país, de modo que, na Coreia e no Japão, a dutasterida oral (0,5 mg por dia) também é utilizada (MACDONALD, 2015). Portanto, os principais medicamentos sistêmicos utilizados no seu tratamento são os inibidores da 5 alfa redutase, a finasterida (FIN) (PRICE; MENEFE; SANCHEZ, 2006; ROSSI et al., 2016) e a dutasterida (DT) (BLUMEYER; TOSTI; MESSENGER, 2011), que pertencem ao grupo dos 4-azasteróides.

O minoxidil tópico é um tratamento eficaz para AA, disponível em soluções de 2% e 5% que, sendo aplicado duas vezes ao dia em doses de 1 mL (KANTI et al., 2016), tendo sido aprovado para uso em pacientes masculinos e femininos (ALVES; GRIMALT, 2016;

BLUMEYER; TOSTI; MESSENGER, 2011; GOREN; NACCARATO, 2018; SUNG et al., 2019).

O mecanismo de ação do minoxidil na AA não é completamente elucidado. Considera-se que o minoxidil é convertido em sulfato de minoxidil, um metabólito com efeito vasodilatador, que faz com que o folículo capilar miniaturizado permaneça mais tempo na fase anágena, produzindo pelos semelhantes aos cabelos terminais e diminuindo a queda (RATHNAYAKE; SINCLAIR, 2010) . São necessários de 4 a 6 meses de tratamento para obter resultados significativos e o efeito máximo é alcançado em aproximadamente 1 ano. No caso de aproximadamente 50% dos homens que usaram a solução de minoxidil, o processo de queda de cabelo é interrompido e uma pequena porcentagem deles experimenta graus leves a moderados de crescimento do cabelo. No entanto, após a interrupção da terapia, os cabelos caem novamente (BIENOVÁ et al., 2005).

O perfil de segurança da solução tópica de minoxidil é positivo, mas devido à presença de álcool etílico e/ou propilenoglicol na maioria das formulações comerciais, ocorrem alguns efeitos colaterais como irritação, ardor, dermatite alérgica, vermelhidão e ressecamento do couro cabeludo, que podem ser agravados pela necessidade de repetição do processo (RATHNAYAKE; SINCLAIR, 2010). Outro efeito colateral comum devido à ação do minoxidil é o eflúvio telógeno, causado pelo estímulo de pelos já na fase telógena a serem eliminados precocemente (BLUMEYER; TOSTI; MESSENGER, 2011) e hipertricose em diferentes áreas fora do couro cabeludo (KALIYADAN; NAMBIAR; VIJAYARAGHAVAN, 2013).

A finasterida ($C_{23}H_{36}N_2O_2$), cuja fórmula estrutural é apresentada na figura 1.3 (EUROPEAN PHARMACOPOEIA, 2008a), é um inibidor seletivo, competitivo e irreversível da enzima 5 alfa redutase do tipo II (PRICE; MENEFEE; SANCHEZ, 2006), que bloqueia a conversão da testosterona no tecido periférico em seu análogo, a DHT. Conseqüentemente, a diminuição dos níveis de DHT sistêmica e no couro cabeludo, bem como o aumento da testosterona, diminuem a ativação dos receptores de androgênicos nos folículos pilosos interrompendo o processo miniaturização desses (DALLOB et al., 1994; TULLY; SCHWARTZENBERGER; STUDDIFORD, 2010). A cetona C3 da FIN faz ligações de hidrogênio com os resíduos catalíticos dos aminoácidos Tirosina - 58 e Glutamato - 120 presentes no sítio ativo da enzima 5 alfa redutase, sendo uma explicação para a inibição competitiva que essa exerce (DRURY et al., 2009).

A FIN foi desenvolvida na década de 70 e aprovada pela FDA em 1992 para o tratamento da hiperplasia prostática benigna para administração oral na dosagem de 5mg/dia.

Posteriormente, observou-se que pacientes em tratamento com FIN para a hiperplasia prostática benigna também apresentavam uma reversão nos sintomas da alopecia, e em 1997 esta foi aprovada também para o tratamento da AA com administração oral na dosagem de 1mg/dia (KAUFMAN; ROTONDA; SHAH, 2008; STOUGH et al., 2002; WOOD; PRICE, 1999).

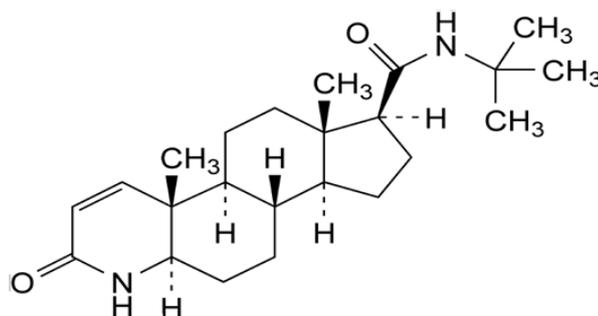


Figura 1.3 Estrutura molecular da finasterida (FIN) (EUROPEAN PHARMACOPOEIA, 2008a).

O potencial do emprego da FIN para o tratamento da calvície continuou a ser investigado ao longo do tempo (SINCLAIR, 2005). A ação da FIN foi avaliada em doses de 1mg/dia, em comparação a um placebo, em 1553 homens com idades entre 18 e 41 anos, durante cinco anos. Os resultados mostraram uma diminuição visível da perda de cabelo no grupo tratado em comparação ao grupo controle, pacientes tratados com placebo. Os resultados mostraram que, ao final de cinco anos, 75% dos pacientes tratados com placebo desenvolveram calvície, enquanto apenas 10% dos pacientes tratados com FIN desenvolveram a doença (KAUFMAN et al., 2008). A eficácia e segurança do uso de FIN para o tratamento de AA em mulheres também foi avaliada. Em adição, a FIN administrada na dosagem de 5mg/dia mostrou resultados positivos após 12 meses de tratamento (STOUT; STUMPF, 2010). Como a FIN pode apresentar efeitos teratogênicos, é necessário cautela no emprego deste fármaco em mulheres em idade fértil, sendo imprescindível evitar a gravidez. Os efeitos colaterais foram cefaleias e irregularidades menstruais (PERERA; SINCLAIR, 2014).

A DT ($C_{27}H_{30}F_6N_2O_2$), cuja estrutura é apresentada na figura 1.4 {Formatting Citation} é um inibidor da 5 alfa redutase (SANTOS; SHAPIRO, 2014), também usado no tratamento da hiperplasia prostática benigna (WU; KAPOOR, 2013). Seu efeito é três vezes mais potente do que a finasterida na inibição da 5 alfa redutase tipo I e 100 vezes mais potente na inibição da 5 alfa redutase tipo II, porém, o mecanismo de interação e inativação das enzimas pela DT não é conhecido. O emprego da dutasterida, na dose de 0,5mg/dia, levou à redução dos níveis séricos de DHT em aproximadamente 90% devido à sua capacidade de inibir as isomorfias I e II da enzima, enquanto a finasterida, na dose de 5mg/dia, diminui a DHT sérica em 70% (CLARK et al., 2004; DALLOB et al., 1994; LOLLI et al., 2017). Embora a 5 alfa redutase do tipo I

tenha sido relatada como localizada predominantemente na pele, tanto em folículos pilosos quanto em glândulas sebáceas, a do tipo II é encontrada nos órgãos genitais masculinos, próstata e também nos folículos pilosos. Portanto, a DT, um inibidor duplo, em hipótese seria mais eficaz quando comparado ao inibidor seletivo do tipo I como a finasterida (SHANSHANWAL; DHURAT, 2017) . Conforme foi mencionado, a DT é licenciada para o tratamento da AA na Coreia do Sul desde 2009 e no Japão desde 2015 (MACDONALD, 2015), enquanto nos Estados Unidos ainda não (CHOI et al., 2016; SHAPIRO; OTBERG, [s.d.]), porém é prescrita *off-label* na dosagem de 5mg/dia. A utilização da dose de 2,5mg de DT também foi investigada e se mostrou mais eficiente na supressão da DHT no couro cabeludo em comparação com a DT 0,5mg e a FIN 5mg (OLSEN et al., 2006). Entretanto, a dose de 2,5mg foi associada a uma maior prevalência de efeitos secundários sexuais como a diminuição da libido (OLSEN et al., 2006). Outros estudos mostraram que 75% dos pacientes que não responderam ao tratamento com FIN 1 mg/dia e posteriormente foram tratados por 6 meses com 0,5 mg/dia de DT tiveram o processo de perda progressiva do cabelo interrompido (INUI; ITAMI, 2011; VAN NESTE et al., 2000)

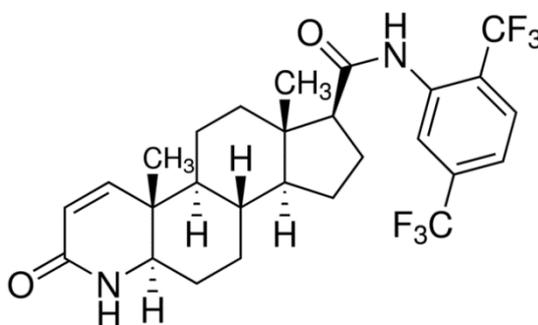


Figura 1.4 Estrutura molecular da Dutasterida (DT) (EUROPEAN PHARMACOPOEIA, 2008b).

Embora os inibidores da 5 alfa redutase FIN e DT sejam eficazes no tratamento de AA, as terapias disponíveis os utilizam apenas na forma oral, que ocasionam efeitos adversos resultantes da ação sistêmica que reduzem os níveis de DHT por todo o corpo, desencadeando efeitos secundários, como: a disfunção erétil, perda da libido, distúrbios da ejaculação e ginecomastia (GUPTA; CHARRETTE, 2014; GUR; KADOWITZ; HELLSTROM, 2013; MYSORE, 2012). Para evitar esses efeitos adversos, uma opção promissora é a administração da FIN e DT por via tópica, visando limitar a ação do fármaco ao local da aplicação (HAJHEYDARI; AKBARI; SAEEDI, 2009; MADHESWARAN et al., 2015; SOUSA; TOSTI, 2013).

1.3 Nanosistemas

Nanobiomateriais empregados como sistemas de veiculação de fármacos estão tendo grande impacto na melhoria da eficiência do tratamento de muitas patologias, porém a sua aplicação em grande escala depende do desenvolvimento de novas alternativas terapêuticas, por meio da síntese de novos sistemas carreadores, de diferentes vias de administração e de adequações bionanotoxicológicas (PRIDGEN et al., 2013; SMITH et al., 2013).

Dentre os nanomateriais com potencial para a veiculação de fármacos, pode-se citar os lipossomas (DE SÁ et al., 2015), as nanoemulsões (RIBEIRO et al., 2016), as nanopartículas (NPs) (MATOS et al., 2015), e os nanocompósitos (ALCÂNTARA et al., 2011; MOSINIEWICZ-SZABLEWSKA et al., 2018; SOLER, 2018) entre outros. As NPs podem ser preparadas a partir de polímeros (PIRES et al., 2017; PY-DANIEL et al., 2016), lipídeos (VENÂNCIO et al., 2017), óxidos de ferro superparamagnéticos (NUNES et al., 2014; SOLER et al., 2011), de metais (GOMES et al., 2018), etc. Estes nanossistemas têm se destacado por promoverem diagnósticos mais precisos e/ou alternativas terapêuticas eficientes que possibilitam a administração de moléculas biologicamente ativas em local específico, com eficiência terapêutica relevante e efeitos colaterais mínimos (AHN; JUNG; LEE, 2013; ESPINOSA et al., 2016; LAWRENCE; REES, 2012).

A administração tópica, em particular, é uma estratégia muito atraente por oferecer vantagens em diversas circunstâncias quando comparadas às demais vias de administração, superando aspectos relacionados às características farmacocinéticas e farmacodinâmicas. As abordagens tópicas adotadas atualmente para a administração de fármacos incluem géis transferosomais, microemulsões, nanoemulsões e nanopartículas poliméricas e lipídicas (CASTRO; FERREIRA, 2008).

Devido à estrutura complexa e bem organizada da pele humana, a maioria dos fármacos apresentam dificuldades para permeá-la. Em geral, os sistemas nanoparticulados permeiam mais a pele do que as formulações não particuladas (PEREIRA et al., 2018). As nanopartículas, particularmente, desempenham um papel importante no direcionamento de fármacos via apêndice cutâneo, na qual por meio dos folículos pilosos conseguem uma penetração mais profunda na pele do que os fármacos líquidos convencionais. Em adição, as NPs podem depositar o fármaco nos folículos pilosos permitindo uma libertação sustentada desse para os tecidos adjacentes (LADEMANN et al., 2006, 2007; RABER et al., 2014; VOGT; BLUME-PEYTAVI, 2014).

Nanosistemas abaixo de 100 nm são ideais para a veiculação de fármacos direcionados aos folículos pilosos e em torno de 200 nm a liberação ocorre até a parte do istmo do folículo

piloso. Sendo assim, os nanosistemas têm uma tendência natural de se acumular nos folículos pilosos, o que contribui para o transporte de fármacos através da pele e o acúmulo desses na unidade folicular que é particularmente importante no tratamento de doenças como a alopecia (PEREIRA et al., 2018; VOGT et al., 2005; VOGT; BLUME-PEYTAVI, 2014).

1.4 Nanopartículas de óxido de ferro

Entre os nanomateriais que têm sido empregados como plataformas para o ancoramento de fármacos e marcadores destacam-se os óxidos de ferro de baixa dimensionalidade que apresentam comportamento superparamagnético e alta biocompatibilidade, por isso têm recebido muita atenção em áreas como a física, a biologia, a química e a medicina. O comportamento superparamagnético de partículas magnéticas monodomínio é similar ao dos materiais paramagnéticos, no sentido de que perdem sua magnetização quando o campo magnético aplicado é removido. Podem ser funcionalizadas com moléculas propícias para interagir com, ou ligar-se a entidades biológicas, apresentando grande potencial para aplicações em biomedicina, em imagem, para melhoria do contraste em imagens de ressonância magnética, ou terapias como sistemas para liberação de fármacos, marcadores, hipertermia magnética, entre outras (SOLER; PATERNO, 2017). Adicionalmente, as partículas de óxidos de ferro superparamagnéticas (*iron oxides nanoparticles* – IONs) têm um grande impacto nas novas tecnologias industriais como o desenvolvimento de óleos isolantes para transformadores, estruturas para a spintrônica, bioeletroquímica, catálise, e sensores químicos (ALCÂNTARA et al., 2013b, 2013a). Em adição, as partículas ION podem ser sintetizadas por rotas químicas úmidas, com controle razoável de forma, tamanho, composição, cristalinidade e propriedades físicas. Após a síntese essas partículas podem sofrer tratamentos superficiais adequados para serem dispersas em solventes polares ou apolares produzindo suspensões coloidais altamente estáveis (ALCÂNTARA et al., 2011; VIALI et al., 2010). Em geral, esta funcionalização é realizada com moléculas ou macromoléculas específicas para determinada aplicação, as quais podem desempenhar papéis fundamentais nas propriedades desses coloides: i) conferir às partículas um mecanismo para promover a estabilidade coloidal; ii) introduzir a carga superficial, e a configuração adequadas para preparar os compósitos e iii) servir como agente de acoplamento para a imobilização de fármacos ou biomoléculas passíveis de reconhecimento por receptores específicos; iv) e ainda ser o próprio fármaco, por exemplo, o polímero condroitina (RIVERA et al., 2019).

1.5 Revisão Bibliográfica

As principais vias potenciais de entrega de fármacos na pele ilustradas na figura 1.5 (CARAZO et al., 2018) são: (i) a via intercelular, na qual o fármaco se difunde ao redor dos corneócitos depositando-se na matriz lipídica; (ii) a via transcelular, na qual o fármaco se difunde através do estrato córneo intacto (corneócitos e matriz lipídica extracelular) e (iii) via apêndices cutâneos, onde o fármaco se deposita nos folículos pilosos, glândulas sebáceas e glândulas sudoríparas (GRATIERI; GELFUSO; LOPEZ, 2008). A via transepidérmica, que é a dominante, é composta por duas vias: transcelular e intercelular. A difusão via transcelular é preferida por fármacos hidrofílicos. Em oposição, os fármacos lipofílicos entram pela via intercelular. Na introdução via apêndices cutâneos, os folículos pilosos são uma alternativa para evitar o estrato córneo, e deste modo contribuem significativamente para a penetração de fármacos, porque proporcionam um aumento da área superficial, e facilitam a ultrapassagem da barreira epidérmica em direção às partes mais profundas da pele, permitindo a entrada de íons e grandes moléculas polares (CARAZO et al., 2018; PLANZ; LEHR; WINDBERGS, 2016).

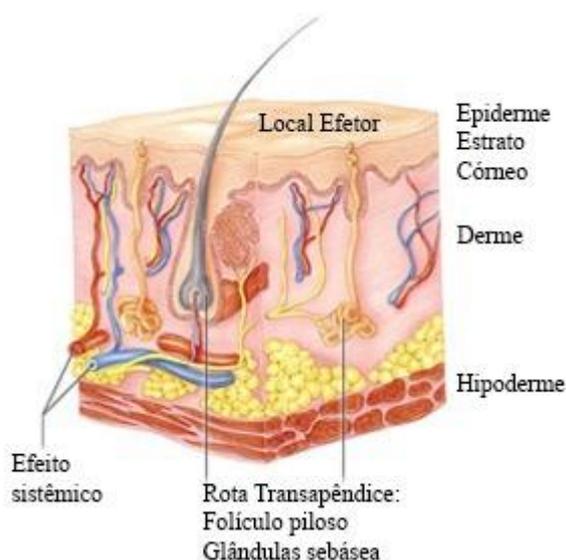


Figura 1.5 Principais vias potenciais de entrega de fármacos na pele (CARAZO et al., 2018).

A nanotecnologia tem contribuído para o desenvolvimento de nanossistemas biocompatíveis com novas estratégias na prevenção e no tratamento da alopecia. Em geral esses nanossistemas, ultrapassam a primeira barreira da pele, o estrato córneo, promovem a liberação controlada do fármaco a alvos específicos, como no folículo piloso, elevando a concentração local, aumentando a atividade terapêutica em doses menores, reduzindo as administrações e os efeitos colaterais (PEREIRA et al., 2018).

Alguns nanossistemas lipídicos (etossomas, niossomas, lipossomas, nanopartículas lipídicas) e nanopartículas poliméricas, listados na tabela 1.1, têm sido investigados para a

veiculação tópica de minoxidil, FIN e DT, visando o tratamento da AA. Dentre os nanossistemas lipídicos, as nanopartículas foram estudadas para a entrega de fármacos direcionados aos folículos pilosos, porque o transporte de fármacos para dentro do folículo depende da interação com o sebo que o preenche.

Tabela 1.1 Principais contribuições dos nanossistemas para perda de cabelo (Adaptado de Pereira et al., 2018).

Nanopartículas	Medicamentos	Diâmetro	Testes	Vantagens
Nanopartículas lipídicas sólidas	Minoxidil	190 nm	<i>In vitro</i>	Alvo da entrega de fármacos para os folículos pilosos e aumento no crescimento de novos folículos (PADOIS et al., 2011)
Portadores de lipídeos nanoestruturados	Minoxidil Finasterida Dutasterida	281,4 nm; 200 nm 177 nm 200 nm 187,6 nm	<i>In vitro</i>	Boa estabilidade física e química no armazenamento, melhor eficiência de encapsulação e maior disponibilidade do fármaco (ALJUFFALI et al., 2014; GOMES et al., 2014; NOOR et al., 2017; UPRIT et al., 2013; WANG et al., 2017)
Lipossomas	Minoxidil Finasterida	1 – 5 µm 3,66 µm	<i>In vitro</i>	Formação de película de fosfolipídios na pele que interage com sebo, facilitando a penetração e acúmulo folicular (JAIN et al., 2009; TABBAKHIAN et al., 2006)
Etossomas	Finasterida	92 nm	<i>In vitro</i>	Aumento do fluxo de permeação (RAO et al., 2008)
Niossomas	Minoxidil Finasterida	—	<i>Estudo clínico</i>	Maior acúmulo de fármacos nas camadas da pele (MURA et al., 2007a; TABBAKHIAN et al., 2006)
Transferossomas	Minoxidil	—	<i>In vivo</i>	Crescimento promovido do cabelo (RAMEZANI et al., 2018)
Quitosana/nanopartículas de lecitina	Minoxidil	271 nm	<i>In vitro</i>	Maior estabilidade e aumento da concentração de fármacos nos folículos pilosos (MATOS et al., 2015)
Micropartículas de quitosana	Minoxidil	2.9 – 4.2 µm	<i>In vitro</i>	Nanopartículas retidas no folículo piloso. Liberação controlada do fármaco (GELFUSO et al., 2011, 2015)
PLGA/Microesferas/grânulos efervescentes	Finasterida Minoxidil	300 nm; 2 µm 0,2 milímetro	<i>In vitro</i>	Liberação controlada e aumento da acumulação de fármacos

Os estudos mostraram que os sistemas formados por minoxidil encapsulado em nanopartículas lipídicas sólidas (PADOIS et al., 2011), lipossomas (JAIN et al., 2009) e niossomas (MURA et al., 2007b) apresentaram acúmulo do fármaco nas camadas da pele devido à formação de uma película de fosfolipídios na mesma que interagiu com o sebo facilitando a penetração folicular. O mesmo ocorreu com a finasterida veiculada por lipossomas e niossomas (TABBAKHIAN et al., 2006). Em outro estudo *in vivo*, os resultados mostraram que o sistema contendo minoxidil em transferossomas (RAMEZANI et al., 2018) promoveu o

crescimento do cabelo. Em resumo, sistemas contendo o minoxidil, a FIN e a DT (NOOR et al., 2017) veiculados em nanocarreadores lipídicos apresentaram estabilidade física e química, melhoria da eficiência de encapsulação e aumento da liberação dos fármacos (ALJUFFALI et al., 2014; GOMES et al., 2014; UPRIT et al., 2013; WANG et al., 2017), quando comparados às formulações não particuladas.

As nanopartículas poliméricas biodegradáveis e biocompatíveis também têm sido investigadas como sistemas de transporte de fármacos para o tratamento da alopecia. Os polímeros biodegradáveis naturais mais utilizados são a quitosana, a albumina, a gelatina e o alginato e os sintéticos são a policaprolactona, os copolímeros de poli(lactídeo-co-glicolídeo), poli(aminoácidos) e poli (lactídeo). Os estudos mostraram que as nanopartículas poliméricas protegem os medicamentos encapsulados da degradação e controlam a liberação dos mesmos. O tamanho das partículas também exerce influência na deposição do fármaco no folículo piloso. Estudos mostram que partículas de 5 µm não penetram nas camadas lipídicas do estrato córneo, sendo retidas apenas no infundíbulo dos folículos pilosos, enquanto as de 20-40 nm atingem uma penetração mais profunda permitindo a entrega de medicamentos ao nível do bulbo capilar, local de extrema importância para o crescimento capilar devido às células da matriz e melanócitos. As nanopartículas com diâmetros menores ficam presas na estrutura do folículo piloso, pois não podem fluir através do sebo e conseqüentemente, apresentam maior disponibilidade do fármaco no local de ação. Em adição, partículas maiores, com tamanho entre 228 e 365 nm podem atingir a entrada da glândula sebácea no istmo (PEREIRA et al., 2018).

Microesferas contendo finasterida e NPs do copolímero poli(lactídeo-co-glicolídeo) apresentaram biocompatibilidade e grande potencial no tratamento da alopecia (ROQUE et al., 2017), pois ocorreu a liberação contínua do fármaco por até 5 - 6 semanas (PENG et al., 2007).

No estudo do sistema formado por nanopartículas de quitosana e sulfato de minoxidil com diâmetro médio de 271 ± 59 nm, verificou-se um aumento de duas vezes da concentração dentro dos folículos pilosos após 6 h do início do experimento, em comparação com uma solução controle (MATOS et al., 2015), enquanto que no caso de micropartículas com sulfato de minoxidil com dimensões variando de 2,9 a 4,2 µm aumentou o acúmulo do fármaco em seis vezes nos folículos pilosos em relação à solução de sulfato de minoxidil (GELFUSO et al., 2015). No caso de outro estudo com granulado efervescente de minoxidil (0,2 mm) o aumento do fármaco nos folículos pilosos foi de 2,7 vezes (PEREIRA et al., 2017). Portanto, os resultados disponíveis dos estudos realizados mostram que sistemas formados por nano e micropartículas são adequados para o controle da liberação de fármacos (GELFUSO et al.,

2011; MATOS et al., 2015), o que pode resultar em benefícios potenciais e à adesão do paciente ao tratamento.

No caso dos estudos sobre a administração da FIN por via tópica empregando formulações contendo lipossomas, observou-se que a permeação da FIN na pele total foi aumentada devido à adição de agentes poliméricos (BIRUSS; VALENTA, 2006). O potencial dos lipossomas e niossomas como veículos de liberação tópica da FIN foram avaliados em estudos de permeação *in vitro* e estudos *in vivo* apresentando um aumento significativo no efeito de permeação e retenção local do fármaco, comparado à solução hidroalcoólica de FIN (TABBAKHIAN et al., 2006). A aplicação de lipossomos multilamelares constituídos por fosfolípidios hidrogenados com FIN também aumentou a permeação do fármaco fazendo com que a deposição do mesmo na pele fosse cinco vezes maior do que a da solução controle e o gel com FIN (KUMAR et al., 2007).

Estudos demonstraram que os etossomas são nanocarreadores vesiculares promissores para a administração tópica de FIN, pois apresentaram excelente eficiência de encapsulação do fármaco e em experimentos *in vitro* aumentaram a permeação e retenção deste na pele, em comparação com solução aquosa, hidroetanólica e lipossomas convencionais contendo FIN (RAO et al., 2008). Outros trabalhos também mostraram o potencial de nanopartículas poliméricas, nanopartículas lipídicas sólidas e nanopartículas de fase líquido cristalina como carreadores tópicos para a FIN e para a DT (CEVC; VIERL, 2010; LAPTEVA; KALIA, 2013; MADHESWARAN et al., 2015; PROW et al., 2011; RAO et al., 2015; ZHANG; MICHNIAK-KOHN, 2011).

Os resultados da pesquisa detalhada realizada na literatura não mostraram estudos sobre o desenvolvimento de formulações baseadas em nanocarreadores magnéticos para administração tópica direcionada ao folículo piloso, visando a prevenção ou o tratamento da alopecia. Portanto, não foram encontrados relatos sobre a aplicação tópica de nanocarreadores magnéticos de óxido de ferro associados a inibidores da 5 alfa redutase, como a FIN e DT, visando o tratamento de doenças associadas aos folículos pilosos, como a alopecia, e a sua distribuição e quantificação nas camadas da pele. Diante dos desafios concernentes à administração tópica desses fármacos, as IONs representam uma alternativa inovadora devido à sua biodegradabilidade, baixa toxicidade e imunogenicidade, além de serem superparamagnéticas. Adicionalmente, quando metabolizadas *in vivo* produzem compostos inócuos; podem ser sintetizadas por métodos químicos de baixo custo e dispersos como coloides; são aprovadas pelo FDA e têm sido utilizadas em uma ampla gama de aplicações

biomédicas, tendo elevada aceitação na indústria farmacêutica (EL-HAMMADI; ARIAS, 2015b; KRATZ, 2008).

Estudos recentes, avaliaram a penetração de IONs na pele com estímulos físicos (Sonoforese) e químicos (ácido oleico), demonstrando que mesmo na presença desses intensificadores, a penetração das IONs ficou restrita à camada superior do estrato córneo granuloso (LEE et al., 2010b). Entretanto, outro estudo avaliou os riscos potenciais de contaminação por contato acidental com IONs durante a sua produção ou uso. Concluindo que IONs menores que 10 nm são capazes de penetrar no estrato córneo e no folículo piloso atingindo ocasionalmente a epiderme viável mas não sendo capazes de atravessar a pele (BAROLI et al., 2007).

A maioria dos estudos existentes com IONs são aplicados à terapia de câncer sendo essas administradas por via endovenosa (ANTONIO et al., 2014; COLE; YANG; DAVID, 2011; EL-HAMMADI; ARIAS, 2015a; GAO; GU; XU, 2009; PAPAKOSTAS et al., 2011; SEENEY, 2015). Apenas um estudo investigou a liberação transdérmica do agente quimioterápico epirrubicina ancorado em IONs, mostrando que, com aplicação de um gradiente de campo magnético, o nanocompósito penetrou a barreira cutânea e atingiu o tecido subcutâneo por via transfolicular (RAO et al., 2015).

Entre os materiais empregados para o recobrimento das IONs, o ácido láurico (AL) ou ácido dodecanóico, é um ácido graxo saturado com de 12 carbonos e fórmula estrutural $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{10}\text{COOH}$, se mostrou promissor para a aplicação tópica, e tem indicação farmacotécnica como um promotor de permeação. Com base em suas características e propriedades, o ácido láurico foi empregado na funcionalização das nanopartículas de maguemit. Para atender às características de biocompatibilidade e pH fisiológico, a cobertura é formada por uma bicamada de AL para promover a estabilização das IONs em meio aquoso [132–134] e incorporação de fármacos hidrofóbicos (CHAVES, 2008; IOCCA, 2013; MESSIAS; SANTOS, 2012; SALDANHA, 2012; SANTANA et al., 2005; SOLER et al., 2007c; SOUZA, 2011). Em adição, estudos mostram que o AL apresenta função terapêutica no tratamento da AA, pois assim como a FIN e a DT atua como inibidor da 5 alfa redutase. Os resultados publicados mostram a sua ação como um inibidor não competitivo das enzimas 5 alfa redutases do tipo I e II, sendo que, o modo de ação sugerido é a modulação da atividade enzimática por modificação do ambiente lipídico da enzima, do que a interação com o seu sítio catalítico da mesma (BAYNE et al., 1999; DÉLOS et al., 1994; IEHLÉ et al., 1995; RAYNAUD; COUSSE; MARTIN, 2002).

Sistemas nanoparticulados formados por IONs funcionalizados com AL foram empregados com sucesso na incorporação de fármacos como a mitoxantrona (HORNUNG et al., 2016; TIETZE et al., 2013), cloridrato de tetraciclina (LI et al., 2016), anfotericina B (SALDANHA, 2012; SILVA, 2008) e succinato de ródio (II) (OLIVEIRA et al., 2017) visando a liberação controlada e eficácia terapêutica melhorada, em comparação com os fármacos livres.

O ferro que compõe o núcleo das ION é um dos principais micronutrientes no metabolismo do corpo e também apresenta ação terapêutica sobre a alopecia (YIP, 1998). Estudos mostraram a decomposição da estrutura das ION e a incorporação elementar de íons de ferro metabolizados (KOLOSNAJ-TABI et al., 2016; LEVY et al., 2011; ROJAS et al., 2017). Outro estudo realizado mostrou que homens e mulheres com alopecia tinham em geral níveis séricos de ferritina inferior, em comparação com os controles, e que mulheres na pré-menopausa apresentavam níveis ainda mais baixos (PARK et al., 2013). Portanto, a suplementação de ferro a nível folicular introduzido por uma formulação com nanocarreadores de óxido ferro deve colaborar para a efetividade do tratamento de pacientes com alopecia.

Os sistemas nanoparticulados multifuncionais à base de óxido de ferro têm sido investigados para a administração transdérmica de fármacos, no tratamento do câncer de pele, por meio de nanovesículas magnéticas que foram preparadas por coprecipitação química e cobertas com sílica (EL-HAMMADI; ARIAS, 2015b). Em outro estudo, nanocompostos de óxidos de ferro foram empregados na fototermia para absorver a luz e liberar a energia na forma de calor após um pulso de laser, obtendo-se elevadas temperaturas que provocaram a ruptura microscópica do tecido e dano celular (ANTONIO et al., 2014). Os nanosistemas multifuncionais à base de óxido de ferro ainda são pouco explorados na dermatologia, pois os dados se referem principalmente à terapia de câncer (ANTONIO et al., 2014; EL-HAMMADI; ARIAS, 2015b; PAPAKOSTAS et al., 2011; SEENEY, 2015).

Este trabalho contempla o desenvolvimento de formulações compostas por nanocarreadores magnéticos de óxido de ferro, na fase maguemita, revestidos com bicamada de ácido láurico e com a incorporação de FIN ou DT, nas quais todos os seus componentes em associação atuarão na prevenção e/ou tratamento da alopecia de diferentes origens, em particular a alopecia androgênica. A formulação possibilitará a administração tópica, de modo a direcionar a liberação específica e controlada dos seus ativos ao folículo piloso e consequentemente reduzir a frequência de aplicações necessárias, a absorção sistêmica, os efeitos adversos e promover o crescimento dos cabelos de forma sustentada. Além disso, a formulação por possuir cor escura também proporcionará a sensação de preenchimento capilar antes mesmo do início da ação dos seus ativos. A formulação desenvolvida representa um

tratamento em potencial para alopecia, com menos efeitos colaterais e com maior aceitação dos usuários do que os pré-existentes.

1.6 OBJETIVOS

1.6.1 Objetivo Geral

Desenvolver, caracterizar, e realizar estudos *in vitro* de permeação e liberação em diferentes nanoformulações, compostas por FIN ou DT, ancoradas em nanopartículas de óxido de ferro funcionalizadas com ácido láurico visando a aplicação tópica direcionada ao folículo piloso para o tratamento da alopecia androgênica.

1.6.2 Objetivos Específicos

- Sintetizar e caracterizar dispersões magnéticas formadas por nanopartículas de óxido de ferro funcionalizadas com ácido láurico;
- Padronizar e validar método analítico para a quantificação das nanopartículas de óxido de ferro;
- Padronizar e validar métodos analíticos para a quantificação dos fármacos FIN e DT;
- Estabelecer a eficiência de encapsulação dos fármacos no nanocarreador de óxido de ferro coberto com bicamada de ácido láurico;
- Avaliar a estabilidade dos nanocoloide antes e após a incorporação dos fármacos FIN e DT;
- Avaliar *in vitro* o perfil de liberação dos fármacos a partir das nanoformulações desenvolvidas;
- Avaliar *in vitro* a capacidade de permeação, retenção cutânea e folicular das nanopartículas e dos fármacos em pele suína.

Este trabalho está organizado da seguinte forma: o Capítulo 2 discute a síntese das nanopartículas e as técnicas de caracterização empregadas; o Capítulo 3 apresenta a metodologia analítica desenvolvida para a quantificação das nanopartículas; o Capítulo 4 discute a metodologia analítica desenvolvida para a quantificação dos fármacos finasterida e dutasterida; no Capítulo 5 são apresentados os resultados da caracterização das nanoformulações, da incorporação dos fármacos, estabilidade e liberação dos mesmos; no Capítulos 6 são discutidos os resultados obtidos da aplicação tópica *in vitro* das formulações desenvolvidas, e em seguida, as conclusões e as perspectivas . Em anexo o resumo do pedido de patente depositado.

NANOPARTÍCULAS DE ÓXIDO DE FERRO FUNCIONALIZADAS COM BICAMADA DE ÁCIDO LÁURICO: SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO

Os nanocoloides que serviram como plataforma para o ancoramento dos fármacos é formado por nanopartículas de óxido de ferro ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$. maguemita) funcionalizadas com uma bicamada de ácido láurico. Os materiais, procedimentos experimentais, bem como, as configurações das técnicas utilizadas na caracterização e os resultados obtidos, serão descritos neste capítulo.

2.1 Materiais

Os reagentes cloreto de ferro (II) tetrahidratado, cloreto de ferro (III) hexahidratado, hidróxido de sódio, ácido clorídrico, brometo de potássio e ácido láurico foram adquiridos da Sigma Aldrich (São Paulo, Brasil). Membranas de celulose para diálise foram adquiridas de InLab (São Paulo, Brasil).

2.2 Síntese do nanocoloide

As NPs de maguemita funcionalizadas com ácido láurico foram sintetizadas empregando-se o método de coprecipitação química em meio alcalino dos íons Fe^{2+} e Fe^{3+} (ALCÂNTARA, 2007; KANG et al., 1996; SOLER et al., 2007a; VIALI et al., 2010). Resumidamente, a síntese foi realizada em quatro etapas: precipitação das nanopartículas de magnetita, oxidação das mesmas para obtenção de maguemita, tratamento superficial para funcionalização da superfície com ácido láurico e dispersão do material nanoparticulado em meio aquoso para produção do coloide, chamado de fluido magnético, conforme a ilustração do processo de síntese na figura 2.1.

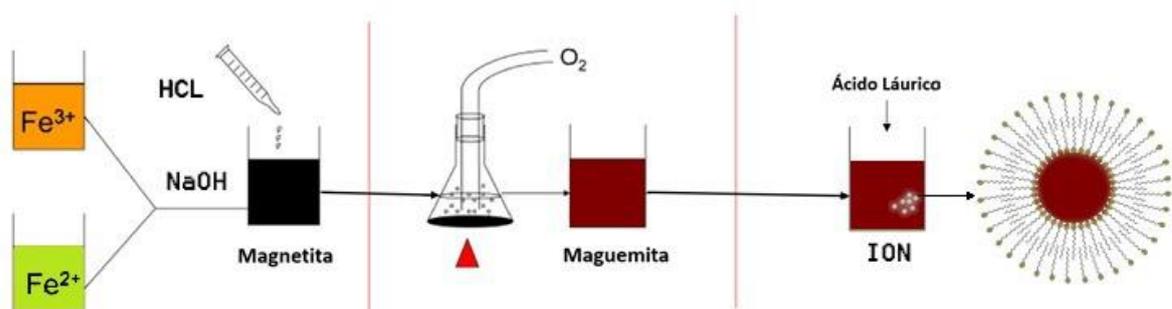


Figura 2.1 Processo de síntese das ION. Fonte: Ilustração da Autora.

As NPs de magnetita, foram sintetizadas por meio do método de coprecipitação em meio aquoso alcalino em proporções estequiométricas de 2:1 dos íons Fe^{3+} e Fe^{2+} . O $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (10,13 g; 0,037 mol) e $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (3,73 g; 0,019 mol) foram dissolvidos em uma solução de HCl (0,08 mol L^{-1} ; 125 mL) que foi lentamente gotejada em uma solução de NaOH (1,5 mol L^{-1} ; 125 mL), sob agitação constante (2000 rpm) à temperatura ambiente. Um precipitado preto magnético característico de magnetita formou-se instantaneamente devido ao processo de nucleação e crescimento simultâneo das NPs de magnetita. Após 30 minutos de agitação, o sobrenadante foi isolado com o auxílio de um ímã, lavado com água deionizada por 5 vezes e o pH ajustado para 7 com a adição de uma solução de HCl (2 mol L^{-1}). Uma alíquota do sólido nanoparticulado de magnetita foi separada para ser caracterizado, e a outra parte foi submetida ao processo de oxidação por borbulhamento de oxigênio (ALCÂNTARA, 2007; VIALI et al., 2010). Uma das alíquotas separadas das dispersões coloidais foi seca utilizando-se o SpeedVac Concentrator, SPD121P, com Refrigerated Vapor Trap, RVT400, Savant por 4 horas.

As NPs de maguemita foram obtidas a partir da oxidação das NPs de magnetita por borbulhamento de oxigênio em suspensão aquosa ácida (pH 3,5), ajustado com solução de HCl 2,0 mol L^{-1} (ALCÂNTARA, 2007; SOLER et al., 2007a; VIALI et al., 2010). A suspensão foi aquecida a 95 $^{\circ}\text{C}$, sob agitação constante por 3 horas, resultando na oxidação do Fe^{2+} para Fe^{3+} , havendo mudança na coloração de preto para marrom avermelhado. Após o resfriamento, a suspensão de NPs de maguemita foi centrifugada ($T = 4^{\circ}\text{C}$, 4.000 rpm, 20 minutos), lavada 5 vezes com água deionizada, e uma alíquota foi separada para a caracterização.

A funcionalização das maguemita com a bicamada de ácido láurico (BL) foi realizada com base no procedimento descrito na literatura com algumas modificações (FU; DRAVID; JOHNSON, 2001). Na primeira etapa, as NPs foram funcionalizadas com uma monocamada de laurato, e na segunda etapa, a bicamada foi formada após adição de mais uma alíquota do surfactante. O processo de funcionalização foi realizado com as NPs de maguemita suspensas em água deionizada, o pH foi ajustado para 8 e o sistema aquecido a 60 $^{\circ}\text{C}$ sob agitação magnética. Em seguida, adicionou-se 1g de ácido láurico, mantendo-se a agitação por 30 minutos. Ao término deste período, as NPs funcionalizadas passaram a ter caráter hidrofóbico, devido à presença da monocamada de laurato, havendo rápida sedimentação. Em seguida, as NPs foram lavadas com água deionizada para a remoção dos contra íons e do excesso de ácido láurico. Para confirmar a formação da monocamada uma alíquota das NPs foi dispersa em hexano, verificando-se a formação imediata de dispersão coloidal. Na segunda etapa foi empregado o mesmo procedimento, excetuando-se o ajuste do pH para 8. Adicionou-se mais 1g de ácido láurico, havendo a necessidade constante de ajuste do pH até que as NPs se

dispersassem completamente no meio aquoso, evidenciando assim a formação da bicamada de AL. Após estabilização do pH e peptização das NPs o sistema foi mantido nestas condições por 30 minutos. Após a dispersão, o coloide foi centrifugado ($T= 4^{\circ}\text{C}$, 4.000 rpm, 20 minutos) para a remoção de aglomerados que precipitaram durante a centrifugação, o sobrenadante foi coletado e dialisado em membrana semipermeável em água deionizada por 48 horas para remoção de contraíons e excesso de laurato. Após a diálise a suspensão foi retirada da membrana e o pH ajustado para 7,4. Esta plataforma, formada por nanopátículas de maguemita funcionalizadas com uma bicamada de ácido láurico, onde foram ancorados os fármacos foi denominada ION. Alíquotas do material foram separadas para caracterização.

2.3 Técnicas de Caracterização

A técnica de microscopia eletrônica de transmissão (MET) foi utilizada para a análise da morfologia das NPs e determinação do diâmetro médio (D_{MET}) e do índice de polidispersão (σ) das nanopátículas a partir de histogramas de tamanho obtidos das imagens MET adquiridas e ajustados com uma função de distribuição log-normal, conforme equação 2.1. Os diâmetros das NPs foram medidos com o auxílio do software ImageJ em diferentes micrografias para a construção dos histogramas.

$$f(x) = \frac{1}{\sqrt{2\pi}\sigma D} \exp\left(-\frac{[\ln(D)-(D_M)]^2}{2\sigma^2}\right) \quad (2.1)$$

Onde: D_{MET} é o diâmetro médio das NPs e σ é o índice de polidispersão. Os valores de D_{MET} e σ determinados.

O diâmetro hidrodinâmico (D_{H}) e a potencial zeta (ζ) foram estimados por meio de medidas de espalhamento dinâmico de luz e mobilidade eletroforese, respectivamente. O valor de D_{H} engloba a cobertura da NPs, bem como a sua interação com o meio, a camada de solvatação que se forma ao redor das NPs em suspensão aquosa. As análises foram realizadas no equipamento Zetasizer Nano ZS90 (Malvern Instruments, EUA), em amostras diluídas (1:10, mesmo dispersante e pH da amostra). Foram realizadas no mínimo três medidas de cada amostra (em triplicata) para determinar o D_{H} e potencial ζ das NPs (RAMOS, 2015).

A técnica de espectroscopia Raman é uma ferramenta para a investigação da composição química e das propriedades estruturais de materiais (KUMAR, 2012; SOLER; QU, 2012) e foi utilizada para o estudo do núcleo magnético das NPs produzidas identificando-se as fases magnetita e maguemita. Esta técnica tem sido empregada com sucesso para estudar a interação

de NPs coloidais com o meio (MORAIS et al., 2000b), a estabilidade do núcleo (SOLER et al., 2004; SOLER; QU, 2012), os efeitos da cobertura em NPs de óxido de ferro (SOLER et al., 2007a; SOLER; LIMA; NUNES, 2011), estudo de nanocompositos (LETTI et al., 2017; SOLER et al., 2004), a interação com o sangue (SANTANA et al., 2005; SOLER et al., 2007b) além de permitir a identificação inequívoca das fases de óxidos de ferro em sistemas nanoparticulados (LETTI et al., 2017; MORAIS et al., 2001, 2000b; NUNES et al., 2014; SOLER; QU, 2012; SOLER; LIMA; NUNES, 2011).

Considerando-se a magnetita, os cinco modos vibracionais Raman ativos previstos para esta estrutura são: A_{1g} caracterizado pelo estiramento simétrico dos átomos de oxigênio em relação aos átomos de ferro situados no sítio tetraédrico, E_g resultante da flexão simétrica desses átomos de oxigênio e três modos T_{2g} . O modo T_{2g} (1) caracterizado pelo movimento de translação dos átomos, o T_{2g} (2) devido ao estiramento assimétrico dos átomos de oxigênio e o T_{2g} (3) devido à flexão assimétrica dos átomos de oxigênio. Somente os sítios de simetria tetraédrica e os átomos de oxigênio contribuem efetivamente para o espectro Raman (SOLER; PATERNO, 2015).

Mesmo à temperatura ambiente a magnetita oxida facilmente, principalmente no caso de materiais nanoparticulados, mudando para a fase maguemita que mantém a estrutura cristalina do tipo espinélio invertida, entretanto os íons de Fe (II) do sítio octaédrico são oxidados para Fe (III) sendo esse o único cátion presente na maguemita. O espectro Raman da maguemita é caracterizado pela presença de estruturas largas e assimétricas situadas em 350 (T_{2g}), 500 (E_g) e 700 cm^{-1} (A_{1g}), em que a banda A_{1g} corresponde ao modo de estiramento dos átomos do sítio octaédrico (SOLER; PATERNO, 2015). Os espectros Raman das nanopartículas de óxido de ferro produzidas foram ajustados empregando-se funções lorentzianas, os modos vibracionais detectados foram comparados com os dados característicos das fases magnetita e maguemita (LETTI, 2013; LETTI et al., 2017; MIGUEL; RIVERA, 2013; MORAIS et al., 2001; NUNES et al., 2014; SOLER; QU, 2012; VIALI et al., 2010).

As fases do óxido de ferro produzidas foram analisadas em amostras sólidas por meio da técnica de espectroscopia Raman (SOLER; QU, 2012). Os espectros Raman foram adquiridos na configuração micro-Raman (objetiva com magnificação de 50x) utilizando-se o espectrômetro triplo Jobin Yvon Model T64000 (Horiba Scientific, Quioto, Japão), equipado com uma CCD, refrigerado com nitrogênio líquido. A excitação das amostras foi realizada com um laser de diodo com $\lambda = 532 \text{ nm}$ com intensidade de 0,30 mW, para evitar a degradação da amostra, na faixa de comprimento de onda de 200 a 800 cm^{-1} .

Amostras dos sólidos nanoparticulados produzidos foram investigadas por meio da técnica de espectroscopia no infravermelho, com o objetivo de investigar a presença da bicamada de AL na superfície das NPs. O material sólido foi misturado com KBr empregando-se as técnicas convencionais de preparação de pastilhas e os espectros de infravermelho obtidos no espectrômetro Vertex 70 (Bruker Corporation, USA) em modo de transmissão na região de 4000 a 400 cm^{-1} , com 8 *scans* e resolução de 4 cm^{-1} .

O teor de ferro das amostras sintetizadas foi obtido por meio da espectroscopia de absorção atômica (WELZ, 1999). Alíquotas das amostras foram digeridas em HNO_3 e analisadas no Laboratório de Análises Químicas da SED-Mineração do estado de Goiás.

A concentração de ferro [Fe] no nanocoloide foi determinada sendo igual a 6,85 g L^{-1} . A concentração de NPs por volume foi estimada (considerando-se o formato aproximadamente esférico das NPs) a partir do diâmetro médio (D_{MET}) obtido no histograma da MET, da concentração de [Fe] considerando-se que existem dois átomos de ferro Fe em uma molécula de Fe_2O_3 . O volume médio (V_{NPs}) e a área média superficial (A_{NPs}) foram obtidos do D_{MET} . A massa média (m_{NPs}) para uma NP foi estimada a partir de V_{NP} e da densidade da maguemita, considerada igual a 4,87 g cm^{-3} (CORNELL; SCHWERTMANN, 2003). A partir da m_{NPs} calculada e da concentração de [Fe] da dispersão coloidal ION foi estimada a concentração de NPs por mL (C_{NPs}).

As curvas termogravimétricas foram obtidas no equipamento Shimadzu modelo DTG-60. Amostras de ~ 5 mg foram pesadas em *pans* de platina e analisadas sob atmosfera de nitrogênio, vazão de 50 mL min^{-1} , a uma taxa de aquecimento de 10 $^{\circ}\text{C min}^{-1}$, com temperatura inicial de 25 $^{\circ}\text{C}$ e a final 1000 $^{\circ}\text{C}$.

As características magnéticas de óxidos de ferro nanoparticulados foram avaliadas por meio de medidas de magnetização em função do campo (curva $M \times H$). A curva $M \times H$ característica de óxidos de ferro nanoparticulados mostrou comportamento superparamagnético acima da temperatura de bloqueio (T_B), e histerese para temperaturas abaixo dela. Não se observa remanência (M_R) ou coercividade (H_C) na temperatura de 300 K e campo magnético aplicado na faixa ± 60 kOe. (SOLER; PATERNO, 2017). As curvas de magnetização foram obtidas em amostras secas utilizando- um magnetômetro de amostra vibrante (VSM). As medidas foram realizadas nas temperaturas de 5 e 300 K aplicando campos magnéticos na faixa ± 60 kOe.

2.4 Grau de revestimento orgânico das NPs

A estimativa do grau de revestimento orgânico das NPs foi realizada com base nos valores de perda de massa obtidos por meio das curvas de TG e dos diâmetros médios determinados por imagens de MET. A faixa de perda de massa foi obtida com o auxílio da primeira derivada da curva TG (DTG). Com base na faixa de temperatura de perda de massa foi possível estimar o número de espécies laurato por nanopartículas e o coeficiente de revestimento ou “grafting” (ξ) de espécies fisissorvidas e quimissorvidas (SHEN; LAIBINIS; HATTON, 1999; VIALI et al., 2010). O número de espécies laurato por nanopartículas foi calculado a partir da equação 2.2.

$$Lauratos/NP = \frac{P \times m_{NP}}{m_{LA} \times R} \quad (2.2)$$

Onde: LA / NP é o número de espécies lauratos por nanopartícula, P é a perda de massa de espécies LA quimissorvida ou fisissorviada obtida da curva TG, m_{NP} é a massa de uma nanopartículas (g) estimada usando a densidade de maguemita ($5,49 \text{ g cm}^{-3}$) e o D_{MET} o diâmetro das nanopartículas, m_{LA} é a massa da molécula LA (g) e R é a massa do resíduo final (Fe_2O_3) no final da análise TG. Ao calcular LA / NP. Os coeficientes de revestimento ou “grafting” (ξ) de espécies fisissorvidas e quimissorvidas por nanopartículas foram calculados a partir da equação 2.3.

$$\xi = \frac{LA/NP}{A_{média}} \quad (2.3)$$

Onde: LA / NP é o número de espécies laurato (quimissorvido ou fisissorvido) por nanopartícula e $A_{média}$ é a área de superfície das nanopartículas calculada a partir dos dados de MET (diâmetro das partículas).

2.5 Resultados e Discussão

2.5.1 Caracterização morfológica

A figura 2.2 (a) apresenta a imagem de MET das ION, na qual observa-se NPs com formato aproximadamente esférico e morfologia característica dos nanomateriais obtidos pelo método de coprecipitação (SOLER; PATERNO, 2015). O histograma apresentado na figura 2.2

(b) foi obtido a partir de várias micrografias de ION, nas quais os diâmetros de aproximadamente 900 nanopartículas foram mensurados. O ajuste dos dados do histograma foi feito considerando-se a função log-normal obtendo-se o diâmetro médio $D_{MET} = 7,7 \pm 0,05$ nm, e dispersão de tamanho $\sigma = 0,19 \pm 0,01$ nm.

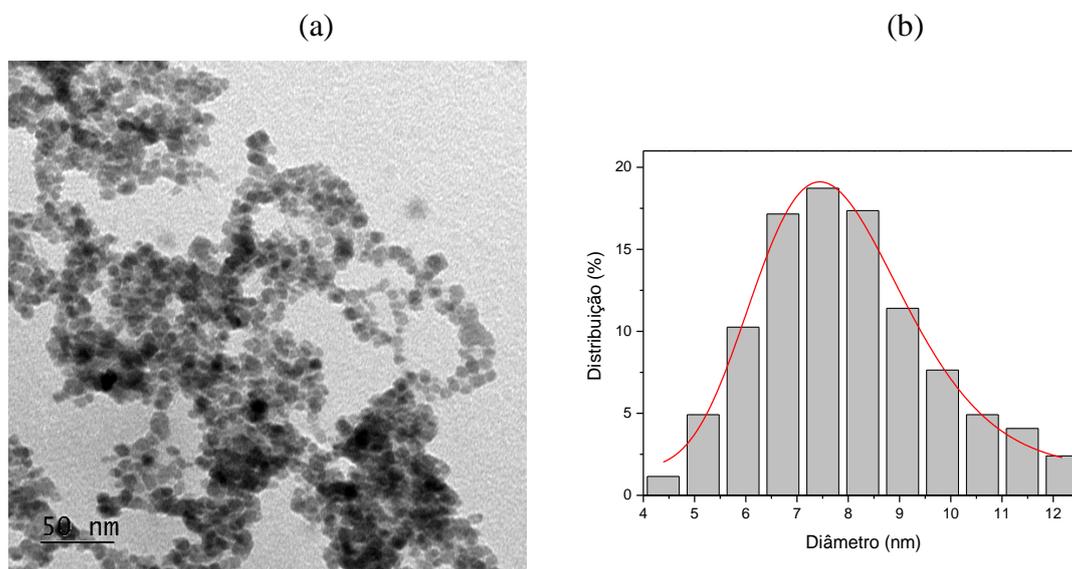


Figura 2.2 (a) Imagem de MET obtida da amostra ION. (b) Histograma de distribuição do diâmetro da amostra ION.

2.5.2 Estabilidade coloidal das ION funcionalizadas

A estabilidade coloidal das ION preparadas foi monitorada por meio dos parâmetros D_H , PDI, potencial zeta e o pH registrados em 0,1,3,7,15,30,60 e 90 dias após a síntese, para dois conjuntos de amostras armazenadas à temperatura ambiente (30 °C) e a 10 °C (geladeira). Os dados registrados para o primeiro dia e 90 dias estão listados na tabela 2.1. Não houve diferenças significativas ($p > 0,05$) nos valores dos parâmetros analisados para o período de 90 dias nas diferentes condições. A ION apresentou uma distribuição de tamanho monomodal e dimensões na ordem de nanômetros.

A dispersão coloidal ION apresentou densidade de carga negativa com potencial $\zeta = -35,5$ mV, que se deve aos grupos COO^- da segunda camada de AL em contato com o meio de dispersão (FREITAS et al., 2008; TOMBÁČZ et al., 2008), garantindo a estabilidade das ION. Neste caso, o mecanismo de dispersão eletroestérico resultante da adsorção de um surfactante na superfície das nanopartículas leva à estabilidade e homogeneidade das ION, ocorrendo dois fenômenos: a repulsão eletrostática e a estérica. O mecanismo de estabilização eletrostático resulta da repulsão eletrostática provocada pela carga negativa na superfície da nanopartículas. A estérica ocorre devido à proteção da superfície gerada pelas moléculas de AL adsorvidas na superfície das ION com afinidade pelo líquido carreador, impedindo a aproximação das mesmas

devido ao preenchimento do espaço ao redor delas, criando uma barreira estérica (SHAW, 1992). Os baixos valores de PDI encontrados mostram que a formulação é monodispersa e homogênea.

Tabela 2.1 Dados do estudo da estabilidade coloidal das ION registrada após 1 e 90 dias depois da síntese armazenadas a 10 e 30 °C.

Estabilidade	1 dia		90 dias	
	10 °C	30 °C	10 °C	30 °C
ION				
D_H (nm)	124,40 ± 0,70	122,63 ± 0,75	142,60 ± 1,73	131,87 ± 1,62
PDI	0,19 ± 0,001	0,19 ± 0,006	0,19 ± 0,008	0,19 ± 0,004
Zeta potential	-35,57 ± 0,30	-35,53 ± 0,66	-35,67 ± 0,47	-36,47 ± 0,38
pH	7,42 ± 0,09	7,43 ± 0,09	7,34 ± 0,06	7,34 ± 0,14

Diâmetro hidrodinâmico D_H (nm), potencial zeta ζ (mV), Índice de polidispersão PDI, potencial hidrogeniônico pH, Eficiência de Encapsulação (EE%). Dados apresentados: média ± desvio padrão.

2.5.3 Espectroscopia Raman

Os espectros Raman obtidos das amostras sólidas magnetita e maguemita são mostrados na figura 2.3 e figura 2.4, respectivamente. Os espectros foram adquiridos na faixa de 200 a 800 cm⁻¹, com a intensidade do laser igual a 0,25 Mw para evitar a degradação das amostras, (SOLER et al., 2004). A linha em vermelho corresponde ao ajuste gerado pelas funções lorentzianas, enquanto as bandas em azul correspondem aos modos vibracionais Raman previstos para a fase magnetita e as em verde correspondem aos previstos para a fase maguemita, que se encontram na tabela 2.2. Comparando-se os valores obtidos do ajuste (figura 2.3) e aqueles previstos pela teoria para o material *bulk* cristalino e de nanoparticulados disponíveis na literatura, pode-se associar as estruturas observadas no espectro aos seguintes modos vibracionais característicos da fase magnetita, 310 E_g, 497 T_{2g} (2), 537 T_{2g} (3) e 665 cm⁻¹ A_{1g}, indicando que no caso das nanopartículas de óxido de ferro sintetizadas prevaleceu a fase magnetita (HANESCH, 2009; JUBB; ALLEN, 2010; LEGODI; WAAL, 2006; LETTI, 2013; SOLER et al., 2004). Entretanto, é possível observar também modos atribuídos à fase maguemita, 362 (T_{2g}), 712 cm⁻¹ (A_{1g}), (LETTI, 2013; SOLER; QU, 2012) que podem ter sido induzidos pelo aumento de temperatura devido à incidência do laser. É importante destacar que no caso dos materiais nanoparticulados, o processo de oxidação da magnetita para maguemita ocorre mesmo sem ter sido induzido devido à alta reatividade da superfície das NPs, conferida pela razão superfície-volume.

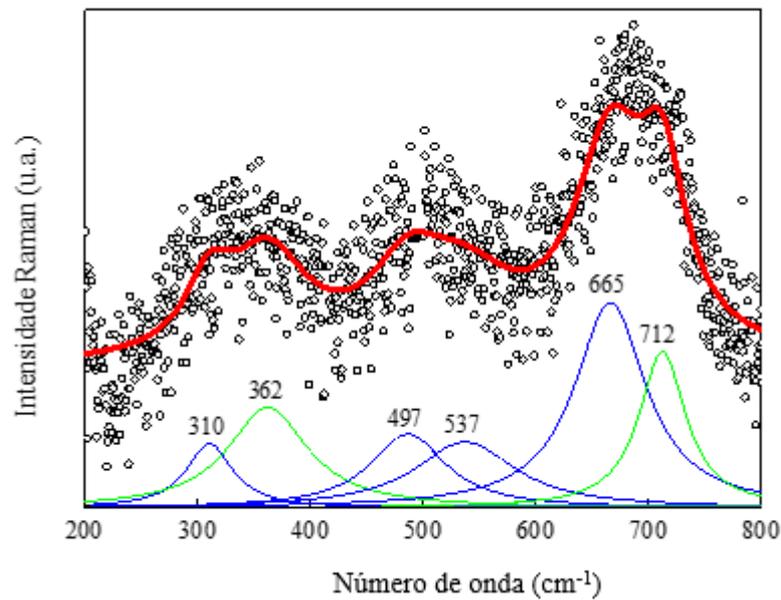


Figura 2.3 Espectro Raman obtido da amostra de magnetita sintetizada.

No espectro Raman das NPs de maguemita obtidas (Fig. 2.4) observa-se bandas largas Raman características da maguemita em 344 (T_{2g}), 501 (E_g), 695 cm^{-1} (A_{1g}), evidenciado que o processo de oxidação foi efetivo, conforme as bandas largas previstas para a maguemita em 350, 500 e 700 cm^{-1} (CHAMRITSKI; BURNS, 2005; JACINTHO et al., 2009; LEGODI; WAAL, 2006; LETTI, 2013).

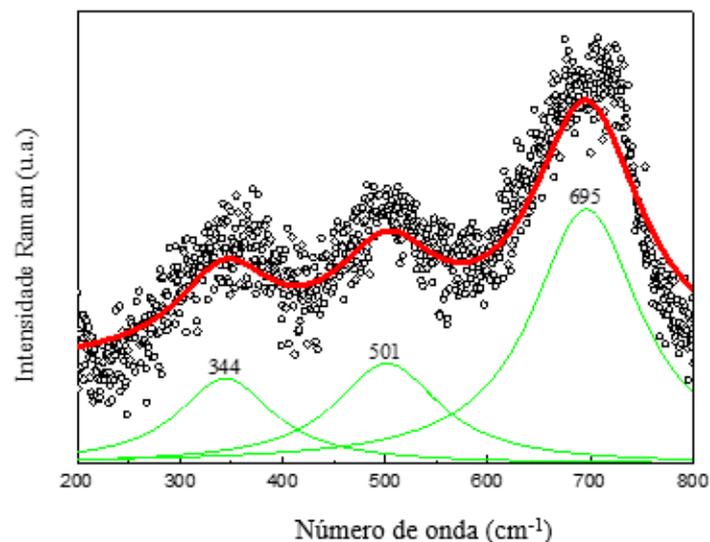


Figura 2.4 Espectro Raman obtido da amostra de maguemita sintetizada.

Tabela 2.2 Modos vibracionais Raman magnetita e maguemita e seus números de ondas (cm^{-1})

Banda	Magnetita	Maguemita
E_g	310	501
T_{2g}	497, 537	344
A_{1g}	665	695

2.5.4 Caracterização por espectroscopia na região do infravermelho

Os espectros obtidos por espectroscopia na região do infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) da amostra controle, AL puro, dos sólidos nanoparticulados de maguemita (MGM) e ION são apresentados na figura 2.5, de forma agrupada, para a melhor visualização e análise da presença da cobertura de ácido láurico em ION.

No espectro da amostra ION observa-se as vibrações da cadeia carbônica do ácido graxo em 2955, 2870 cm^{-1} do estiramento assimétrico $\nu_a(\text{C-H})$ e simétrico $\nu_s(\text{C-H})$ dos grupos CH_3 , como também do CH_2 em 2920 e 2850 cm^{-1} (HERRERA et al., 2015; OLIVEIRA et al., 2017). Observa-se ainda o desaparecimento da vibração em 1701 cm^{-1} , referente ao estiramento $\nu(\text{C=O})$ do AL livre; o surgimento de uma banda em 1710 cm^{-1} atribuída ao estiramento do grupo carboxila $\nu(\text{C=O})$ presente na segunda camada de AL (YANG et al., 2010); e mais duas bandas com novas frequências de vibração em 1624 e 1431 cm^{-1} , relativas aos estiramentos assimétrico $\nu_a(\text{COO}^-)$ e simétrico $\nu_s(\text{COO}^-)$ do grupo carboxilato, respectivamente, devido à ligação química formada entre o grupo carboxilato (COO^-) do laurato com os íons de ferro na superfície de MGM, indicam que houve a funcionalização da superfície das ION com o AL. A diferença ($\Delta\nu$), em número de onda, entre os valores de $\nu_a(\text{COO}^-)$ e $\nu_s(\text{COO}^-)$ das bandas de FTIR pode ser empregada para investigar o tipo de interação entre o carboxilato e o átomo do metal.

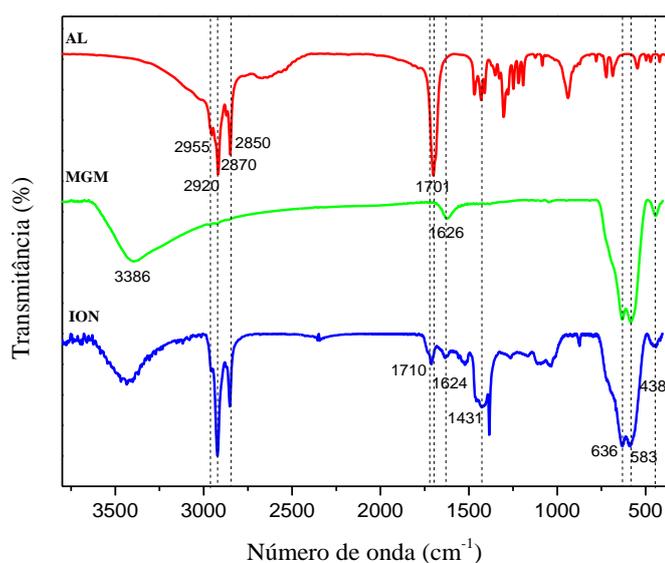


Figura 2.5 Espectro FTIR obtido das amostras ION, MGM e AL.

Neste estudo, obteve-se a diferença ($\Delta\nu = 193 \text{ cm}^{-1}$) indicando que os átomos de oxigênio dos grupos carboxilatos do laurato estão ligados à superfície das NPs, por meio de coordenação bidentada em ponte (ilustrada na figura 2.6). O resultado obtido está de acordo com o descrito na literatura para possíveis modos de coordenação do carboxilato com o íon metálico na superfície de NPs, figura 2.6 (DEACON, 1980; HERRERA et al., 2015; NAKAMOTO, 2008).

No espectro para MGM (figura 2.5) observa-se uma banda larga centrada em 3386 cm^{-1} e outra de intensidade média em 1626 cm^{-1} , atribuídas ao estiramento do grupo OH e moléculas de água na superfície das NPs, respectivamente. No mesmo espectro há também a presença das vibrações das ligações Fe-O em 636 , 583 e 438 cm^{-1} , que são atribuídos à fase maguemita (SOLER et al., 2007c). Todos os dados obtidos por FTIR estão na tabela 2.3.

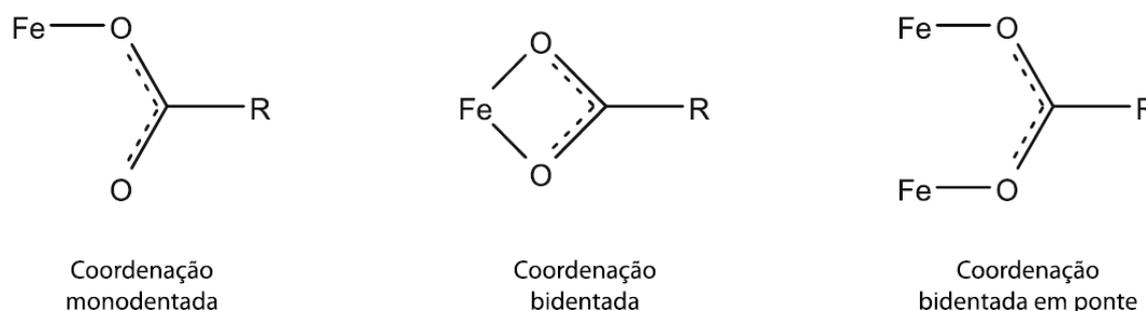


Figura 2.6 Esquema da coordenação do carboxilato com íons metálicos. No exemplo, o íon metálico (NAKAMOTO, 2008).

Tabela 2.3 Bandas FTIR observadas nas amostras AL, MGM e ION e seus números de ondas (cm^{-1}).

Banda	AL	MGM	ION
$\nu_a(\text{C-H}) \text{ CH}_3$	2955	-	2955
$\nu_s(\text{C-H}) \text{ CH}_3$	2870	-	2870
$\nu_a(\text{C-H}) \text{ CH}_2$	2920	-	2920
$\nu_s(\text{C-H}) \text{ CH}_2$	2850	-	2850
$\nu(\text{C=O})$	1701	-	1710
$\nu_a(\text{COO}^-)$	-	-	1624
$\nu_s(\text{COO}^-)$	-	-	1431
$\nu(\text{Fe-O})$	-	636, 583, 438	636, 583, 438
$\nu(\text{OH})$	-	3386, 1626	3386

2.5.5 Concentração de ferro [Fe] e de NPs em ION por AAS

Os resultados determinados dos valores de diâmetro médio (D_{MET}) e índice de polidispersão (σ), a concentração de ferro ($[\text{Fe}]$) na dispersão coloidal, a massa (m_{NPs}), o volume (V_{NPs}), a concentração (C_{NPs}) e área superficial (A_{NPs}) das nanopartículas por volume estão listados na tabela 2.4.

Tabela 2.4 Propriedades das ION.

ION	
D_{MET} (nm)	7,7 ± 0,05
σ	0,194 ± 0,010
[Fe] (µg mL⁻¹)	6,85
m_{NP} (g)	1,16 x 10 ⁻¹⁸
V_{NPs} cm³	2,39 x 10 ⁻¹⁹
A_{NP}	1,86 x 10 ⁻¹²
C_{NPs} (NPs/mL⁻¹)	8,47 x 10 ¹²

Os valores obtidos de D_{MET}, m_{NP}, V_{NP} estão próximos aos encontrados na literatura para NPs sintetizadas pelo método de coprecipitação química em meio alcalino dos íons Fe²⁺ e Fe³⁺ (OLIVEIRA et al., 2017; SOLER; PATERNO, 2017; VIALI et al., 2010). Entretanto as concentrações de [Fe] e C_{NPs} no nanocoloide estão abaixo do descrito na literatura por se tratar de um nanocarreador para aplicação tópica.

2.5.6 Análise termogravimétrica

A análise termogravimétrica foi realizada para obter informações sobre a quantidade de AL que reveste a nanopartícula de óxido de ferro de maguemita funcionalizadas com uma bicamada de ácido lárico (ION). A figura 2.7 mostra a curva termogravimétrica (linha cheia) obtida de ION com a sua derivada (DTG, linha pontilhada). As perdas percentuais de massa (Δm) nas faixas de temperaturas consideradas (ΔT) e os picos das derivadas das curvas TG (DTG) estão resumidos na tabela 2.5. Observa-se que as curvas de TG-DTG apresentam duas perdas de massa abaixo de 400 °C que correspondem à dessorção, decomposição e evaporação das moléculas de AL da superfície das NPs perfazendo Δm total de 20,3 %, numa faixa de temperatura de 25-1000 °C e DTG em 231,5 e 349,5 °C, confirmando a ocorrência de duas etapas de decomposição térmica parcialmente sobrepostas.

A primeira etapa ocorre em temperatura mais baixa (< 250 °C) e corresponde à perda de massa da segunda camada de AL na qual as moléculas então fracamente ligadas (adsorção física) à superfície das NPs, com Δm igual a 11,7%. A segunda etapa ocorre a uma temperatura

mais alta (> 250 °C) devido à ligação química do grupo carboxilato aos íons de ferro que formam a primeira camada de laurato na superfície das NPs com Δm de 8,6%.

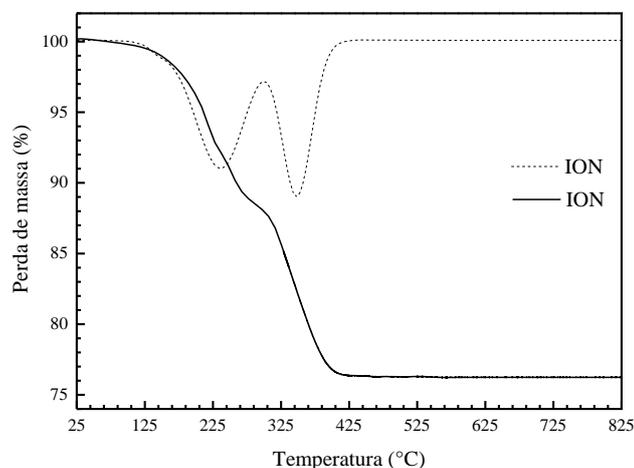


Figura 2.7 Curva termogravimétrica (linha cheia) e DTG (linha pontilhada) obtidas das ION.

A razão entre as massas de LA e de γ -Fe₂O₃ foi de 0,15 e 0,11 g/g, respectivamente. A maioria dos trabalhos que utilizam bicamada de ácidos graxos para recobrir NPs de óxidos de ferro apresentam comportamento térmico semelhante (DELOUISE, 2012; FU; DRAVID; JOHNSON, 2001; HERRERA et al., 2015; LENIN; JOY, 2016; OLIVEIRA et al., 2017; SHEN; LAIBINIS; HATTON, 1999; VIALI et al., 2010).

Tabela 2.5 Valores das perdas de massa (Δm) totais obtidos na faixa de temperatura considerada (ΔT) e picos das derivadas das curvas termogravimétricas (DTG).

Amostras	Δm (°C)	ΔT (°C)	DTG (°C)
ION	20,3	25 - 1000 °C	231,5 / 349,5

2.5.7 Grau de revestimento das ION

O grau de revestimento das ION, as quantidades de espécies fisiossorvidas e quimiossorvidas determinados estão apresentados na tabela 2.6. A estimativa foi realizada considerando-se que a porcentagem de perda de massa a partir de uma dada temperatura refere-se à decomposição completa de espécies laurato e que o resíduo é somente óxido de ferro de estequiometria Fe₂O₃. A partir dos dados da massa de laurato, calculou-se o número de espécies laurato utilizando-se o valor de massa molar do laurato (199,32 g mol⁻¹) e o constante de Avogrado (6.022 × 10²³). De forma análoga, estimou-se o número de partículas de maguemita dividindo-se a massa do resíduo pela massa de uma única partícula de maguemita. Nessa estimativa, considerou-se que as nanopartículas são esféricas. Ao se dividir o número de

espécies laurato pelo número de nanopartículas obtém-se o número de espécies laurato por nanopartícula. Ao se dividir este último valor pela área média da superfície de uma nanopartícula é possível obter o coeficiente de revestimento das nanopartículas em espécies laurato por nm^2 . Os resultados obtidos estão em acordo com os descritos na literatura (VIALI et al., 2010).

Tabela 2.6 Coeficiente de revestimento (ξ) das nanopartículas funcionalizadas com ácido láurico.

Amostra	(ξ)		AL nm^{-2}
	ξ_F	ξ_Q	ξ_t
ION	2,8	2,0	4,8

ξ_P e ξ_C são os coeficientes de revestimento do tipo fisissorvido e quimissorvido, respectivamente; $\xi_t = \xi_F + \xi_Q$

2.5.8 Propriedades magnéticas das NPs de MGM sintetizadas

A figura 2.8 mostra as curvas de magnetização das nanopartículas γ - Fe_2O_3 sintetizadas, em função do campo (curvas $M \times H$) nas temperaturas de 5 e 300 K com a aplicação de campo magnético na faixa ± 60 kOe. A magnetização de saturação obtida para 5 e 300 K foi de 74 emu/g e 63 emu/g, respectivamente. A alta magnetização de saturação de NPs de maguemita está em acordo com dados relatada na literatura (CAO et al., 2016; LONG et al., 2017; RAMOS GUIVAR et al., 2017; RASHDAN; BOUODINA; AL-SAIE, 2013; VIALI et al., 2010), sendo próximas às obtidas em outros estudos (OLIVEIRA et al., 2017). Os valores de M_s obtidos são menores do que os valores de M_s típicos para a maguemita “bulk” situados na faixa de 85 emu/g a 4 K. Esse resultado é esperado uma vez que ocorre uma diminuição no valor de M_s para nanopartículas em relação ao bulk devido ao alinhamento dos spins nas NPs (GUBIN, 2009).

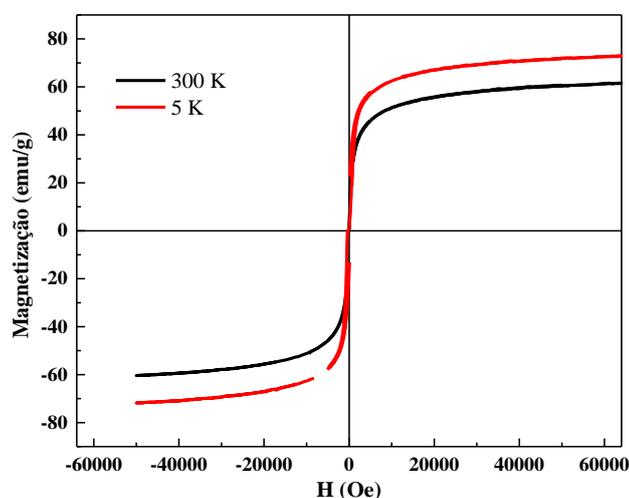


Figura 2.8 Curva $M \times H$ da amostra NPs de maguemita obtidas a 5 e 300K, conforme indicação.

CAPÍTULO 3

QUANTIFICAÇÃO DE NPS DE MAGUEMITA NAS CAMADAS DA PELE POR MEIO DA ESPECTROSCOPIA DE RESSONÂNCIA FERROMAGNÉTICA

3.1 Introdução

A quantificação precisa de nanopartículas de óxidos de ferro, seja *in vitro* ou *in vivo*, é necessária para determinar suas concentrações em diferentes meios e avaliar sua biodistribuição e toxicidade, bem como sua entrega direcionada. Atualmente, existem várias técnicas analíticas para a quantificação de nanopartículas de óxidos de ferro. As mais utilizadas são os métodos químicos, como a técnica de plasma acoplado induzido (ICP-MS: espectrometria de massa ou ICP-OES: espectrometria de emissão ótica) (BROMBERG; RADUYK; HATTON, 2009; CRAYTON et al., 2012; JAIN et al., 2008). Em adição, os métodos espectroscópicos com base na detecção de fluorescência, requerem que as ION sejam marcadas com sondas fluorescentes (LEE et al., 2010a; PLASSAT et al., 2007). Enquanto a técnica que emprega, a análise de produtos químicos reativos coloridos como o azul da Prússia (AP) é usada para localização de ION (CHANG et al., 2012) e para obter a concentração usando espectrofotometria UV-visível (BASAVIAH; CHANDRASHEKAR; PRAMEELA, 2003; BOUTRY et al., 2009).

As técnicas de ICP-OES ou AP podem quantificar o conteúdo de ferro em amostras e tecidos, mas requerem a digestão preliminar dos ION em suas formas iônicas (Fe II e Fe III) por um período de 24 horas para detectar sua concentração baseada na comparação com curvas de calibração de ferro (BEAUCHEMIN, 2006; BOUTRY et al., 2009; COLE et al., 2011; DADASHZADEH et al., 2013). O limite de detecção de ICP-OES é de aproximadamente 0,1 ppm ($0,1 \mu\text{g Fe mL}^{-1}$) (DADASHZADEH et al., 2013) e pelo menos 5 ppm para o método AP (BOUTRY et al., 2009). Além disso, eles não permitem distinção entre ferro elementar de nanopartículas magnéticas dissolvidas e ferro endógeno encontrado nos tecidos e fluidos corporais na forma de complexos de proteína de ferro, isto é, na transferrina do fígado, ferritina ou hemoglobina (GUTIÉRREZ et al., 2015; RUIZ et al., 2013; ZHUANG et al., 2012).

As ION apresentam propriedades superparamagnéticas específicas (CORCHERO; VILLAVARDE, 2009) e podem, portanto, ser detectadas por imagens de ressonância magnética ou por meio de métodos de relaxometria de ressonância magnética (JIN; CHALMERS;

ZBOROWSKI, 2012; MANDEVILLE et al., 1997; VAN BEERS et al., 2001). As medidas de susceptibilidade magnética não requerem modificação preliminar das amostras, o tempo de medição é muito curto (menor do que 1 minuto) e reprodutível (MAURIZI et al., 2014), podendo-se avaliar a biodistribuição de ION (JAIN et al., 2008; MEJÍAS et al., 2013; ROJAS et al., 2017) e a captação celular (JIN; CHALMERS; ZBOROWSKI, 2012; STRÖM et al., 2004). A mínima concentração de Fe detectada por susceptibilidade magnética foi de 1,2 ppm (1,2 mg Fe mL⁻¹), porém a técnica, é influenciada pelo ferro endógeno apenas a uma concentração próxima a 3000 ppm (3000 mg Fe mL⁻¹) (GUO et al., 2010). A precisão do método de susceptibilidade magnética foi avaliada sendo de 2 ppm (2 µg Fe mL⁻¹), igual à da técnica AP e inferior a precisão do método ICP de 0,1 ppm (0,1 µg Fe mL⁻¹). No entanto, nas análises por susceptibilidade magnética as amostras não são diluídas e podem ser medidas sem passar por processos destrutivos de digestão química como ocorrem para os métodos AP e ICP, sendo considerada mais vantajosa do que para a quantificação de nanopartículas magnéticas e obtenção da biodistribuição, tanto suspensões, órgãos e fluidos biológicos (MAURIZI et al., 2014).

A técnica de ressonância ferromagnética, do inglês *ferromagnetic resonance* (FMR), é uma técnica muito sensível, não destrutiva (YALN, 2013), e tem sido empregada para estudar nanopartículas de óxidos de ferro dispersas formando fluidos magnéticos (LACAVA et al., 2002; MORAIS et al., 1996, 2000a; MORAIS; LARA; TOURINHO, 1996; MORAIS; LARA; NETO, 1987).

Neste estudo, a espectroscopia de ressonância ferromagnética (RFM) foi utilizada para quantificar ION (maguemita γ -Fe₂O₃) nos nanocoloides desenvolvidos e em material biológico, particularmente as diversas camadas da pele. Inicialmente, foram obtidas curvas de calibração foram produzidas relacionando o sinal FMR com as concentrações de NPs e de ferro [Fe] para uma ampla faixa de concentrações de ION. A quantificação de ION em diluições do nanocoloide sintetizado e na pele pós permeação cutânea também foram realizadas e o nível mínimo de detecção foi determinado. Para avaliar a eficiência da RFM, os resultados foram comparados com os encontrados na literatura para as técnicas do Azul da Prússia e do Plasma Acoplado Induzido. Os resultados indicaram que a RFM é um método preciso e rápido para detectar ION (ferro presente nas nanopartículas) nos meios estudados sem qualquer influência do ferro das amostras biológicas.

3.2 Métodos

3.2.1 Ressonância Ferromagnética

A técnica de ressonância ferromagnética, do inglês *ferromagnetic resonance* (FMR), foi empregada para investigar a biodistribuição das ION nas camadas da pele. O sinal de ressonância ferromagnética é observado quando uma amostra de material ferromagnético é submetida a um campo de micro-ondas com frequência igual à frequência de precessão dos momentos magnéticos. A figura 3.1 mostra o diagrama com os componentes principais do espectrômetro utilizado (YALN, 2013). Esses componentes são a ponte de micro-ondas, a cavidade ressonante, o eletroímã e o console, que serão discutidos a seguir (WERBER, 2011). A ponte de micro-ondas abriga o gerador de micro-ondas (diodo Gunn), o atenuador - responsável pelo controle da potência da micro-onda irradiada na amostra, o circulador - que impede que a micro-onda refletida retorne à fonte de micro-ondas, e o detector (diodo Schottky) da micro-onda refletida da cavidade. A cavidade ressonante recebe a radiação de micro-onda por meio de guias de onda, e no seu interior é produzido um modo estacionário dessa radiação, uma vez que suas paredes internas metálicas formam nós da componente elétrica da micro-onda.

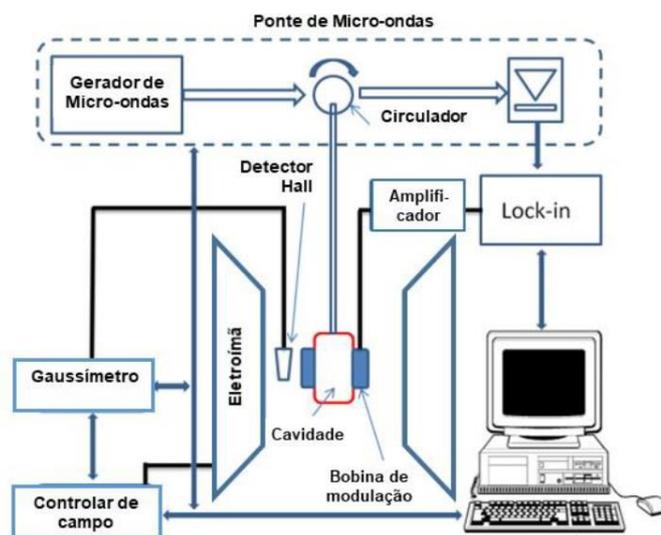


Figura 3.1 Principais componentes do espectrômetro de ressonância ferromagnética. Figura modificada de (YALN, 2013).

Dessa forma no centro da cavidade, onde é posicionada a amostra, há o máximo da componente magnética e o mínimo da componente elétrica da radiação de micro-ondas. O eletroímã produz um campo magnético estável e uniforme, com bom controle e precisão. A magnitude do campo elétrico é medida por um sensor de efeito Hall. O eletroímã possibilita a

varredura do campo magnético enquanto a potência da onda refletida pela cavidade ressonante é monitorada. Quando a condição de ressonância é atingida há um aumento da absorção de radiação pela amostra.

O console contém os processadores de sinal e os controles eletrônicos. Para melhorar a sensibilidade do espectrômetro, o processamento de sinal é feito usando-se um amplificador Lock-in. O funcionamento do esquema de detecção do sinal RFM pode ser descrito como: O campo magnético sentido pela amostra, é modulado de forma senoidal de acordo com a frequência de modulação. Se houver absorção de radiação pela amostra (um sinal RFM), a modulação do campo varre rapidamente a parte do sinal e as micro-ondas refletidas a partir da cavidade são moduladas em amplitude na mesma frequência. Para um sinal FMR que é aproximadamente linear em um intervalo tão grande quanto a amplitude de modulação, o sinal RFM é transformado em uma onda senoidal com uma amplitude proporcional à inclinação do sinal. O canal de sinal (mais conhecido como amplificador de bloqueio ou detector sensível à fase - Lock In) produz um sinal DC proporcional à amplitude do sinal FMR modulado. Ele compara o sinal modulado com um sinal de referência com a mesma frequência que a modulação de campo e é sensível apenas a sinais que tenham a mesma frequência e fase que a modulação de campo. Quaisquer sinais que não satisfaçam esses requisitos (ou seja, ruído e interferência elétrica) são suprimidos.

3.2.2 Validação de metodologia analítica para quantificação de ION por RFM

Os espectros de RFM foram obtidos no equipamento Bruker, modelo EMX Plus (Bruker, Alemanha). A frequência de micro-ondas utilizada foi a Banda X, a cavidade ressonante usada foi a do modelo ER4102ST, campo de modulação de 100 kHz, potência de micro-onda de 2 mW, campo de varredura de 10 gauss. Testes foram realizados para saber qual seria a varredura mais rápida possível, sem a deformação do espectro e o tempo de varredura estabelecido foi de 50 s.

Para obter uma curva de calibração da intensidade do sinal de RFM em função da concentração de NPs de óxido de ferro (ou de ferro) foram preparadas 6 diluições do nanocoloide estoque de ION em triplicatas e 600 µL de cada foram transferidos para seringas de 1mL. O conteúdo foi congelado em nitrogênio líquido e posteriormente injetado no suporte *Finger Dewar* de quartzo – Noxygen (Alemanha). As curvas de calibração foram obtidas relacionando as amplitudes do sinal FMR obtidas pelo equipamento e a concentração de NPs

em ION ($C_{NPs} = 8,47 \times 10^{12}$) ou a concentração [Fe] em ION determinadas por absorção atômica $6,85 \mu\text{g mL}^{-1}$, conforme foi detalhado no capítulo 2. A análise estatística dos dados foi obtida pelo método de regressão linear, considerando-se o coeficiente de correlação linear (r) mínimo aceitável de 0,99 (ICH, 2005).

3.3 Permeação cutânea *in vitro* do coloide ION

Os experimentos de permeação *in vitro* foram realizados utilizando o método Saarbrücken modificado (ANGELO et al., 2016a) em peles de orelha de suínos, adquiridas de um frigorífico local e imediatamente levadas ao laboratório para que fossem limpas, preparadas e armazenadas. As orelhas inteiras foram limpas com água destilada, a pele da parte externa da orelha foi extraída, o tecido subcutâneo removido e as peles cortadas em círculos que foram congelados a $-4 \text{ }^\circ\text{C}$, conforme as imagens apresentadas na figura 3.2.

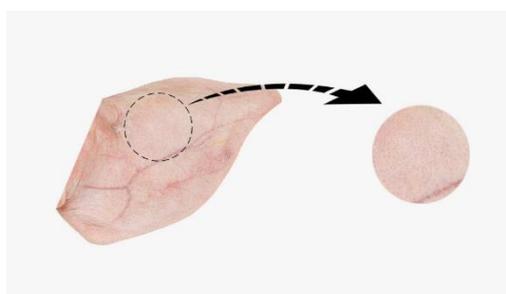


Figura 3.2 Imagem típica de orelha de suíno inteira e da amostra da pele utilizada nos experimentos de permeação *in vitro*. Ilustração da Autora.

Para a realização dos experimentos de permeação, as peles foram fixadas em um suporte sobre cavidades preenchidas com papel filtro embebido com 2 mL de tampão fosfato ($0,1 \text{ mol L}^{-1}$, pH 7,4) para manter a hidratação da pele durante o experimento, cuja imagem é mostrada na figura 3.3.



Figura 3.3 Imagem das amostras dispostas nos suportes para a realização do experimento de permeação *in vitro* utilizando o método Saarbrücken modificado. Ilustração da Autora.

Para a realização do experimento de permeação *in vitro* utilizando o método Saarbrücken modificado foram utilizados compartimentos doadores de células de Franz modificadas com

área de difusão de $5,72 \text{ cm}^2$, os quais foram preenchidos com 1,5 mL de ION ou formulação contendo a FIN ou a DT e mantidos por períodos de 12 e de 24 horas para a permeação. Ao final do experimento, as peles foram retiradas do suporte, o excesso de dispersão foi removido com água e papel absorvente.

3.4 Técnica do *tape stripping* diferencial

Após as permeações, as camadas da pele estrato córneo (EC), folículo piloso (FP) e pele remanescente (PR) foram extraídas de cada disco de pele por meio da técnica do *tape stripping* diferencial (TEICHMANN et al., 2005) com o auxílio de fitas adesivas, conforme a ilustração apresentada na figura 3.4. O EC foi removido utilizando-se 10 fitas, em movimentos a favor do crescimento do pelo, figura 3.4 (a, b). Em seguida, o FP foi removido empregando-se 2 fitas. Para cada fita, 2 gotas de cola de cianoacrilato foram colocadas sobre a pele e a fita adesiva posicionada sobre as gotas, pressionada por 1 minuto até estar completamente seca e removida em um único movimento contrário ao crescimento do pelo, ver figura 3.4 (c, d) e da camada de pele restante corresponde à pele remanescente (PR), foi retirado um retângulo no centro, figura 3.4 e.

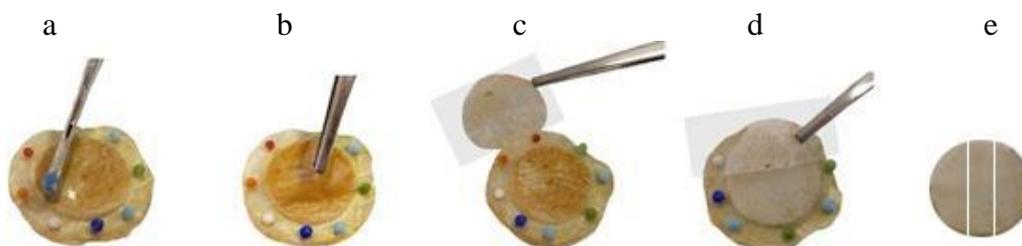


Figura 3.4 etapas de extração das camadas de pele por meio da técnica de *tape stripping* diferencial. Ilustração da autora.

3.5 Preparação das amostras para a quantificação de IONs nas camadas da pele por RFM

Foi desenvolvido um protocolo para preparação das amostras para obtenção das medidas de FMR. Devido à sensibilidade do equipamento e o tamanho reduzido da cavidade de ressonância onde a amostra é colocada para análise, foi selecionada uma região retangular com área de $0,1215 \text{ cm}^2$ da área central dos discos de cada camada de pele EC, FP e da pele PR, conforme a ilustração apresentada na figura 3.5. Em seguida as fitas retangulares de EC e FP e a PR foram inseridas em seringas de 1mL, as quais foram preenchidas com $600 \mu\text{L}$ de água destilada e congeladas em nitrogênio líquido para a análise.

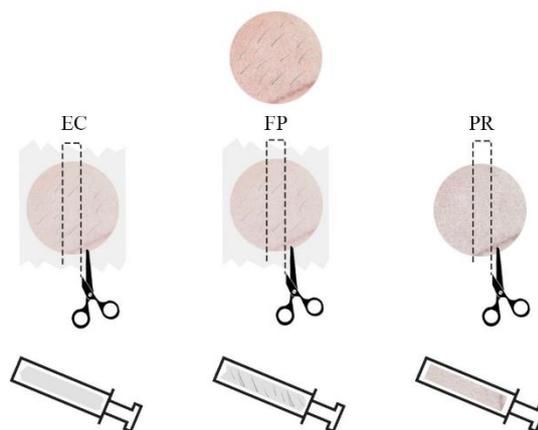


Figura 3.5 Preparo das amostras para as varreduras. Ilustração da autora.

3.6 Resultados e Discussão

A figura 3.6 mostra os espectros do sinal RFM obtidos das amostras de ION com diferentes diluições em função da concentração de IONs na faixa de $1,69 \times 10^9$ a $1,69 \times 10^{11}$ NPs mL⁻¹.

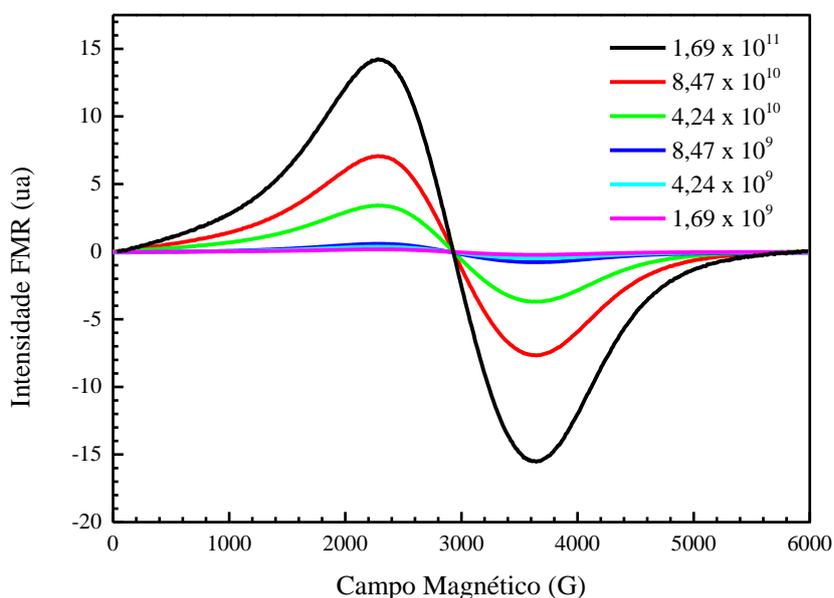


Figura 3.6 Intensidade do sinal de FMR em função do campo magnético para diferentes concentrações de ION, conforme indicado.

As figuras 3.7 e 3.8 mostram as curvas de calibração obtidas relacionando o sinal FMR e a concentração de NPs em ION (ou concentração [Fe] em ION), considerando a concentração total de Fe no nanocoloide

determinada por absorção atômica $6,85 \mu\text{g mL}^{-1}$, respectivamente. A faixa de concentração utilizadas para NPs foram entre $1,69 \times 10^9$ a $1,69 \times 10^{11}$ NPs mL^{-1} e [Fe] de $0,0014 - 0,137 \mu\text{g mL}^{-1}$.

A análise da regressão linear nas faixas de concentrações avaliadas confirmou a linearidade da curva apresentando coeficiente de correlação linear ($r = 0,9998$). Portanto, o método para calibração da amplitude do sinal RFM em função da concentração de NPs ou [Fe] tem comportamento linear, de modo que obteve-se todos os parâmetros indicados pelos protocolos internacionais para a validação de métodos analíticos (ICH, 2005).

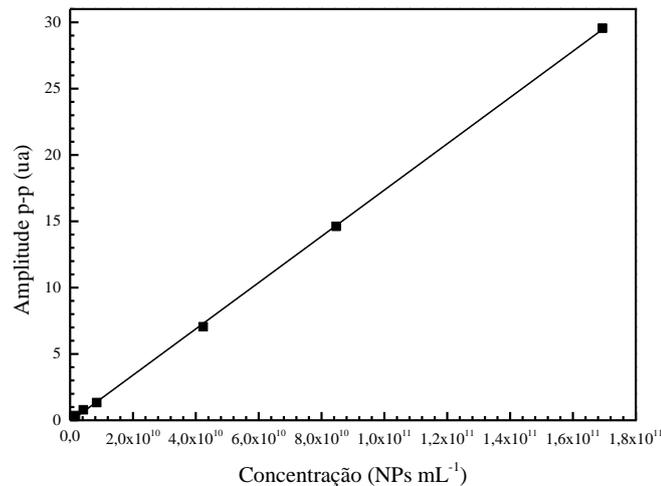


Figura 3.7 Curva de calibração da amplitude do sinal RFM em função da concentração de IONs. Equação da reta: $y = 1,74 \times 10^{-10} x - 0,08694$; $r = 0,9998$; $n = 3$.

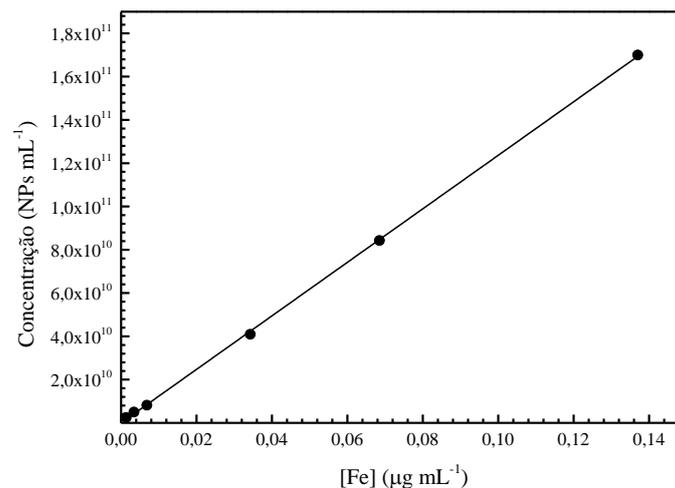


Figura 3.8 Curva de calibração da amplitude do sinal RFM em função da concentração [Fe]. Equação da reta: $y = 1,23 \times 10^{12} x - 243877$; $r = 0,9998$; $n = 3$.

A figura 3.9 apresenta os espectros da intensidade do sinal RFM obtido de IONs retidas nas diferentes camadas da pele: estrato córneo (EC), folículo piloso (FP) e pele remanescente (PR) após permeação cutânea.

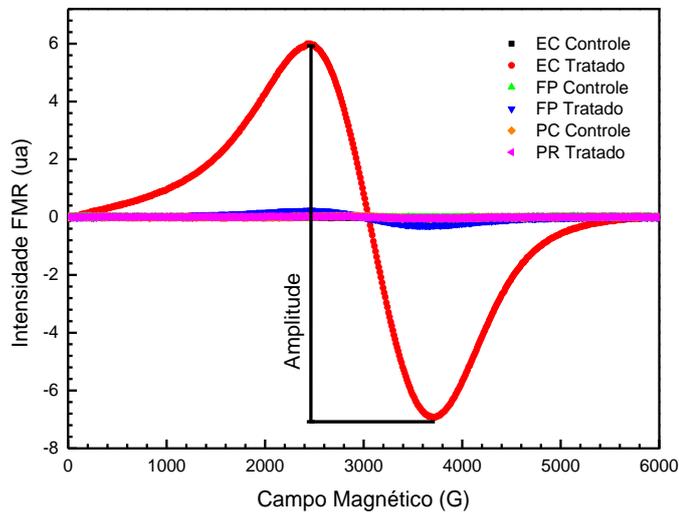


Figura 3.9 Espectros do sinal RFM em função do campo magnético, obtidos de ION retidas no estrato córneo, folículo piloso e pele remanescente após 12 horas de permeação, conforme indicação.

A figura 3.10 apresenta somente os espectros do sinal RFM obtido de ION retidas no folículo piloso (FP) e pele remanescente (PR) após permeação cutânea, apresentados na figura 3.9. Controles negativos foram utilizados de peles sem ION, que não possuem sinal RFM.

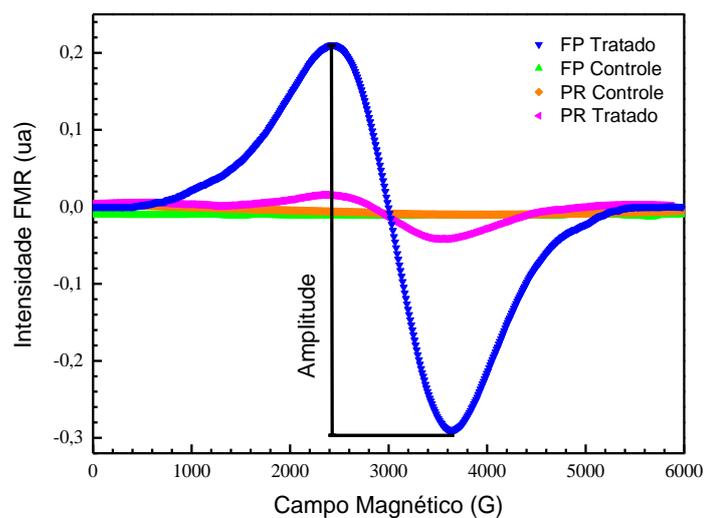


Figura 3.10 Espectros do sinal RFM em função do campo magnético obtidos de ION retidas no folículo piloso e pele remanescente após 12 horas de permeação.

A detecção mínima de NPs e a concentração de [Fe] presentes nas camadas da pele foi inferior aos valores mínimos detectados por ICP e AP encontrados na literatura, sendo de $8,98 \times 10^{08}$ NPs mL⁻¹ o que corresponde a $0,00073 \mu\text{g mL}^{-1}$ (0,00073 ppm). Os resultados obtidos indicam que a técnica de ressonância ferromagnética, é um método ainda mais efetivo e preciso na quantificação de NPs e de Fe do que outros métodos tais como o que emprega a suscetibilidade magnética. Na tabela 3.1 são listadas algumas características dos métodos AP, ICP, MSM e a técnica RFM empregada.

Tabela 3.1 Características dos métodos AP, ICP, MSM e RFM

Diferença entre os métodos AP, ICP, MSM	AP	ICP	MSM	RFM
Digestão da amostra	sim	sim	não	não
Amostra pode ser utilizada em outras análises	não	não	sim	sim
Sensibilidade para o ferro endógeno	sim	sim	não	não
Precisa de amostras controle	sim	sim	não	não
Detecção mínima em material biológico (ppm)	2	0,1	2	0,00073

Em relação à preparação de amostras, a digestão de órgãos ou suspensões necessárias para os métodos AP e ICP geralmente levam 24 horas enquanto as medidas por RFM podem ser realizadas imediatamente após a coleta das amostras. Portanto, a técnica RFM é um método mais robusto, em comparação com os métodos comumente utilizados, uma vez que é mais simples, reprodutível e rápida, não sendo necessário controles, pois os valores de RFM são apenas influenciados pelo ferro das partículas magnéticas e não pelo ferro endógeno.

Na literatura não há relatos sobre a aplicação tópica de ION visando o tratamento de doenças associadas aos folículos pilosos, como a alopecia, enfatizando a sua distribuição e quantificação nas camadas da pele. Os resultados obtidos acrescentam novas informações sobre a distribuição passiva de NPs de óxido de ferro nas camadas da pele utilizando a técnica de decapagem diferencial e a sua quantificação em espectrômetro de ressonância ferromagnética. Os resultados das permeações 12 e 24 horas serão apresentados na íntegra no capítulo 6.

CAPÍTULO 4

QUANTIFICAÇÃO DOS FÁRMACOS FINASTERIDA E DUTASTERIDA NAS CAMADAS DA PELE

Neste capítulo será apresentado o desenvolvimento dos métodos analíticos cromatográficos simples e seletivo para a quantificação dos fármacos finasterida e de dutasterida. Os dados referentes à validação dos métodos foram empregados na realização dos experimentos subsequentes de avaliação da permeação das nanoformulações sintetizadas por meio da quantificação dos fármacos nas diferentes camadas da pele.

4.1 Materiais e Métodos

Os fármacos finasterida e dutasterida (pureza > 98,0%) foram adquiridas da Purifarma (Anápolis, Brasil). Acetonitrila e metanol grau HPLC foram adquiridos da J.T Barker (Phitisburg, USA) e Ácido fosfórico da Sigma-Aldrich (Steinheim, Alemanha).

4.2 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)

A quantificação da FIN e da DT foi realizada com o auxílio do Cromatógrafo Líquido de Alta Eficiência (CLAE) modelo Shimadzu, composto por bombas modelo LC-20AT, injetor automático modelo SIL-20ACHT, degaseificador DGU-20A3R, unidade controladora modelo CBM-20A, forno modelo CTO-20^a, detector de UV modelo SPD-M20A e coluna de fase reversa C18 (15 mm x 4,6 mm, 3µm de diâmetro, Discovery Supelco). O software utilizado para as análises foi o programa de análise cromatográfica LC Solution Shimadzu.

4.3 Determinação dos comprimentos de onda de absorção máxima dos fármacos

A determinação dos comprimentos de onda de absorção máxima dos fármacos foi realizada por meio de varreduras de soluções de FIN ou DT em metanol com concentrações iguais a 100 µg/mL no espectrofotômetro de UV/Vis (Shimadzu, UV 1800). na faixa de comprimento de onda entre 200 e 700 nm. Os comprimentos de onda de máxima absorção no UV/Vis foram selecionados para análise da FIN ou DT por CLAE.

4.4 Métodos e condições analíticas para quantificação de FIN ou DT por CLAE

O desenvolvimento do método padronizado para a FIN, foi realizado considerando-se a fase móvel composta por uma mistura de Acetonitrila: água acidificada com ácido fosfórico 0,01M (40:60, v/v) e a detecção foi realizada em 215 nm e vazão de 1mL/min. No caso do método padronizado para a DT a fase móvel foi composta por uma mistura de Acetonitrila: Água acidificada com ácido fosfórico 0,01M (62:38, v/v) e a detecção realizada em 280 nm, a vazão de 0,8 mL/min. O volume de injeção das amostras nos dois métodos foi igual a 20 µL e o forno mantido à temperatura de 40 °C.

4.5 Validação dos métodos analíticos para quantificação de FIN ou DT

Os métodos padronizados foram validados em termos de linearidade, precisão, exatidão, especificidade/seletividade e limite de quantificação, segundo a legislação vigente (ANVISA, 2003; ICH, 2005).

4.5.1 Especificidade/Seletividade

A seletividade/especificidade dos métodos representa a sua capacidade em dosar uma determinada substância mesmo na presença de interferentes (ANVISA, 2003). Sendo assim, injetou-se no CLAE amostras dos fármacos em metanol e no meio (60 água/0,5 tween 80/40 EG -etilenoglicol) na concentração de 7,5 µg/mL na ausência e presença de cada extrato de pele (EC, FP e PR) e das ION para garantir que os interferentes da pele da orelha de suínos e os componentes das ION não interferissem na quantificação dos fármacos. Todos os ensaios foram realizados em sextuplicadas independentes e os resultados analisados considerando-se a área dos picos obtidos e o tempo de retenção de cada fármaco.

4.5.2 Linearidade

Três curvas de calibração na faixa de concentração dos fármacos entre 0,5 e 15 µg/mL foram construídas a partir de três soluções estoque de FIN ou DT (50 µg/mL). A linearidade foi avaliada a partir da regressão linear da curva obtida (equação da reta $y = ax + b$, onde (a) corresponde ao coeficiente angular e (b) ao coeficiente linear). A análise de variância

(ANOVA) confirmou a linearidade da curva, homogeneidade das variâncias e normalidade dos resíduos, os quais foram distribuídos sem tendência e coeficiente de correlação linear (r) mínimo aceitável de $r = 0,99$ (ANVISA, 2003).

4.5.3 Precisão

A precisão foi determinada pela quantificação de concentrações conhecidas dos fármacos. As amostras foram preparadas nas concentrações 0,5; 7,5 e 15,0 $\mu\text{g/mL}$ que equivalem às concentrações mínima, média e máxima da curva de calibração. As análises foram realizadas no mesmo dia para determinar a variabilidade intra-corrída e em dias diferentes para se estabelecer a variabilidade intercorridas. A precisão foi avaliada calculando-se o coeficiente de variação (CV), por meio da seguinte equação:

$$\text{CV\%} = (\text{desvio padrão}/\text{concentração média}) \times 100 \quad (4.1)$$

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 triplicata para cada concentração analisada.

A repetitividade (precisão intracorrída) foi avaliada considerando-se a dispersão dos valores das áreas dos picos obtidos para as amostras com as concentrações 0,5; 7,5; 15 $\mu\text{g/mL}$ em triplicatas.

A precisão intermediária (precisão intercorrida) foi avaliada considerando-se a dispersão dos valores das áreas dos picos obtidos para as amostras com as concentrações 0,5; 7,5; 15 $\mu\text{g/mL}$ em triplicatas obtidas em dias diferentes, com o mesmo equipamento.

4.5.4 Exatidão

A exatidão representa o grau de concordância entre os resultados encontrados nas análises e foi realizada utilizando-se as mesmas concentrações descritas anteriormente para o cálculo da precisão. Os resultados foram expressos em termos de porcentagem de recuperação:

$$\text{E\%} = (\text{concentração média}) / (\text{concentração teórica}) \times 100 \quad (4.2)$$

onde: E% corresponde à porcentagem de recuperação dos fármacos das camadas da pele; concentração média experimental é a média das medidas em triplicata para cada concentração analisada; e concentração teórica corresponde à que deveria ser obtida após a análise.

Para a realização desse ensaio as regiões EC, FP e PR de peles foram extraídas por meio da técnica do *tape stripping* diferencial (ANGELO et al., 2016b; MATOS et al., 2015; SILVA et al., 2016; TAMPUCCI et al., 2014) com o auxílio de fitas adesivas. As fitas adesivas com EC, FP e a PR picotadas foram colocadas em frascos e adicionou-se soluções padrões dos fármacos em metanol (50 µg/mL), correspondente às concentrações de 0,5; 7,5; 15 µg/mL.

A solução foi evaporada e em seguida 3 mL de metanol foram adicionados aos frascos que permaneceram em agitação por 3 horas para extração e avaliação da recuperação dos fármacos. O conteúdo dos frascos foi filtrado em membranas de 0,45 µm conectados a seringas e analisados por CLAE. Este experimento foi realizado em triplicata para cada concentração dos fármacos.

4.5.5 Limites de Quantificação (LQ) e de Detecção (LD)

Os limites de quantificação dos fármacos LQ e LD 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 4.3 e 4.4:

$$LD = 3,3 \sigma / S \quad (4.3)$$

$$LQ = 10 \sigma / S \quad (4.4)$$

onde: σ = desvio padrão do intercepto no eixo Y da curva de calibração, S = coeficiente angular da curva de calibração.

4.6 Resultados

4.6.1 Determinação do comprimento de máxima absorção dos fármacos

Os espectros de varredura na região do UV/Vis obtidos da FIN e da DT são apresentados nas figuras 4.1 a e b, respectivamente. Os valores dos comprimentos de onda de absorção selecionados para a detecção da FIN e da DT em CLAE foram iguais a 215 nm e 280 nm, respectivamente, por serem os mais seletivos durante as análises, não havendo outros picos de absorção do solvente e nem de interferentes no cromatograma analisado nestes comprimentos de ondas.

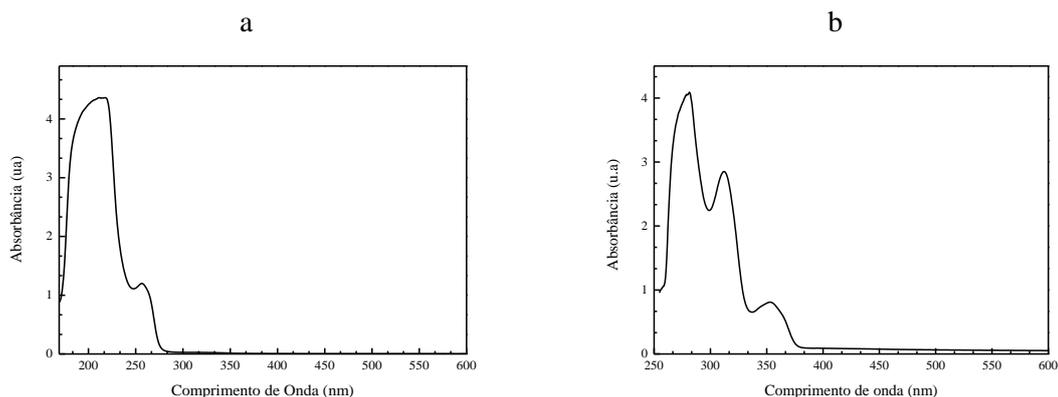


Figura 4.1 (a) Espectro de absorção no UV/Vis de uma solução de FIN e em (b) DT em metanol a 100 $\mu\text{g/mL}$. Faixa de varredura: 200 a 600 nm.

4.6.2 Quantificação dos fármacos por CLAE

No método analítico padronizado para a FIN a fase móvel foi composta por uma mistura de acetonitrila: água acidificada com ácido fosfórico 0,01M (40:60, v/v) e a detecção foi realizada em 215 nm com vazão de 1mL/min. O fármaco FIN apresentou tempo de retenção em 12,7 minutos. Enquanto que, no método padronizado para a DT a fase móvel foi composta por uma mistura de acetonitrila: água acidificada com ácido fosfórico 0,01M (62:38, v/v) e a detecção realizada em 280 nm, com a vazão de 0,8 mL/min e tempo de retenção em 11,5 minutos. O volume de injeção das amostras nos dois métodos foi igual a 20 μL e a temperatura do forno igual a 40 $^{\circ}\text{C}$.

Após o desenvolvimento de um método analítico é fundamental que este seja validado para garantir a qualidade da análise e assegurar a confiabilidade dos resultados. O objetivo de uma validação é demonstrar por meio de estudos experimentais que o método é apropriado para a determinação qualitativa, semiquantitativa e/ou quantitativa de fármacos e outras substâncias em produtos farmacêuticos. Para isso, é necessário que o método apresente linearidade, precisão, exatidão, especificidade/seletividade e limite de quantificação, segundo legislação vigente (ANVISA, 2003; ICH, 2005). Os resultados obtidos para os parâmetros utilizados na validação da metodologia analítica desenvolvida para a quantificação dos fármacos empregados serão apresentados a seguir.

4.6.3 Especificidade/Seletividade

A figura 4.2 mostra os cromatogramas referentes à injeção de 20 μL de soluções de FIN com concentração 7,5 $\mu\text{g/mL}$ em metanol, no meio (60 água / 0,5 tween 80 / 40 EG), e os interferentes da pele e componentes da ION, o fármaco FIN apresenta tempo de retenção em

11,7 minutos. Na Figura 4.3 são apresentados os cromatogramas referentes à injeção de 20 μL de soluções de DT com concentração 7,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ em metanol, no meio (60 água / 0,5 tween 80 / 40 EG) e os interferentes da pele e componentes da ION, o fármaco DT apresenta tempo de retenção em 11,5 minutos.

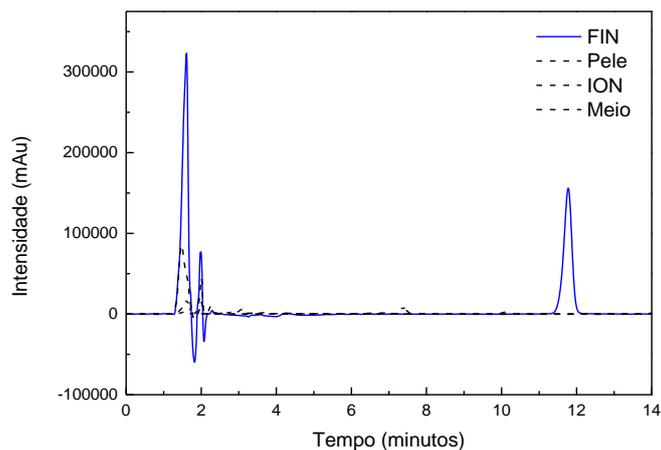


Figura 4.2 Cromatogramas referentes à injeção de soluções de FIN com concentração de 7,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ em metanol, meio (60 água / 0,5 tween 80 / 40 EG) e os interferentes da pele (EC, FP, PR) e componentes da ION.

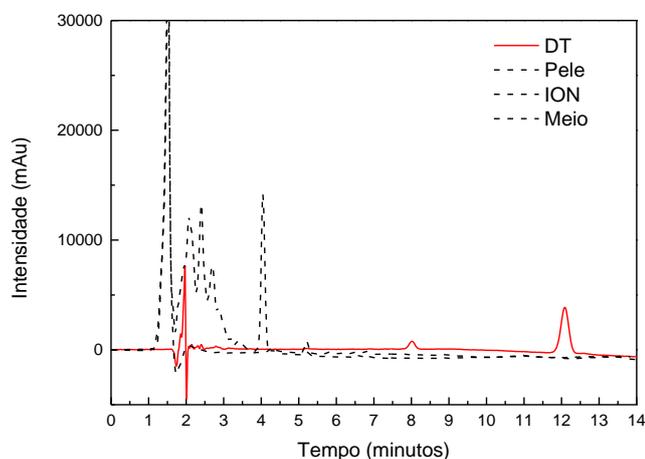


Figura 4.3 Cromatogramas referentes à injeção de soluções de DT com concentração de 7,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ em metanol, meio (60 água / 0,5 tween 80 / 40 EG) e os interferentes da pele (EC, FP, PR) e componentes da ION.

A análise dados apresentados nas Figuras 4.2 e 4.3 indicam que os métodos validados são seletivos para as dosagens dos fármacos FIN e DT estudadas.

4.6.4 Linearidade

A linearidade é a característica de uma metodologia analítica para que os resultados obtidos sejam diretamente proporcionais à concentração do analito, dentro de um intervalo

especificado (RIBANI et al., 2004). As figuras 4.4 e 4.5 mostram as curvas analítica obtidas para a FIN e para a DT, respectivamente, na faixa de concentração entre 0,5 a 15 µg/mL, utilizando-se metanol. A partir da análise da regressão linear é possível afirmar que o método apresentou linearidade nessa faixa de concentração uma vez que o coeficiente de correlação linear obtido foi de 0,9999 para as curvas dos fármacos em metanol, estando de acordo com o preconizado pela ANVISA (ANVISA, 2003).

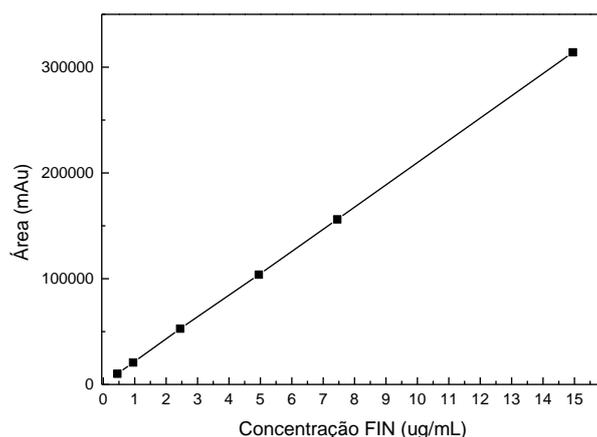


Figura 4.4 Curva analítica obtida das áreas dos picos dos espectros UV-vis em 215 nm para a FIN por CLAE. Concentrações diluídas em metanol. Equação da reta: $y = 20938x - 338,61$ e coeficiente de correlação linear: $r = 0,9999$.

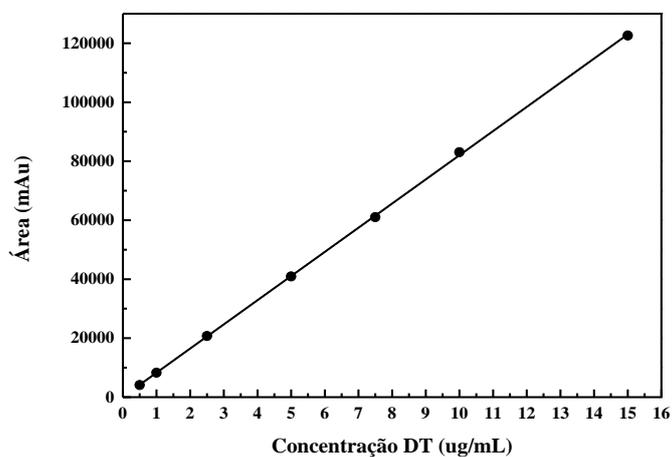


Figura 4.5 Representação gráfica da curva analítica obtida das áreas dos picos dos espectros UV-vis em 280 nm para a DT por CLAE. Concentrações diluídas em metanol. Equação da reta: $y = 8192,15x + 330,77$ e coeficiente de correlação linear: $r = 0,9999$.

4.6.5 Precisão

A precisão consiste na avaliação da proximidade dos resultados obtidos em uma série de medidas realizadas em uma mesma amostra em ensaios independentes. As tabelas 4.1 e 4.2 apresentam os resultados para as amostras FIN e DT, respectivamente, nas concentrações de

0,5; 7,5; e 15 µg/mL em metanol. As amostras foram analisadas intra e intercorrida e os resultados expressos como coeficiente de variação (CV%), não foram superiores a 5% (ANVISA, 2003). Portanto, os métodos propostos para a quantificação dos fármacos FIN e DT por CLAE foram precisos para as concentrações de 0,5; 7,5 e 15 µg/mL dos fármacos diluídos em metanol e realizadas intra e intercorrida.

Tabela 4.1 Análise da precisão e exatidão intra e intercorrida do método de quantificação em CLAE da FIN diluída em metanol, em função da concentração.

Concentração Teórica (µg/mL)	Concentração Experimental (µg/mL)	Precisão CV (%)	Exatidão (%)
Intracorrída (n=6)			
0,5	0,5	1,96	100,63
7,5	7,51	1,02	100,18
15	15,47	0,82	103,14
Intercorrída (n=6)			
0,5	0,51	2,43	102,65
7,5	7,57	3,96	100,98
15	15,46	1,08	102,41

Tabela 4.2 Análise da precisão e exatidão intra e intercorrida do método de quantificação em CLAE da DT diluída em metanol em função da concentração.

Concentração Teórica (µg/mL)	Concentração Experimental (µg/mL)	Precisão CV (%)	Exatidão (%)
Intracorrída (n=6)			
0,5	0,51	4,18	101,41
7,5	7,51	0,73	100,19
15,0	15,19	3,39	100,41
Intercorrída (n=6)			
0,5	0,50	1,74	99,58
7,5	7,50	1,55	100,05
15,0	15,15	1,96	101,03

4.6.6 Exatidão

A exatidão consiste na proximidade dos resultados obtidos pelo método utilizado em relação ao valor verdadeiro (ANVISA, 2003; ICH, 2005) que devem ser expressos em termos de porcentagem de recuperação e apresentar valores na faixa de limites aceitáveis, entre 85,0% e 115,0% (TIWARI; TIWARI, 2010), levando-se em consideração as especificações estabelecidas pelas autoridades internacionais para validação de métodos bioanalíticos (ANVISA, 2003; ICH, 2005).

Os testes de recuperação dos fármacos foram realizados com o intuito de validar o processo de extração da FIN e da DT das camadas de pele EC, FP e da PR, após a permeação;

além de verificar a capacidade extratora do metanol para os fármacos nas diferentes matrizes. Na tabela 4.3 estão apresentados os resultados da recuperação da FIN e na tabela 4.4 os de DT extraídas com 3 mL de metanol a partir das diferentes camadas de pele EC, FP e PR.

Tabela 4.3 Porcentagem de recuperação da FIN do EC, FP e ER utilizando 3 mL de metanol como solvente extrator.

Amostra	CT FIN ($\mu\text{g/mL}$)	CM FIN ($\mu\text{g/mL}$)	Precisão CV (%)	Exatidão (%)
EC		0,52	2,11	103,97
FP	0,5	0,51	2,60	102,61
ER		0,52	3,79	104,42
EC		7,68	1,22	102,35
FP	7,5	7,64	0,62	101,88
ER		7,61	0,64	101,42
EC		15,97	0,96	106,49
FP	15,0	15,82	1,59	105,58
ER		15,46	0,71	103,04

Tabela 4.4 Porcentagem de recuperação da DT do EC, FP e ER utilizando 3 mL de metanol como solvente extrator.

Amostra	CT DT ($\mu\text{g/mL}$)	CM DT ($\mu\text{g/mL}$)	Precisão CV (%)	Exatidão (%)
EC		0,51	0,09	101,06
FP	0,5	0,50	0,03	100,42
ER		0,49	0,04	97,73
EC		7,40	0,51	98,67
FP	7,5	7,50	0,33	99,93
ER		7,62	0,56	101,65
EC		15,40	1,09	102,66
FP	15,0	15,05	0,82	100,30
ER		15,04	0,63	100,28

O processo de extração da FIN e da DT das camadas de pele mostrou-se eficiente dentro do intervalo de linearidade (0,5 a 15 $\mu\text{g/mL}$) dos métodos analíticos validados por CLAE. A recuperação dos fármacos foi obtida dentro do limite aceito para a validação de métodos bioanalíticos ($\pm 15\%$) (TIWARI; TIWARI, 2010). Desta forma, a metodologia padronizada é adequada para quantificação da FIN e de DT presentes no EC, FP e PR.

4.6.7 Limite de Quantificação e Detecção

Os valores de quantificação e detecção determinados são adequados para a determinação

do perfil de liberação e permeação de FIN de DT nas camadas da pele. Conforme se observa na tabela 4.5, os valores quantificados são superiores aos LQ e LD teóricos do método analítico em questão.

Tabela 4.5 Limite de Quantificação e Detecção teóricos da FIN e DT diluídas em metanol.

Solvente	LQ	LD
Metanol	($\mu\text{g/mL}$)	($\mu\text{g/mL}$)
FIN	0,13	0,04
DT	0,23	0,07

Portanto, os métodos analíticos cromatográficos simples e seletivo desenvolvidos para a quantificação dos fármacos finasterida e de dutasterida foram validados com sucesso com relação à linearidade, precisão, exatidão, especificidade/seletividade e limite de quantificação e detecção, pois apresentaram valores dentro dos limites requeridos pela legislação vigente (ANVISA), 2003; ICH, 2005).

CAPÍTULO 5

FORMULAÇÕES COM INIBIDORES DA 5 ALFA REDUTASE ANCORADOS EM NPS COLOIDAIS DE MAGUEMITA: OBTENÇÃO E CARACTERIZAÇÃO

Neste capítulo serão abordados o processo de ancoramento dos fármacos finasterida (FIN) e dutasterida (DT) em nanopartículas de óxido de ferro, $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ - maguemita, (ION), a caracterização e o estudo da estabilidade das nanoformulações desenvolvidas para a administração tópica visando direcionar os fármacos aos folículos pilosos para o tratamento da alopecia androgênica.

5.1 Métodos

5.1.1 Incorporação dos fármacos nas ION

Para o procedimento de incorporação dos fármacos nas ION, inicialmente estes foram dissolvidos em um balão volumétrico em 100 μL de metanol. Em seguida, o volume do balão 50 mL foi completado com o nanocoloide contendo as ION e mantido sob agitação mecânica por 24 horas resultando nas nanoformulações ION-FIN e ION-DT. As concentrações de 250 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de ION-FIN e 125 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de ION-DT foram utilizadas em todos os experimentos. Três alíquotas de 1 mL foram separadas para caracterização das nanoformulações descritas no capítulo 2 (2.3).

5.1.2 Estudo da estabilidade coloidal das nanoformulações

A estabilidade coloidal das amostras ION, ION-FIN e ION-DT foi monitorada por meio dos parâmetros: diâmetro hidrodinâmico D_H (nm), potencial zeta ζ (mV), índice de polidispersão PDI, potencial hidrogeniônico (pH), eficiência de encapsulação (EE%), para o período de 1 dia até 90 dias após a preparação, em triplicatas com volume igual a 1mL, à

temperatura ambiente (30 °C) e geladeira (10 °C), acondicionadas em ampolas de vidro (1,5 mL).

5.1.3 Eficiência de Encapsulação EE%

As concentrações de FIN ou DT encapsuladas nas ION foram determinadas por meio da diferença entre a concentração total do fármaco quantificada na nanoformulação total (C_{total}) e a concentração de FIN ou DT não encapsulado presente no sobrenadante ($C_{sobrenadante}$), considerando-se que, a eficiência de encapsulação (EE%) é dada por:

$$EE\% = [(C_{total} - C_{sobrenadante}) / C_{total}] \times 100 \quad (5.1)$$

Para obtenção da C_{total} das nanoformulações foram diluídas em metanol (1:10) e para a coleta do sobrenadante foi realizada a decantação magnética por 24 horas de 1mL das nanoformulações ION-FIN e ION-DT. Em seguida, esse foi coletado e diluído (1:10) em metanol para quantificação do fármaco não encapsulado.

5.2 Análise estatística

Todas as nanoformulações foram preparadas e analisadas em triplicatas. Os resultados foram expressos em média \pm desvio padrão (DP) e analisados utilizando-se o software GraphPad Prism®. Diferenças significativas entre o conjunto de dados foram obtidas por análise de variância (*two-way* ANOVA), e pelo teste de Tukey. O nível de significância foi definido como $p < 0,05$.

5.3 Resultados e Discussão

5.3.1 Caracterização morfológica

As figuras 5.1 (a) e 5.2 (a) mostram as imagens de MET obtidas das nanoformulações ION-FIN e ION-DT e os respectivos histogramas 5.1 (b) e 5.2 (b) obtidos a partir de várias micrografias, nas quais os diâmetros de mais de 500 nanopartículas foram mensurados. O ajuste de dados apresentados nos histogramas foi realizado por meio da função log-normal obtendo-se o diâmetro médio da ION-FIN igual a $D_{MET} = 7,8 \pm 0,06$ nm, e dispersão de tamanho $\sigma = 0,20 \pm 0,01$ nm, enquanto que para ION-DT obteve-se o $D_{MET} = 7,6 \pm 0,10$ nm, e dispersão de

tamanho $\sigma = 0,23 \pm 0,02$ nm. Observa-se nas duas figuras que as nanopartículas possuem formato aproximadamente esférico, diâmetro médio e dispersão de tamanho semelhante.

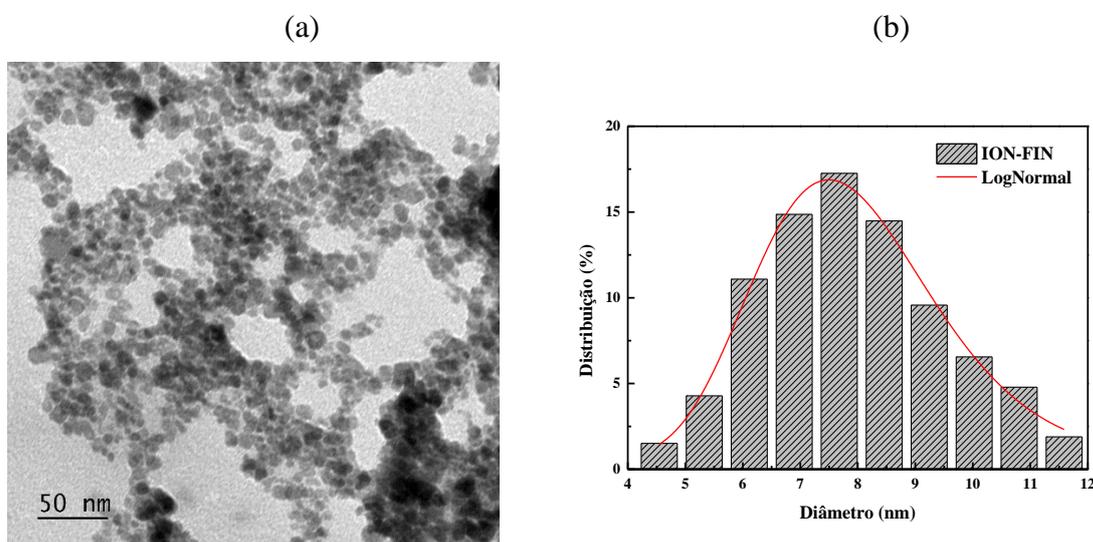


Figura 5.1 (a) Imagem de MET obtida da amostra ION-FIN. (b) Histograma de distribuição do diâmetro da amostra ION-FIN.

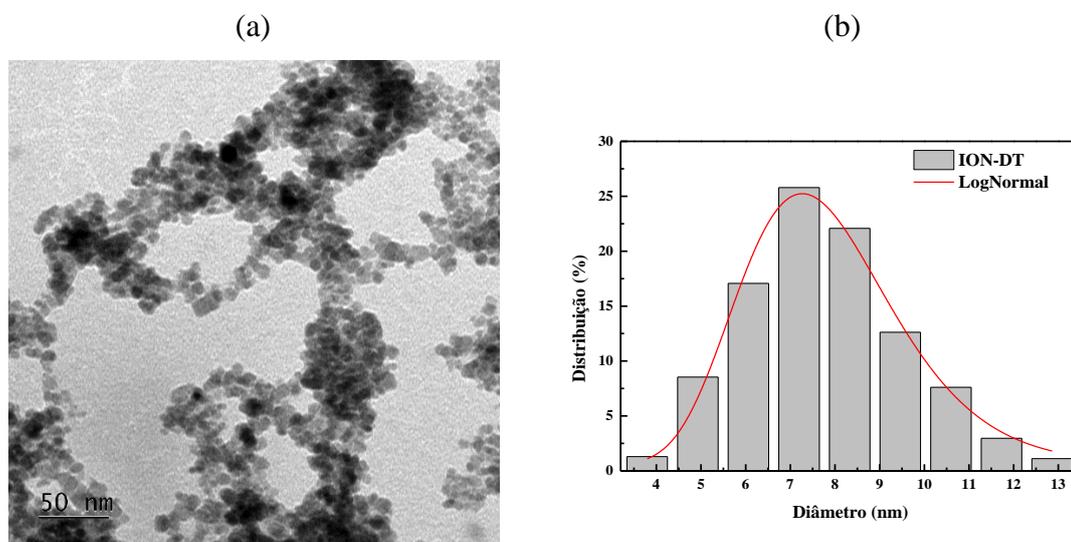


Figura 5.2 (a) Imagem de MET obtida da amostra ION-DT. (b) Histograma de distribuição do diâmetro da amostra ION-DT.

5.3.2 Caracterização físico-química por espectroscopia na região do infravermelho

Os espectros de FTIR dos nanocoloides ION-FIN e ION-DT e dos respectivos controles (FIN e DT), são apresentados nas figuras 5.3 e 5.4, respectivamente. Observa-se nos espectros obtidos das nanoformulações ION-FIN e ION-DT a presença dos grupos funcionais característicos dos respectivos controles com atenuação das intensidades dos mesmos. Portanto, a incorporação dos fármacos nas ION é indicada por meio da presença de bandas nos espectros de ION-FIN e ION-DT nas faixas de vibração de estiramento N-H do grupo amida (3500-3500

cm^{-1}), ligação C=O do grupo amida ($1700\text{-}1600\text{ cm}^{-1}$), vibrações de deformação plana dos C-H dos anéis aromáticos ($850\text{-}800\text{ cm}^{-1}$) e apenas na amostra DT e ION-DT vibrações de estiramento C-F ($1350\text{-}1120\text{ cm}^{-1}$) (EUROPEAN PHARMACOPOEIA, 2008b; ŁASZCZ et al., 2015). No espectro de ION-FIN e ION-DT também estão presentes as bandas referentes às ligações Fe-O da ION em 636 , 583 e 438 cm^{-1} , que são atribuídos à fase maguemita (SOLER et al., 2007c) e bandas resultantes da bicamada de AL em 2955 , 2870 cm^{-1} do estiramento assimétrico $\nu(\text{C-H})$ e simétrico $\nu_s(\text{C-H})$ dos grupos CH_3 , como também do CH_2 em 2920 e 2850 cm^{-1} (HERRERA et al., 2015; OLIVEIRA et al., 2017) (Cap.2, seção 2.5.4).

Observa-se também nas figuras 5.3 e 5.4 os picos das vibrações dos principais grupos funcionais de FIN em ION-FIN e DT em ION-DT em destaque. Em FIN e ION-FIN os picos destacados correspondem à ligação N-H do grupamento amida em 3429 e na lactama em 3234 cm^{-1} , à ligação C=O do grupo amida em 1685 e na lactama em 1666 cm^{-1} e as vibrações C-H do anel aromático (814 cm^{-1}) (AHMED; AL-ABD, 2018; DA SILVA et al., 2015; FRELEK et al., 2014; WAWRZYCKA et al., 1999). Enquanto que, nos espectros IR de DT e ION-DT estão destacadas as vibrações $\nu(\text{N-H})$ do grupamento amida em 3471 e da lactama em 3176 cm^{-1} , $\nu(\text{C=O})$ do grupo amida em 1714 e na lactama 1680 cm^{-1} e $\nu(\text{C=C})$ do anel aromático em 1591 cm^{-1} , $\nu(\text{C-F})$ em 1680 cm^{-1} e as vibrações $\nu(\text{C-H})$ do anel aromático em 827 cm^{-1} [10–12].

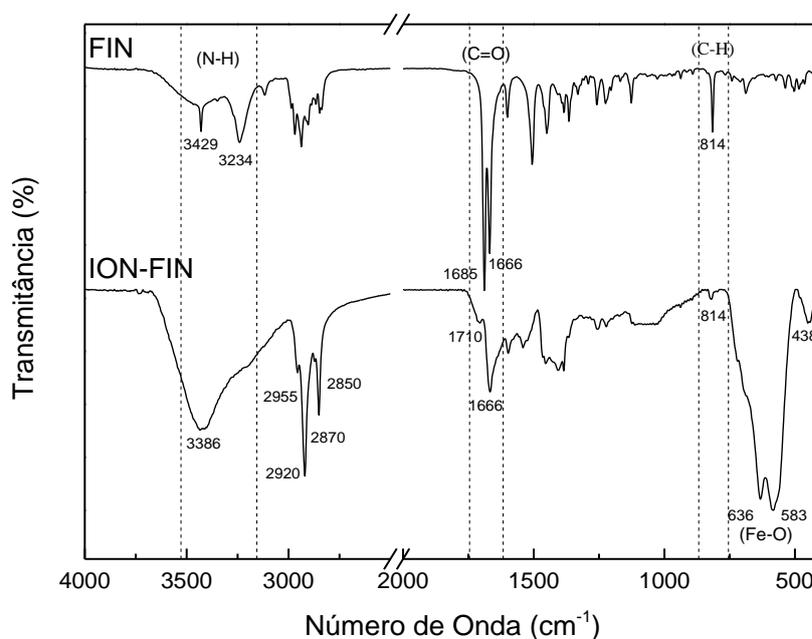


Figura 5.3 Espectros FTIR obtidos da FIN e do nanocoloide ION-FIN.

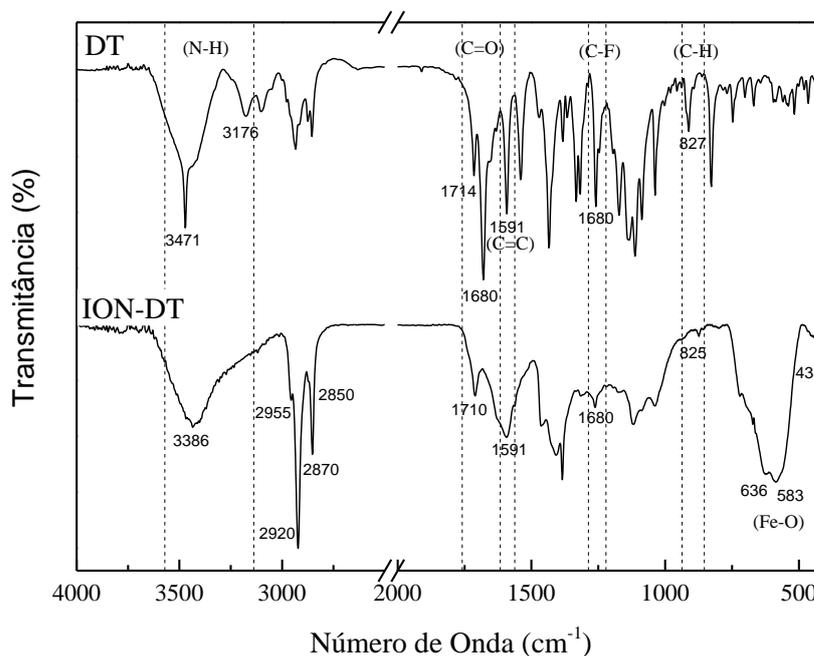


Figura 5.4 Espectros FTIR obtidos da DT e do nanocoloide ION-DT.

O alargamento do pico do grupo carboxila (C=O) e o seu deslocamento para menor número de onda observado nos espectros de ION-FIN e ION DT em bicamadas lipídicas após a inclusão de fármacos hidrofóbicos ou moléculas, como esteroides, é diretamente proporcional ao fortalecimento da ligação de hidrogênio com o oxigênio do grupo carboxílico do lipídio (BIRUSS; DIETL; VALENTA, 2007; DIES et al., 2015; KIM et al., 2014). É provável que a FIN e DT além de fortalecerem as ligações de hidrogênio entre os grupos C=O das moléculas de AL que compõem a bicamada, também façam ligações de hidrogênio entre suas moléculas (ŁASZCZ et al., 2015; WAWRZYCKA et al., 1999).

Interações hidrofóbicas intermoleculares também ocorrem entre as moléculas de FIN, DT e a bicamada de AL, interação de Van der Waals. Quanto maior a cadeia carbônica do fármaco mais interações de Van der Waals podem ocorrer proporcionando melhor “ancoragem” de FIN e DT nas ION, o que pode resultar pequenos deslocamento de picos. Sendo assim, como a DT (estrutura molecular $C_{27}H_{30}F_6N_2O_2$) possui uma cadeia carbônica maior e é mais hidrofóbica do que a FIN (estrutura molecular $C_{23}H_{36}N_2O_2$ (EUROPEAN PHARMACOPOEIA, 2008a)) certamente realizará mais interações de Van de Waals do que a FIN nas ION (COLE et al., 2011).

Todos os dados obtidos por FTIR para as amostras FIN, ION-FIN, DT e ION-DT estão na tabela 5.1.

Tabela 5.1 Bandas FTIR observadas nas amostras FIN, ION-FIN, DT, ION-DT e seus números de ondas (cm^{-1}).

Banda	FIN	ION-FIN	DT	ION-DT
$\nu(\text{N-H})$ amida	3429	3429	3471	3471
$\nu(\text{N-H})$ lactama	3234	3234	3176	3176
$\nu(\text{C=O})$ amida	1685	1685	1714	1714
$\nu(\text{C=O})$ lactama	1666	1666	1680	1680
$\nu(\text{C-H})$	814	814	827	827
$\nu(\text{C=C})$	-	-	1591	1591
$\nu(\text{C-F})$	-	-	1680	1680
$\nu_a(\text{C-H}) \text{CH}_3$	-	2955	-	2955
$\nu_s(\text{C-H}) \text{CH}_3$	-	2870	-	2870
$\nu_a(\text{C-H}) \text{CH}_2$	-	2920	-	2920
$\nu_s(\text{C-H}) \text{CH}_2$	-	2850	-	2850
$\nu(\text{Fe-O})$	-	636, 583, 438	-	636, 583, 438

5.3.3 Estudo da estabilidade coloidal de ION, ION-FIN e ION-DT

Na tabela 5.2 estão listados os valores obtidos para os parâmetros que foram monitorados (D_H , PDI, potencial zeta, pH e EE%) para avaliação da estabilidade coloidal de ION-FIN e ION-DT, a partir do primeiro dia até 90 dias da preparação. Os coloides foram armazenados à temperatura ambiente (30°C) e à 10°C .

Tabela 5.2 Dados obtidos do monitoramento dos parâmetros D_H , PDI, potencial zeta, pH e EE% para avaliação da estabilidade coloidal das nanoformulações por 90 dias.

1 Dia	ION		ION-FIN		ION-DT	
	10°C	30°C	10°C	30°C	10°C	30°C
D_H (nm)	$124,40 \pm 0,70$	$122,63 \pm 0,75$	$116,83 \pm 0,83$	$116,37 \pm 0,46$	$118,27 \pm 0,70$	$117,70 \pm 0,10$
PDI	$0,19 \pm 0,001$	$0,19 \pm 0,006$	$0,18 \pm 0,001$	$0,18 \pm 0,008$	$0,18 \pm 0,008$	$0,18 \pm 0,006$
ζ (mV)	$-35,57 \pm 0,30$	$-35,53 \pm 0,66$	$-34,23 \pm 0,15$	$-34,40 \pm 0,26$	$-35,80 \pm 0,53$	$-36,77 \pm 0,49$
pH	$7,42 \pm 0,09$	$7,43 \pm 0,09$	$7,42 \pm 0,03$	$7,47 \pm 0,02$	$7,48 \pm 0,03$	$7,48 \pm 0,02$
EE (%)	-	-	$99,50 \pm 0,05$	$99,59 \pm 0,04$	$99,92 \pm 0,01$	$99,93 \pm 0,01$
90 Dias	10°C	30°C	10°C	30°C	10°C	30°C
D_H (nm)	$142,60 \pm 1,73$	$131,87 \pm 1,62$	$126,20 \pm 1,18$	$120,47 \pm 1,65$	$129,57 \pm 1,6$	$125,43 \pm 0,38$
PDI	$0,19 \pm 0,008$	$0,19 \pm 0,004$	$0,19 \pm 0,003$	$0,17 \pm 0,001$	$0,18 \pm 0,006$	$0,18 \pm 0,004$
ζ (mV)	$-35,67 \pm 0,47$	$-36,47 \pm 0,38$	$-34,77 \pm 0,37$	$-35,80 \pm 0,40$	$-36,53 \pm 0,35$	$-36,73 \pm 0,69$
pH	$7,34 \pm 0,06$	$7,34 \pm 0,14$	$7,40 \pm 0,04$	$7,22 \pm 0,01$	$7,47 \pm 0,23$	$7,44 \pm 0,34$
EE (%)	-	-	$99,30 \pm 0,06$	$99,34 \pm 0,05$	$99,78 \pm 0,02$	$99,82 \pm 0,02$

Diâmetro hidrodinâmico D_H (nm), potencial zeta ζ (mV), Índice de polidispersão PDI, potencial hidrogeniônico pH, Eficiência de Encapsulação (EE%). Dados apresentados: média \pm desvio padrão. ANOVA, $p < 0,05$.

As dispersões coloidais ION-FIN e ION-DT apresentaram densidade de carga negativa assim como a ION. Os baixos valores de PDI encontrados mostram que as formulações são monodispersas e homogêneas.

A análise estatística realizada comparando-se os dados de ION, ION-FIN e ION-DT, apresentados na tabela 5.2, mostrou não haver diferenças significativas ($p > 0,05$) entre os valores dos parâmetros registrados em 0,1,3,7,15,30,60 e 90 dias, nas diferentes condições de temperatura. Estes dados indicam que os coloides ION, ION-FIN e ION-DT são estáveis, considerando-se que apresentaram potencial zeta em torno de -35 mV nas condições analisadas, mesmo após a incorporação dos fármacos hidrofóbicos (IOCCA, 2013; LI et al., 2016; SANTANA et al., 2005; SOLER et al., 2007b; TIETZE et al., 2013).

5.3.4 Análise termogravimétrica

A figura 5.5 mostra as curvas termogravimétricas de ION-FIN e ION-DT (linha cheia) de suas derivadas (DTG, linha pontilhada), bem como uma ilustração das IONs relativa a cada etapa, enquanto na tabela 5.3, estão listados os valores de perdas percentuais de massa (Δm) nas faixas de temperaturas consideradas (ΔT) e os picos das derivadas das curvas TG (DTG).

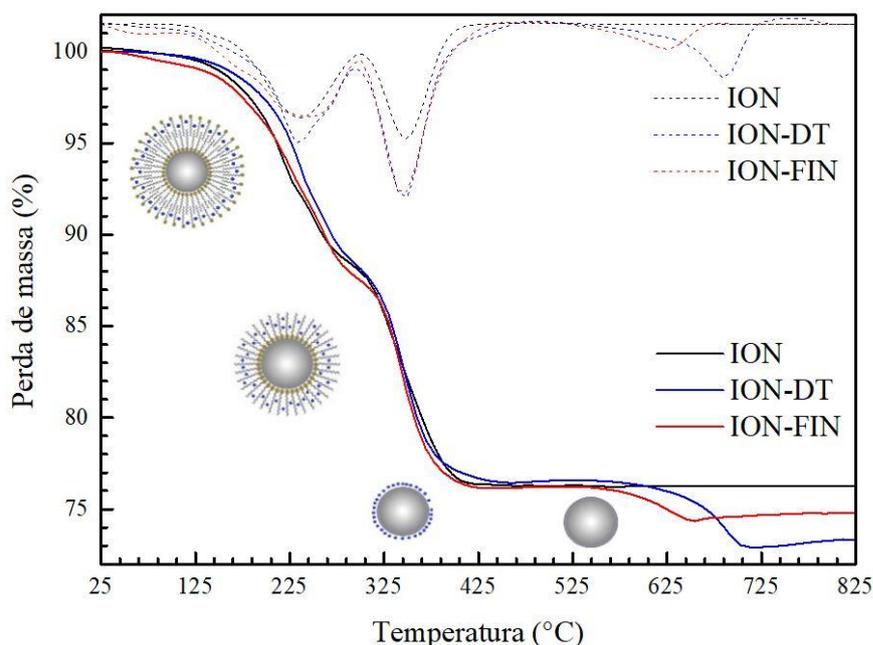


Figura 5.5 Curvas termogravimétricas (linha cheia) e DTG (linha pontilhada) de ION, ION-DT, ION-FIN.

As ION funcionalizadas com uma bicamada de AL apresentaram duas grandes perdas de massa abaixo de 400 °C que correspondem à decomposição das moléculas de AL fisiossorvidas e quimiossorvidas na superfície das NPs, o mesmo se observa para as formulações ION-FIN e

ION-DT. Uma terceira etapa de perda de massa foi observada nas curvas das amostras ION-FIN e ION-DT acima de 600 °C, que se refere à decomposição dos fármacos incorporados às ION sendo o Δm total de 24,1 e 25,1% e DTG em 624,8 e 683,8 °C, respectivamente.

Tabela 5.3 Valores das perdas de massa (Δm) totais obtidos na faixa de temperatura considerada (ΔT) e picos das derivadas das curvas termogravimétricas (DTG) correspondentes.

Amostras	Δm (°C)	ΔT (°C)	DTG (°C)
ION	20,3	25 - 1000 °C	231,5 / 349,5
ION-FIN	24,1	25 - 1000 °C	251,1 / 349,5 / 624,8
ION-DT	25,1	25 - 1000 °C	231,5 / 349,5 / 683,8

Os resultados obtidos da caracterização das nanoformulações sintetizadas mostraram que o processo de ancoramento dos fármacos finasterida (FIN) e dutasterida (DT) em nanopartículas de óxido de ferro, foi realizado com sucesso, não interferindo nas características do coloide original, bem como na estabilidade dos mesmos monitorada pelo período de 90 dias após a síntese, indicando o potencial das nanoformulações desenvolvidas para a administração tópica.

CAPÍTULO 6

APLICAÇÃO TÓPICA *IN VITRO* DAS NANOFORMULAÇÕES DESENVOLVIDAS

Neste capítulo serão apresentados os dados obtidos com o estudo de liberação e permeação *in vitro* dos fármacos presentes nas nanoformulações desenvolvidas em diferentes camadas de pele suína, usada como modelo. Em adição, também serão apresentados os dados obtidos para a permeação das nanopartículas de óxidos de ferro.

6.1 Análise estatística

Todos os resultados apresentados nesse capítulo são expressos em média \pm desvio padrão (DP) e foram analisados utilizando o software GraphPad Prism®. Diferenças significativas entre o conjunto de dados foram obtidas por análise de variância (*two-way* ANOVA), e pelo teste de Tukey. O nível de significância foi definido como $p < 0,05$ e os valores de p foram expressos conforme os diferentes níveis de significância: $p < 0,05$ (*), $p < 0,01$ (**) e $p < 0,001$ (***) e $p < 0,0001$ (****).

6.2 Estudo *in vitro* de liberação de FIN e DT presentes nas nanoformulações

O estudo *in vitro* da liberação dos fármacos presentes nas nanoformulações ION-FIN e ION-DT foi realizado utilizando-se um meio constituído por 60% água: 0,5 tween 80: 40% etilenoglicol (EG), pH 7,4 à temperatura ambiente, mantido em agitador orbital (180 rpm). No início da liberação foi adicionado ao meio 1 mL das formulações de ION-FIN (250 $\mu\text{g/mL}$), ION-DT (125 $\mu\text{g/mL}$). Foram realizadas coletas de 1 mL do meio após 1, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 24, 30, 36, 48, 72, 96 horas, com reposição do volume do meio. As amostras de ION-FIN e ION-DT, foram decantadas com o auxílio de um ímã e a quantidade de fármaco liberada, presente no sobrenadante, foi determinada pelo método analítico previamente validado para cada fármaco em CLAE (Capítulo 4). Como controle, um experimento semelhante foi realizado com 1 mL dos fármacos, na mesma concentração das formulações, dispersos em 60% água: 0,5% tween 80: 40% EG, pH 7,4, denominados de CT-FIN e CT-DT. O experimento foi realizado em triplicatas para cada formulação. O meio constituído por 60% água: 0,5% tween 80: 40% EG, pH 7,4, foi utilizado devido à baixa solubilidade dos fármacos FIN (0,00198 mg/mL) e DT

(0,000908 mg/mL) em água (ALOGPS). O perfil de liberação dos fármacos a partir das ION-FIN, ION-DT e dos controles CT-FIN e CT-DT foi calculado de acordo com a seguinte equação:

$$Q_{\text{realt}} = C_{\text{mensurada}} \times V + V_a \times \sum_{n=1}^{n-1} C_a \quad (6.1)$$

Onde: Q_{realt} é a quantidade liberada acumulada de fármaco no instante t ; $C_{\text{mensurada}}$ é a concentração mensurada do fármaco da coleta no instante t ; V é o volume do meio; V_a é o volume de amostra removido na coleta; e C_a é a concentração de fármaco na amostra removida.

Para garantir que o experimento de liberação fosse realizado em condição *sink*, ou seja, que a concentração do fármaco no meio em estudo não excedesse 10% do valor da sua solubilidade no mesmo, essa foi determinada para que não ocorresse a saturação do meio prejudicando a liberação. As solubilidades dos fármacos no meio foram determinadas adicionando excessos dos fármacos no meio (60% água: 0,5% Tween 80: 40% EG), pH 7,4. As suspensões foram agitadas por 24 h, filtradas em filtros de porosidade de 0,45 μm e diluídas antes da análise quantitativa por CLAE. O experimento foi realizado em triplicata.

6.3 Estudo de permeação cutânea *in vitro* das nanoformulações

Estudos *in vitro* com FIN e DT nanoencapsuladas utilizando células de Franz modificadas, têm mostrado que os fármacos não atravessam a pele em permeações passivas como as realizadas nesse estudo, não sendo possível a quantificação desses no compartimento receptor (MADHESWARAN et al., 2013b, 2013a, 2015, 2017; NOOR et al., 2017). Os experimentos de permeação *in vitro* foram realizados utilizando-se o método Saarbrüecken modificado por 12 e 24 horas com as nanoformulações ION-FIN, ION-DT e os seus respectivos controles CT-FIN e CT-DT, em quintuplicata. O método Saarbrüecken modificado não possui compartimento receptor, somente um sistema embaixo da pele que a mantém hidratada ao longo do experimento (ANGELO et al., 2016a), como detalhado no Capítulo 3, seção 3.3. Ao final do experimento, as peles foram retiradas do suporte, o excesso das nanoformulações e dos controles foi removido com água e papel absorvente. As camadas da pele estrato córneo (EC), foliculo piloso (FP) e pele remanescente (PR) foram extraídas por meio da técnica *tape stripping* diferencial (TEICHMANN et al., 2005) com o auxílio de fitas adesivas, Capítulo 3, seção 3.4.

As fitas de SC, FP e PR foram preparadas para a quantificação de ION e ferro empregando a técnica espectroscopia de ressonância ferromagnética (RFM). Como esta técnica é não

destrutiva, após as medidas de RFM, os fármacos foram recuperados das respectivas camadas de pele, em metanol, sob agitação por 3 horas, filtrados e analisados por CLAE, conforme foi descrito no Capítulo 4, seção 4.5.4.

6.4 Resultados e Discussão

6.4.1 Estudo *in vitro* de liberação de FIN e DT a partir das nanoformulações

O estudo de liberação durante 96 horas, foi realizado *in vitro* com o objetivo de avaliar a velocidade com que os fármacos são liberados das nanoformulações ION-FIN e ION-DT em comparação com os respectivos controles CT-FIN e CT-DT. Para que o ensaio de liberação não fosse prejudicado pela baixa solubilidade em água dos fármacos foi utilizado um meio constituído por 60% água / 0,5 tween 80 / 40% EG e as solubilidades de FIN e DT determinadas nesse à temperatura ambiente, pH 7,4, cujos resultados são apresentados na tabela 6.1. É necessário conhecer a solubilidade dos fármacos no meio de liberação para garantir que durante os experimentos não ocorra a saturação do mesmo e os fármacos deixem de ser liberados das NPs, sendo assim, os perfis de liberação dos fármacos foram conduzidos em condição *sink*.

Tabela 6.1 Solubilidade da FIN e DT no meio de liberação.

Fármacos	Solubilidade no Meio ($\mu\text{g/mL}$)	Condição Sink 10 %
FIN	255,09 \pm 1,09	25,50
DT	117,44 \pm 1,11	11,74

Meio 60% água / 0,5 Tween 80 / 40 EG, pH7,4 (média \pm desvio padrão)

A concentração de FIN e DT nos controles e nas nanoformulações colocadas no meio de liberação foram de respectivamente 250 $\mu\text{g/mL}$ e 125 $\mu\text{g/mL}$ em volume total de 25 mL. O perfil de liberação de FIN e DT a partir de ION-FIN e ION-DT e seus controles CT-FIN e CT-DT estão apresentados nas figuras 6.1 e 6.2.

Observa-se na figura 6.1 que a ION-FIN liberou 75 % do fármaco e o seu controle CT-FIN 100% em 96 horas de liberação. Na primeira hora do ensaio de liberação, ION-FIN liberou 27 % do fármaco e o controle 49 %, apresentando diferença significativa no perfil de liberação das NPs com relação ao controle, o qual se manteve até o final do experimento ($p < 0,0001$). Em 24 horas de liberação 50 % de FIN tinha sido liberada das ION-FIN e 67% do controle, enquanto que, a partir de 48 horas as NPs passaram a liberar 2,8 % do fármaco a cada 24 horas estabilizando a liberação. O controle liberou todo o fármaco ao final das 96 horas.

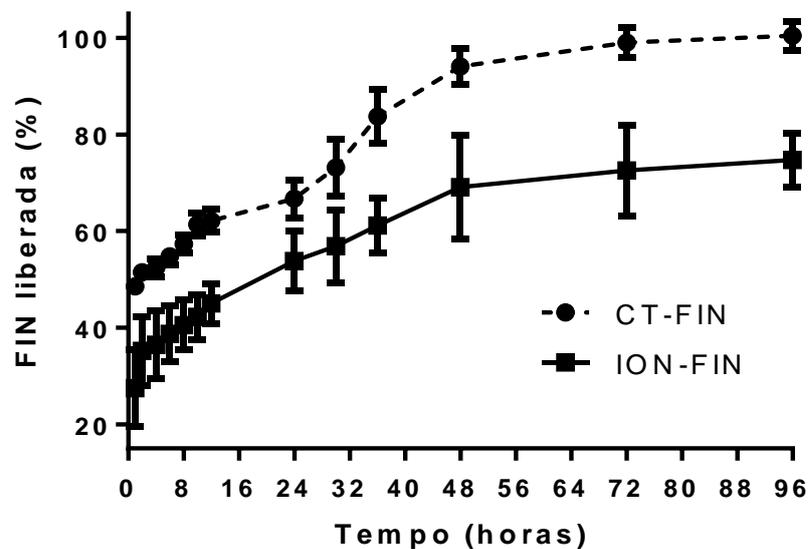


Figura 6.1 Perfis de liberação da FIN a partir da ION-FIN contendo 250 µg/mL de FIN, pH 7,4 e de suspensão do fármaco na mesma concentração, n = 3, p < 0,05, conforme indicação.

Diferentemente, observa-se que outros estudos de liberação foram comprometidos pela má solubilidade de FIN no meio utilizado, tampão fosfato, e apresentaram baixa liberação do fármaco em 40 dias de experimento. Neste estudo, os perfis de liberação da FIN pelas ION-FIN e CT-FIN puderam ser melhor avaliados devido à escolha de um meio no qual o fármaco pudesse se difundir livremente não havendo a saturação desse ou a desestabilização das NPs durante as 96 horas de experimento, não sendo observado precipitados no fundo do balão. As ION-FIN apresentaram uma efetivo controle da liberação do fármaco em relação ao respectivo controle, que ao final do experimento liberou 100% do seu conteúdo.

Os resultados apresentados na figura 6.2, mostraram que, no caso da nanoformulação contendo dutasterida, 62 % do fármaco foi liberado no período de 96 h, enquanto que o respectivo controle, CT-DT liberou 92%. Nas primeiras horas de experimento também houve diferença significativa do perfil de liberação do fármaco na nanoformulação, comparado-se com o controle que liberou maiores quantidades de fármaco durante todo o período do experimento ($p < 0,0001$).

O fato de ao final do experimento o controle não ter liberado todo o conteúdo de fármaco se deve à menor solubilidade de DT (117,44 µg/mL) no meio, se comparada à FIN (255,09 µg/mL).

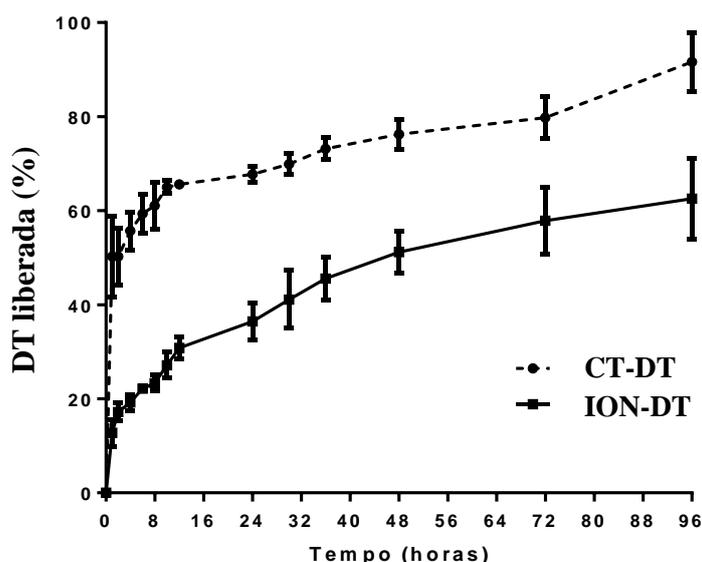


Figura 6.2 Perfis de liberação da DT a partir da ION-DT contendo 125 µg/mL de DT, pH 7, 4, e de uma suspensão aquosa do fármaco na mesma concentração, n = 3, p < 0,05, conforme indicação.

A partir de 24 horas a nanoformulação passou a liberar aproximadamente 8,7% do fármaco a cada período de 24 horas. Os resultados obtidos para liberação de DT, amostra controle, é melhor do que os disponíveis na literatura, que empregaram a DT em etanol/água, e resultaram em baixa liberação de DT que pode ser atribuído à baixa solubilidade da dutasterida em solventes polares (NOOR et al., 2017, MADHESWARAN et al., 2013a, 2013b 2015, 2017).

A liberação controlada dos fármacos por meio das nanoformulações ION-FIN e ION-DT está em acordo com o que se espera para carreadores nanoparticulados destinadas à aplicação tópica, devido ao acúmulo das NPs nos FP promovendo a liberação controlada dos fármacos para os tecidos adjacentes.

6.4.2 Estudo de permeação *in vitro* de ION, [Fe], FIN e DT a partir das nanoformulações

Os estudos de permeação foram realizados *in vitro* em pele da orelha de suínos devido à similaridade com a pele humana, principalmente com relação à estrutura folicular (PRAÇA et al., 2018). Nos experimentos para a quantificação de ION e [Fe], os controles CT-FIN e CT-DT foram medidos, mas não apresentaram sinal de RFM por não serem magnéticos, havendo durante a medida sinal apenas na presença de ION nas permeações com ION-FIN e ION-DT. A seguir, serão apresentaremos os resultados obtidos da quantificação de ION, ferro, FIN e DT nas camadas de pele EC e FP e PR, em permeações de 12 e 24 horas com ION-FIN e ION-DT.

Os resultados da quantificação de ION por RFM nas camadas de pele (EC, FP e PR) em 12 e 24 horas de permeação com ION-FIN e ION-DT, estão apresentados na figura 6.3. Após a quantificação das ION a concentração de ferro [Fe] presente nas camadas da pele também foi estimada, figura 6.4.

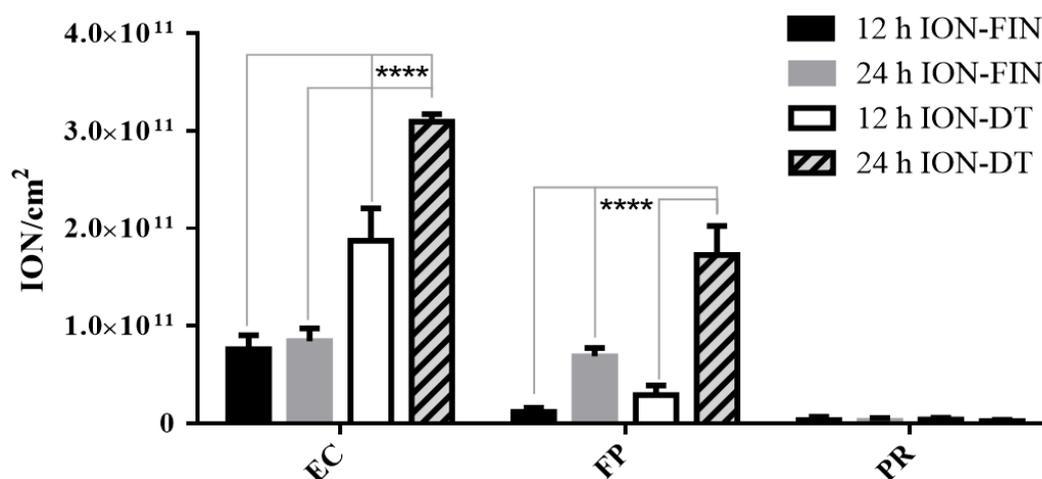


Figura 6.3 Concentração de NPs/cm² retidas em cada camada de pele após 12 e 24 horas de permeação com ION-FIN e ION-DT, n = 5, p < 0,05, conforme indicação.

A retenção de ION nas camadas de pele para os períodos de 12 e 24 horas de permeação das nanoformulações foi diferente. Observa-se na figura 6.3 que após 12 e 24 horas de permeação das nanoformulações, as nanopartículas de óxidos de ferro foram detectadas em todas as camadas da pele, porém, com valores muito baixos na PR. No caso da formulação ION-FIN, comparando-se os períodos de 12 e 24 h de permeação, houve diferença significativa na retenção de ION apenas nos FP. Ao contrário, os histogramas referentes à dutasterida mostram diferença significativa na retenção de ION em 12 horas de permeação, comparando-se com a de 24 horas nas regiões de pele EC e FP. Em adição, verifica-se na região da pele remanescente ínfimas quantidades de nanopartículas de óxidos de ferro para as duas formulações. Comparando-se as formulações com diferentes fármacos, observa-se que a retenção de ION nas permeações com ION-DT foi superior às com ION-FIN no SC e no FP.

As quantidades de ferro [Fe] em µg/cm² estimadas para cada camada da pele após 12 e 24 horas de permeação com ION-FIN e ION-DT são apresentadas na figura 6.4, apresentam a mesma distribuição obtida para as NPs (ION) conforme esperado, observando-se o mesmo perfil de retenção.

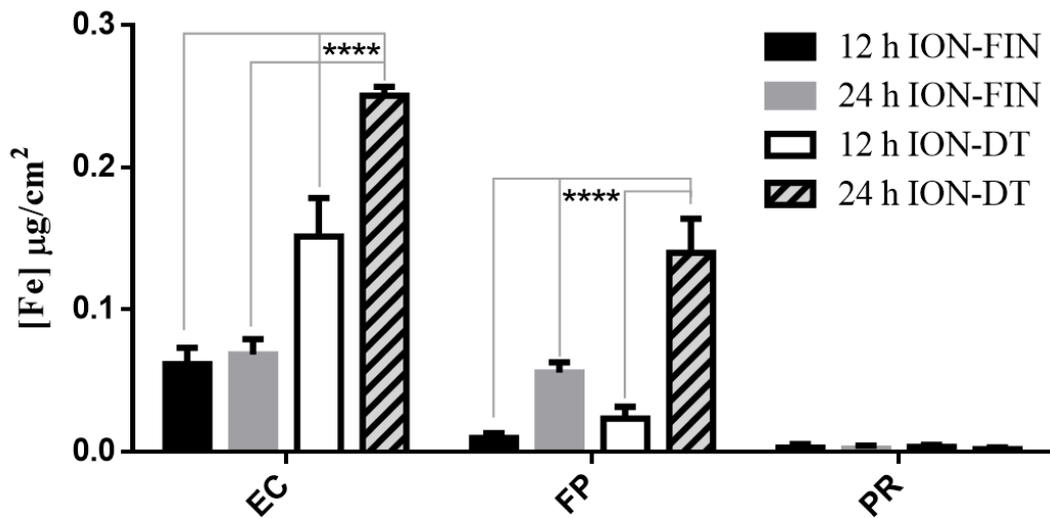


Figura 6.4 Quantidade de [Fe] $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ retido nas camadas da pele após 12 e 24 horas de permeação com ION-FIN e ION-DT, $n = 5$, $p < 0,05$, conforme indicação.

As figuras 6.5 e 6.6 apresentam a permeação e retenção dos fármacos FIN e DT nas diferentes camadas da pele em 12 e 24 horas de permeação com ION-FIN e ION-DT, comparadas aos seus respectivos controles CT-FIN e CT-DT. Observa-se que as quantidades de FIN e DT retidas nas camadas da pele em 12 e 24 horas de permeação com ION-FIN, ION-DT resultaram no aumento significativo dos fármacos nas regiões EC e FP, quando comparados aos respectivos controles (CT-FIN e CT-DT). Adicionalmente, a retenção dos fármacos FIN e DT na PR em 12 e 24 horas de permeação com ION-FIN e ION-DT, comparadas aos seus respectivos controles CT-FIN e CT-DT, mostram que apenas pequenas quantidades dos fármacos ficaram retidos na PR, sem apresentar diferença significativa entre a permeação com as nanoformulações e com os controles.

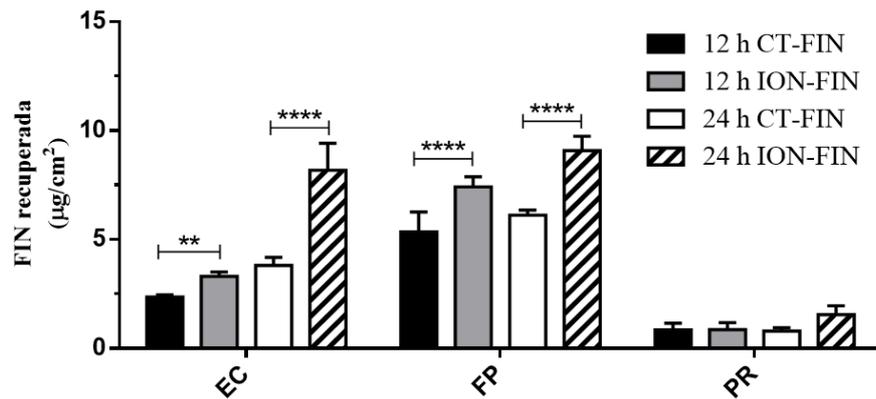


Figura 6.5 Quantidade de FIN ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$) retida nas camadas da pele após 12 e 24 horas de permeação com ION-FIN e ION-DT, $n = 5$, $p < 0,05$, conforme indicação.

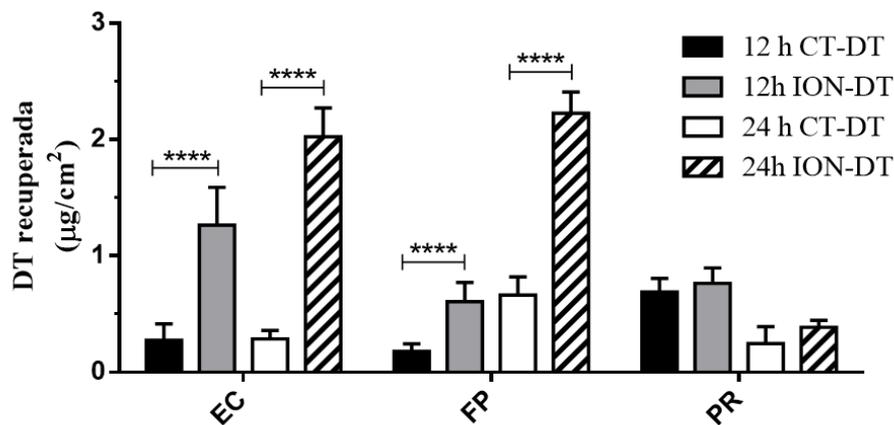


Figura 6.6 Quantidade de DT ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$) retida nas camadas da pele após 12 e 24 horas de permeação com ION-FIN e ION-DT, $n = 5$, $p < 0,05$, conforme indicação.

Observa-se na figura 6.5 nas permeações de ION-FIN e CT-FIN que a quantidade recuperada de FIN na PR em 12 horas é da mesma ordem da obtida em 24 horas de permeação. Enquanto que, comparando-se o resultado das permeações de 12 e 24 horas de ION-DT e CT-DT (figura 6.6) observa-se uma redução da quantidade de DT na PR em 24 horas, quando comparada ao obtido em 12 horas. A análise pode ser feita considerando-se as quantidades retidas de ION, [Fe] no EC e FP as pequenas quantidades dos fármacos que alcançam a região da PR durante 12 e 24 horas de permeação, indica que as nanopartículas de óxidos de ferro não atravessam a pele em permeações passivas como as realizados durante esse estudo (MADHESWARAN et al., 2013b, 2013a, 2015, 2017; NOOR et al., 2017). Sendo assim, acredita-se que as concentrações utilizadas de ION, [Fe] e dos fármacos foram suficientes para saturar a camada da PR em 12 horas de permeação, logo essa quantidade se manteve mesmo com o aumento do tempo de exposição da pele à nanoformulação e ao controle. No caso das permeações com ION-DT e CT-DT, o fato de as quantidades retidas de DT na PR em 24 horas

ser inferior às encontradas em 12 horas, poderia ser um indicativo de maior direcionamento da DT para os FP.

Os resultados da quantificação de ION e ferro nas permeações com ION-DT também indicam uma maior retenção desses no EC e FP, quando comparadas a ION-FIN nos tempos analisados. Os resultados indicam que a maior hidrofobicidade de DT ($\text{LogP} = 5,79$) em comparação com a FIN ($\text{LogP} = 3,53$), pode ter sido determinante para maior interação e retenção de ION-DT nos FP e uma maior retenção de ION, [Fe] e DT nesse anexo cutâneo que são preenchidos por sebo.

O perfil de permeação e retenção de ION, [Fe], FIN e DT em pequenas quantidades na PR e a manutenção dessas independente do tempo de exposição tópica às nanoformulações é favorável ao tipo de aplicação avaliada, pois quanto menor a quantidade desses na PR menor a possibilidade de atravessarem a pele, alcançarem a corrente sanguínea e facilitando a ação sistêmica e resultando em efeitos adversos indesejáveis.

Os resultados obtidos nos estudos de permeação *in vitro* realizados com as nanoformulações com inibidores da 5 alfa redutase ancorados em NPs coloidais de maguemita e a quantificação dos ativos ION, [Fe], FIN e DT nas camadas da pele, permitiu avaliar o potencial das nanoformulações desenvolvidas ION-FIN e ION-DT, de interagir com a pele, romper a barreira do EC e aumentar o depósito de ION, [Fe] e dos fármacos FIN e DT nos FP, região de interesse para a terapia proposta. A presença desses ativos no FP viabiliza a inativação seletiva e irreversível das enzimas responsáveis pela conversão da testosterona em DHT no FP, interrompendo assim o principal mecanismo fisiopatológico da AA, por via tópica.

Na literatura não há relatos sobre a aplicação tópica de IONs como nanocarreadores de fármacos, visando o tratamento de doenças associadas aos folículos pilosos, como a alopecia, bem como a investigação da distribuição e quantificação das mesmas nas camadas de pele. Os resultados obtidos neste trabalho acrescentam novas informações importantes para o estudo da biodistribuição passiva de NPs de óxido de ferro nas diferentes camadas de pele, seu potencial na incorporação e veiculação de fármacos hidrofóbicos em meio aquoso, sua estabilidade, liberação, permeação e o seu potencial de administração por via tópica.

CONCLUSÃO

Neste estudo nanopartículas de maguemita funcionalizadas com uma bicamada de ácido láurico (ION) foram sintetizadas e empregadas como plataformas para ancorar os fármacos finasterida e dutasterida produzindo as nanoformulações denominadas ION-FIN e ION-DT, respectivamente. As nanopartículas apresentaram diâmetro de ~ 8 nm e comportamento superparamagnético, com magnetização de saturação à temperatura ambiente igual a 63 emu/g, credenciando-as para aplicações biomédicas.

A análise dos resultados obtidos dos espectros Raman e infravermelho por transformada de Fourier, complementadas pela análise termogravimétrica confirmou a presença da bicamada de ácido láurico na superfície das nanopartículas, bem como a incorporação dos fármacos finasterida e dutasterida ao nanocarreador. No caso desse nanocarreador, a funcionalização das nanopartículas com o ácido láurico, ocorreu por coordenação bidentada em ponte entre o grupo carboxílico do ácido láurico e o Fe da superfície da nanopartícula. Enquanto que, e a segunda camada de ácido láurico acopla-se por meio de interações hidrofóbicas das cadeias carbônicas saturadas do ácido graxo, nas quais os fármacos são ancorados com eficiência de encapsulação de 99%. A funcionalização da superfície das nanopartículas com ácido láurico e a incorporação dos fármacos FIN e DT resultaram em nanoformulações estáveis que apresentam características essenciais para a aplicação tópica na área farmacêutica.

As nanoformulações desenvolvidas foram empregadas em ensaios *in vitro* de liberação e permeação cutânea durante 12 e 24 horas, nas diferentes camadas da pele como o estrato córneo, folículo piloso e pele remanescente, empregando um modelo com pele de orelha de suínos. As diferentes camadas da pele foram extraídas por meio de *tape stripping* diferencial. A concentração de nanopartículas de óxidos de ferro ou (ferro) nas diferentes camadas da pele, foi obtida por meio da técnica de espectroscopia de ressonância ferromagnética, enquanto que os fármacos, finasterida e dutasterida, foram quantificados por meio de cromatografia líquida de alta eficiência. Os componentes das nanopartículas como o ferro do núcleo, e o ácido láurico da cobertura foram escolhidos para atuarem em associação com os fármacos no tratamento tópico da alopecia androgênica. Os resultados obtidos nos estudos de permeação *in vitro* realizados a partir das nanoformulações com inibidores da 5 alfa redutase ancorados em NPs de maguemita coloidal e a quantificação dos ativos ION, [Fe], FIN e DT nas camadas da pele,

permitiu avaliar o potencial de ION-FIN e ION-DT, de interagir com a pele, romper a barreira do EC e aumentar o depósito de ION, Fe) e dos fármacos FIN e DT nos FP, região de interesse para a terapia proposta. A presença desses ativos no FP viabiliza a inativação seletiva e irreversível das enzimas responsáveis pela conversão da testosterona em DHT no FP, interrompendo assim o principal mecanismo fisiopatológico da AA, por via tópica.

Os resultados dos ensaios *in vitro* de liberação e permeação cutânea mostraram que as nanoformulações produzidas com inibidores da 5 alfa redutase ancorados em NPs de maguemita coloidais induzem uma liberação controlada dos fármacos e capacidade de romper a barreira da pele, o estrato córneo, chegando uma quantidade muito pequena dos fármacos à pele remanescente, pois a maior parte de ION, e dos fármacos FIN e DT foi direcionado aos folículos pilosos, região de interesse para a terapia proposta. É importante observar que os folículos pilosos são afetados pela alopecia androgênica e são alvo da ação dos ativos presentes nas nanoformulações.

Os resultados obtidos neste trabalho contribuíram para os estudos sobre a biodistribuição passiva de NPs de óxido de ferro nas camadas da pele, mostrando que as nanoformulações desenvolvidas têm potencial para a incorporação e veiculação de fármacos hidrofóbicos em meio aquoso, com liberação controlada e potencial para a administração de fármacos por via tópica.

PERSPECTIVAS

Para a continuidade do trabalho sugere-se realizar estudos de citotoxicidade em folículos pilosos, e estudos pré-clínicos para avaliar a eficácia das formulações *in vitro* e *in vivo*.

APÊNDICE 1 - PEDIDO DE PATENTE DEPOSITADO ORIGINADO DA TESE



26/02/2018 870180015381
16:33
29409161800871723

**Pedido nacional de Invenção, Modelo de Utilidade, Certificado de
Adição de Invenção e entrada na fase nacional do PCT**

Número do Processo: BR 10 2018 003762 5

Dados do Depositante (71)

Depositante 1 de 2

Nome ou Razão Social: FUNDAÇÃO UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA

Tipo de Pessoa: Pessoa Jurídica

CPF/CNPJ: 00038174000143

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Jurídica: Instituição de Ensino e Pesquisa

Endereço: CENTRO DE APOIO AO DESENVOLVIMENTO TECNOLÓGICO -
UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA, CAMPUS UNIVERSITÁRIO DARCY
RIBEIRO, EDIFÍCIO CDT, ASA NORTE

Cidade: Brasília

Estado: DF

CEP: 70904-970

País: Brasil

Telefone: (61)3107-4100/4137

Fax:

Email: nupitec@cdt.unb.br

**PETICIONAMENTO
ELETRÔNICO**

Esta solicitação foi enviada pelo sistema Peticionamento Eletrônico em 26/02/2018 às 16:33, Petição 870180015381

Depositante 2 de 2

Nome ou Razão Social: UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
Tipo de Pessoa: Pessoa Jurídica
CPF/CNPJ: 01567601000143
Nacionalidade: Brasileira
Qualificação Jurídica: Instituição de Ensino e Pesquisa
Endereço: Campus Samambaia - Prédio da Reitoria
Cidade: Goiânia
Estado: GO
CEP: 74690-900
País: BRASIL
Telefone: (62) 352 12023
Fax:
Email: reitoria@ufg.br

Dados do Pedido

Natureza Patente: 10 - Patente de Invenção (PI)

Título da Invenção ou Modelo de Utilidade (54): COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA ENVOLVENDO NANOCARREADORES MAGNÉTICOS DE ÓXIDO DE FERRO COM COBERTURA DE ÁCIDO LÁURICO CONTENDO INIBIDOR DE 5 α -REDUTASE PARA ADMINISTRAÇÃO TÓPICA NO TRATAMENTO DE ALOPECIA

Resumo: A presente invenção descreve o desenvolvimento de uma composição farmacêutica contendo os ativos: ácido láurico, finasterida ou dutasterida e o ferro presente nas nanopartículas de óxido de ferro, a qual é eficaz na prevenção e no tratamento da perda de cabelo por diferentes causas, em particular, da alopecia androgenética, e na estimulação do crescimento capilar. A presente invenção promove uma liberação sítio-específica dos ativos nos folículos pilosos, potencializada pela magnetohipertermia, de forma a reduzir a dose, a toxicidade e a promover o crescimento dos cabelos de forma sustentada. Além disso, a cor da formulação proporciona a sensação de preenchimento capilar antes mesmo do início da ação dos seus ativos.

Figura a publicar: 7

**PETICIONAMENTO
ELETRÔNICO**

Esta solicitação foi enviada pelo sistema Petição Eletrônica em 26/02/2018 às 16:33, Petição 870180015381

Dados do Inventor (72)

Inventor 1 de 8

Nome: LUANA ALVES DE FREITAS AFIUNE

CPF: 01116131161

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Física: Enfermeiro de nível superior, nutricionista, farmacêutico e afins

Endereço: Qr 108, Conjunto 06, Lote 1, Residencial Sintra, Samambaia Sul

Cidade: Brasília

Estado: DF

CEP: 72302-206

País: BRASIL

Telefone: (61) 310 74137

Fax:

Email: nupiteo@cdt.unb.br

Inventor 2 de 8

Nome: MARIA APARECIDA GODOY SOLER PAJANIAN

CPF: 66347394804

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Física: Físico, químico, meteorologista, geólogo, oceanógrafo e afins

Endereço: SHIS QI 29 CONJUNTO 16 CASA 27

Cidade: Brasília

Estado: DF

CEP: 71675-360

País: BRASIL

Telefone: (61) 310 74137

Fax:

Email: nupiteo@cdt.unb.br

Inventor 3 de 8

**PETICIONAMENTO
ELETRÔNICO**Esta solicitação foi enviada pelo sistema Petição Eletrônica em 25/02/2018 às
16:33, Petição 870180015391

Nome: TAÍS GRATIERI

CPF: 05409396685

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Física: Enfermeiro de nível superior, nutricionista, farmacêutico e afins

Endereço: Colina Bloco J apto 404

Cidade: Brasília

Estado: DF

CEP: 70904-110

País: BRASIL

Telefone: (61) 310 74137

Fax:

Email: nupitec@cdl.unb.br

Inventor 4 de 8

Nome: GUILHERME MARTINS GELFUSO

CPF: 29576933803

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Física: Enfermeiro de nível superior, nutricionista, farmacêutico e afins

Endereço: Colina Bloco I Ap. 101

Cidade: Brasília

Estado: DF

CEP: 70904-109

País: BRASIL

Telefone: (61) 310 74137

Fax:

Email: nupites@cdl.unb.br

Inventor 5 de 8

**PETICIONAMENTO
ELETRÔNICO**

Esta solicitação foi enviada pelo sistema Petição Eletrônica em 26/02/2018 às 10:33, Petição 870180015381

Nome: MARCILIO SERGIO SOARES DA CUNHA FILHO

CPF: 03934929400

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Física: Enfermeiro de nível superior, nutricionista, farmacêutico e afins

Endereço: Cond Prive I, Qd 3, Conj E, 36

Cidade: Brasília

Estado: DF

CEP: 71539-325

País: BRASIL

Telefone: (61) 310 74137

Fax:

Email: nupitec@cdt.unb.br

Inventor 6 de 8

Nome: PAULO CÉSAR DE MORAIS

CPF: 14563568104

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Física: Físico, químico, meteorologista, geólogo, oceanógrafo e afins

Endereço: SHIN-QI 01, CONJUNTO 08, CASA 19

Cidade: Brasília

Estado: DF

CEP: 71505-080

País: BRASIL

Telefone: (61) 310 74137

Fax:

Email: nupitec@cdt.unb.br

Inventor 7 de 8

**PETICIONAMENTO
ELETRÔNICO**

Esta solicitação foi enviada pelo sistema Petição Eletrônica em 26/02/2018 às
16:33, Petição 870180015381

Nome: APARECIDO RIBEIRO DE SOUZA
CPF: 07096184848
Nacionalidade: Brasileira
Qualificação Física: Físico, químico, meteorologista, geólogo, oceanógrafo e afins
Endereço: Rua 13, no. 205, Ap 1501V, Jardim Goiás
Cidade: Goiânia
Estado: GO
CEP: 74810-170
País: BRASIL
Telefone: (61) 310 74137
Fax:
Email: nupitec@cdt.unb.br

Inventor 8 de 8

Nome: MATHEUS OLIVEIRA DA SILVA
CPF: 98171747191
Nacionalidade: Brasileira
Qualificação Física: Biólogo, biomédico e afins
Endereço: Rua 25 de dezembro, Qd 35, Lt 16, Vila Jardim Vitória
Cidade: Goiânia
Estado: GO
CEP: 74865-420
País: BRASIL
Telefone: (61) 310 74137
Fax:
Email: nupitec@cdt.unb.br

**PETICIONAMENTO
ELETRÔNICO**

Esta solicitação foi enviada pelo sistema Petição Eletrônica em 26/02/2018 às 16:33. Petição 870180015381

Documentos anexados

Tipo Anexo	Nome
Relatório Descritivo	Relatório Descritivo.pdf
Desenho	FIGURAS.pdf
Reivindicação	Reivindicações.pdf
Resumo	RESUMO.pdf
Comprovante de pagamento de GRU 200	Comprovante pgto GRU do depósito.pdf
Procuração	Procuração UFG.pdf
Termo de Posse Reitor UFG	Termo de Posse Prof. Edward Brasil.pdf
Documentos Reitor UFG	Documentos de Identificação do Reitor UFG.pdf
DOU - Nomeação Reitor UFG	Diário Oficial Prof. Edward.pdf
Estatuto da UnB	Estatuto da UnB.pdf

Acesso ao Patrimônio Genético

- Declaração Negativa de Acesso - Declaro que o objeto do presente pedido de patente de invenção não foi obtido em decorrência de acesso à amostra de componente do Patrimônio Genético Brasileiro, o acesso foi realizado antes de 30 de junho de 2000, ou não se aplica.

Declaração de veracidade

- Declaro, sob as penas da lei, que todas as informações acima prestadas são completas e verdadeiras.

**PETICIONAMENTO
ELETRÔNICO**

Esta solicitação foi enviada pelo sistema Petição Eletrônica em 28/02/2018 às 18:33, Petição 870180016381

REFERÊNCIAS

- AHMAD, W.; HAQUE, M. ul; BRANCOLINI, V.; TSOU, H. Alopecia universalis associated with a mutation in the human hairless gene, 1998.
- AHMED, T. A.; AL-ABD, A. M. Effect of finasteride particle size reduction on its pharmacokinetic, tissue distribution and cellular permeation. **Drug Delivery**, v. 25, n. 1, p. 555–563, 2018.
- AHN, S.; JUNG, S. Y.; LEE, S. J. Gold Nanoparticle Contrast Agents in Advanced X-ray Imaging Technologies. **Molecules**, v. 18, n. 5, p. 5858–5890, 2013.
- ALCANTARA, G. B. Nanopartículas de maguemiga complexadas com ácido oleico, p. 114, 2007.
- ALCANTARA, G. B.; PATERNO, L. G.; AFONSO, A. S.; FARIA, R. C.; PEREIRA-DA-SILVA, M. A.; MORAIS, P. C.; SOLER, M. A. G. Adsorption of cobalt ferrite nanoparticles within layer-by-layer films: a kinetic study carried out using quartz crystal microbalance. **Physical Chemistry Chemical Physics**, v. 13, n. 48, p. 21233, 2011.
- ALCANTARA, G. B.; PATERNO, L. G.; FONSECA, F. J.; PEREIRA-DA-SILVA, M. A.; MORAIS, P. C.; SOLER, M. A. G. Dielectric properties of cobalt ferrite nanoparticles in ultrathin nanocomposite films. **Physical Chemistry Chemical Physics**, v. 15, n. 45, p. 19853, 2013. a.
- ALCANTARA, G.; PATERNO, L.; FONSECA, F.; PEREIRA-DA-SILVA, M.; MORAIS, P.; SOLER, M. G. Layer-by-Layer Assembled Cobalt Ferrite Nanoparticles for Chemical Sensing. **Journal of Nanofluids**, v. 2, n. 3, p. 175–183, 2013. b.
- ALJUFFALI, I. A.; SUNG, C. T.; SHEN, F.; HUANG, C.; FANG, J. Squarticles as a Lipid Nanocarrier for Delivering Diphencyprone and Minoxidil to Hair Follicles and Human Dermal Papilla Cells. **American Association of Pharmaceutical Scientists**, v. 16, n. 1, p. 140–150, 2014.
- ALVES, R.; GRIMALT, R. Androgenetic Alopecia in Adolescents. In: **Practical Pediatric Dermatology**. Cham: Springer International Publishing, 2016. p. 187–196.
- ANGELO, T.; BARBALHO, G. N.; GELFUSO, G. M.; GRATIERI, T. Minoxidil topical treatment may be more efficient if applied on damp scalp in comparison with dry scalp. **Dermatologic Therapy**, v. 29, n. 5, p. 330–333, 2016. a.
- ANGELO, T.; PIRES, F. Q.; GELFUSO, G. M.; DA SILVA, J. K. R.; GRATIERI, T.; CUNHA-FILHO, M. S. S. Development and validation of a selective HPLC-UV method for thymol determination in skin permeation experiments. **Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences**, v. 1022, p. 81–86, 2016. b.
- ANTONIO, J. R.; ANTÔNIO, C. R.; CARDEAL, I. L. S.; BALLAVENUTO, J. M. A.; OLIVEIRA, J. R. Nanotechnology in dermatology. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 89, n. 1, p. 126–136, 2014.
- ANVISA. **Resolução - RE nº 899, de 29 de maio de 2003**.
- B. RIBEIRO, E.; C. HONORIO-FRANÇA, A.; L. FRANÇA, E.; A. G. SOLER, M. Design and Development of Nanoemulsion Systems Containing Interferon Gamma. **Protein & Peptide Letters**, v. 23, n. 7, p. 626–638, 2016.
- BANKA, N.; BUNAGAN, M.; SHAPIRO, J. Pattern hair loss in men: diagnosis and medical treatment. **Dermatologic clinics**, v. 31, p. 129–140, 2013.
- BAROLI, B.; ENNAS, M. G.; LÖFFREDO, F.; ISOLA, M.; PINNA, R.; LÓPEZ-QUINTELA, M. A. Penetration of metallic nanoparticles in human full-thickness skin. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 127, n. 7, p. 1701–1712, 2007.
- BASAVAIAH, K.; CHANDRASHEKAR, U.; PRAMEELA, H. C. Sensitive spectrophotometric determination of amlodipine and felodipine using iron(III) and ferricyanide. **Farmaco (Societa chimica italiana : 1989)**, v. 58, n. 2, p. 141–8, 2003.
- BAYNE, C.; DONNELLY, F.; ROSS, M.; HABIB, F. Serenoa repens (Permixon®): A 5 α -reductase types I and II inhibitor—new evidence in a coculture model of BPH. **The Prostate**, 1999.
- BEAUCHEMIN, D. Inductively coupled plasma mass spectrometry. **Analytical chemistry**, v. 78, n. 12, p. 4111–36, 2006.
- BIENOVÁ, M.; KUCEROVÁ, R.; FIURÁSKOVÁ, M.; HAJDÚCH, M.; KOLÁŘ, Z. Androgenetic alopecia and current methods of treatment. **Acta dermatovenerologica Alpina**,

Pannonica, et Adriatica, v. 14, n. 1, p. 5–8, 2005.

BIRCH, M. P.; MESSENGER, J. F.; MESSENGER, A. G. Hair density, hair diameter and the prevalence of female pattern hair loss. **British Journal of Dermatology**, v. 144, n. 2, p. 297–304, 2001.

BIRUSS, B.; DIETL, R.; VALENTA, C. The influence of selected steroid hormones on the physicochemical behaviour of DPPC liposomes. **Chemistry and Physics of Lipids**, v. 148, n. 2, p. 84–90, 2007.

BIRUSS, B.; VALENTA, C. Skin permeation of different steroid hormones from polymeric coated liposomal formulations. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 62, n. 2, p. 210–219, 2006.

BLUMEYER, A.; TOSTI, A.; MESSENGER, A. Evidence-based (S3) guideline for the treatment of androgenetic alopecia in women and in men. **der Deutschen Dermatologischen Gesellschaft**, v. 9, p. 1–57, 2011.

BOUTRY, S.; FORGE, D.; BURTEA, C.; MAHIEU, I.; MURARIU, O.; LAURENT, S.; VANDER ELST, L.; MULLER, R. N. How to quantify iron in an aqueous or biological matrix: a technical note. **Contrast Media & Molecular Imaging**, v. 4, n. 6, p. 299–304, 2009.

BROMBERG, L.; RADUYK, S.; HATTON, T. A. Functional Magnetic Nanoparticles for Biodefense and Biological Threat Monitoring and Surveillance. **Analytical Chemistry**, v. 81, n. 14, p. 5637–5645, 2009.

CAO, D.; LI, H.; PAN, L.; LI, J.; WANG, X.; JING, P.; CHENG, X.; WANG, W.; WANG, J.; LIU, Q. High saturation magnetization of γ -Fe₂O₃ nano-particles by a facile one-step synthesis approach. **Scientific Reports**, v. 6, p. 1–9, 2016.

CARAZO, E.; BORREGO-SÁNCHEZ, A.; GARCÍA-VILLÉN, F.; SÁNCHEZ-ESPEJO, R.; CERESO, P.; AGUZZI, C.; VISERAS, C. Advanced Inorganic Nanosystems for Skin Drug Delivery. **The Chemical Record**, v. 18, n. 7–8, p. 891–899, 2018.

CASTRO, G. A.; FERREIRA, L. A. Novel vesicular and particulate drug delivery systems for topical treatment of acne. **Expert Opinion on Drug Delivery**, v. 5, n. 6, p. 665–679, 2008.

CEVC, G.; VIÉRL, U. Nanotechnology and the transdermal route: a state of the art review and critical appraisal. **Journal of Controlled Release**, 2010.

CHAMRITSKI, I.; BURNS, G. Infrared- and Raman-Active Phonons of Magnetite, Maghemite, and Hematite: A Computer Simulation and Spectroscopic Study. **J. Phys. Chem. B**, v. 109, p. 4965–4968, 2005.

CHANG, Y.-K.; LIU, Y.-P.; HO, J. H.; HSU, S.-C.; LEE, O. K. Amine-surface-modified superparamagnetic iron oxide nanoparticles interfere with differentiation of human mesenchymal stem cells. **Journal of orthopaedic research : official publication of the Orthopaedic Research Society**, v. 30, n. 9, p. 1499–506, 2012.

CHAVES, S. B. **Efeitos biológicos de nanopartículas magnéticas recobertas por bicamada de ácido láurico : estudos in vitro e in vivo**, 2008.

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, 2016.

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.

COLE, A. J.; DAVID, A. E.; WANG, J.; GALBÁN, C. J.; HILL, H. L.; YANG, V. C. Polyethylene glycol modified, cross-linked starch-coated iron oxide nanoparticles for enhanced magnetic tumor targeting. **Biomaterials**, v. 32, n. 8, p. 2183–2193, 2011.

COLE, A.; YANG, V.; DAVID, A. Cancer theranostics: the rise of targeted magnetic nanoparticles. **Trends in biotechnology**, v. 29, n. 7, p. 323–332, 2011

CORCHERO, J. L.; VILLAVERDE, A. Biomedical applications of distally controlled magnetic nanoparticles. **Trends in Biotechnology**, v. 27, n. 8, p. 468–476, 2009.

CORNELL, R. M.; SCHWERTMANN, U. **The iron oxides : structure, properties, reactions, occurrences, and uses**. Wiley-VCH, 2003.

COTSARELIS, G.; MILLAR, S. Towards a molecular understanding of hair loss and its treatment. **Trends in molecular medicine**, 2001.

CRANWELL, W.; SINCLAIR, R. **Male Androgenetic Alopecia**, 2000.

CRAYTON, S. H.; ELIAS, D. R.; AL ZAKI, A.; CHENG, Z.; TSOURKAS, A. ICP-MS analysis of lanthanide-doped nanoparticles as a non-radiative, multiplex approach to quantify biodistribution and blood clearance. **Biomaterials**, v. 33, n. 5, p. 1509–1519, 2012.

DA SILVA, L. M.; MONTANARI, C. M.; SANTOS, O. M. M.; CAZEDEY, E. C. L.; ÂNGELO, M. L.; DE ARAÚJO, M. B. Quality evaluation of the Finasteride polymorphic forms I and II in capsules. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 105, p. 24–31, 2015.

DADASHZADEH, E. R.; HOBSON, M.; HENRY BRYANT, L.; DEAN, D. D.; FRANK, J. A. Rapid spectrophotometric technique for quantifying iron in cells labeled with superparamagnetic iron oxide nanoparticles: potential translation to the clinic. **Contrast media & molecular imaging**, v. 8, n. 1, p. 50–6, 2013.

DALLOB, A. L.; SADICK, N. S.; UNGER, W.; LIPERT, S.; GEISSLER, L. A.; GREGOIRE, S. L.; NGUYEN, H. H.; MOORE, E. C.; TANAKA, W. K. The effect of finasteride, a 5 alpha-reductase inhibitor, on scalp skin testosterone and dihydrotestosterone concentrations in patients with male pattern baldness. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 79, n. 3, p. 703–706, 1994.

DE FREITAS, E. R. L.; SOARES, P. R. O.; DE PAULA SANTOS, R.; DOS SANTOS, R. L.; DA SILVA, J. R.; PORFIRIO, E. P.; BÁO, S. N.; DE OLIVEIRA LIMA, E. C.; MORAIS, P. C.; GUILLO, L. A. In Vitro Biological Activities of Anionic γ -Fe₂O₃ Nanoparticles on Human Melanoma Cells. **Journal of Nanoscience and Nanotechnology**, v. 8, n. 5, p. 2385–2391, 2008.

DE SÁ, F. A. P.; TAVEIRA, S. F.; GELFUSO, G. M.; LIMA, E. M.; GRATIERI, T. Liposomal voriconazole (VOR) formulation for improved ocular delivery. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 133, p. 331–338, 2015.

DEACON, G. Relationships between the carbon-oxygen stretching frequencies of carboxylato complexes and the type of carboxylate coordination. **Coordination Chemistry Reviews**, v. 33, n. 3, p. 227–250, 1980.

DÉLOS, S.; IEHLÉ, C.; MARTIN, P.; RAYNAUD, J. Inhibition of the activity of 'basic' 5 α -reductase (type 1) detected in DU 145 cells and expressed in insect cells. **The Journal of steroid**, 1994.

DELOUISE, L. A. Applications of Nanotechnology in Dermatology. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 132, n. 10, p. 964–975, 2012.

DESMOND, CHIA CHIN GAN, SINCLAR, R. Androgenetic alopecia. In: **Men's Health Third Edition**. Chapterp. 352–366.

DIES, H.; CHEUNG, B.; TANG, J.; RHEINSTÄDTER, M. C. The organization of melatonin in lipid membranes. **Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes**, v. 1848, n. 4, p. 1032–1040, 2015.

EL-HAMMADI, M.; ARIAS, J. Iron oxide-based multifunctional nanoparticulate systems for biomedical applications: a patent review (2008–present). **Expert opinion on therapeutic patents**, 2015. a.

ESPINOSA, A.; DI CORATO, R.; KOLOSNAJ-TABI, J.; FLAUD, P.; PELLEGRINO, T.; WILHELM, C. Duality of Iron Oxide Nanoparticles in Cancer Therapy: Amplification of Heating Efficiency by Magnetic Hyperthermia and Photothermal Bimodal Treatment. **ACS Nano**, v. 10, n. 2, p. 2436–2446, 2016.

EUROPEAN PHARMACOPOEIA a. **European Pharmacopoeia**. 6. ed. Strasbourg Cedex, France .

EUROPEAN PHARMACOPOEIA b. **European Pharmacopoeia**. 6. ed. Strasbourg Cedex, France.

FRELEK, J.; GÓRECKI, M.; DZIEDZIC, A.; JABŁOŃSKA, E.; KAMIENSKI, B.; WOJCIESZCZYK, R. K.; LUBORADZKI, R.; SZCZEPEK, W. J. Comprehensive spectroscopic characterization of finasteride polymorphic forms. Does the form X exist? **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 104, n. 5, p. 1650–1657, 2014.

FU, L.; DRAVID, V. P.; JOHNSON, D. L. Self-assembled (SA) bilayer molecular coating on magnetic nanoparticles. **Applied Surface Science**, v. 181, n. 1–2, p. 173–178, 2001. GAO, J.; GU, H.; XU, B. Multifunctional magnetic nanoparticles: design, synthesis, and biomedical applications. **Accounts of chemical research**, v. 42, n. 8, p. 1097–1107, 2009.

GELFUSO, G. M.; BARROS, M. A. de O.; DELGADO-CHARRO, M. B.; GUY, R. H.; LOPEZ, R. F. V. Iontophoresis of minoxidil sulphate loaded microparticles, a strategy for follicular drug targeting? **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 134, p. 408–412, 2015.

GELFUSO, G. M.; GRATIERI, T.; SIMÃO, P. S.; DE FREITAS, L. A. P.; LOPEZ, R. F. V. Chitosan microparticles for sustaining the topical delivery of minoxidil sulphate. **Journal of Microencapsulation**, v. 28, n. 7, p. 650–658, 2011.

GOMES, D. S. B.; PATERNO, L. G.; SANTOS, A. B. S.; GARAY, A. V.; MERTZ, D.; FREITAS, S. M.; SOLER, M. A. G. New insights on the formation of gold nanoparticles and Pluronic nanocomposites: Kinetics and thermodynamics parameters. **Journal of Molecular Liquids**, v. 268, p. 181–189, 2018.

GOMES, M. J.; MARTINS, S.; FERREIRA, D.; SEGUNDO, M. A.; REIS, S. Lipid nanoparticles for topical and transdermal application for alopecia treatment: Development, physicochemical characterization, and in vitro release and penetration studies. **International Journal of Nanomedicine**, [s. l.], v. 9, n. 1, p. 1231–1242, 2014.

GORDON, K.; TOSTI, A. Alopecia: evaluation and treatment. **Clin Cosmet Investig Dermatol**, v. 4, p. 101–106, 2011.

GOREN, A.; NACCARATO, T. Minoxidil in the treatment of androgenetic alopecia. **Dermatologic Therapy**, [s. l.], v. 31, n. 5, p. e12686, 2018.

GUBIN, S. P. (Sergei P. **Magnetic nanoparticles**. Wiley-VCH, 2009.

GUO, H.; WYART, Y.; PEROT, J.; NAULEAU, F.; MOULIN, P. Application of magnetic nanoparticles for UF membrane integrity monitoring at low-pressure operation. **Journal of Membrane Science**, v. 350, n. 1–2, p. 172–179, 2010.

GUPTA, A.; CHARRETTE, A. The efficacy and safety of 5 α -reductase inhibitors in androgenetic alopecia: a network meta-analysis and benefit–risk assessment of finasteride and dutasteride. **Journal of Dermatological Treatment**, 2014.

GUR, S.; KADOWITZ, P.; HELLSTROM, W. Effects of 5-alpha reductase inhibitors on erectile function, sexual desire and ejaculation. **Expert opinion on drug safety**, 2013.

GUTIÉRREZ, L.; ROMERO, S.; DA SILVA, G. B.; COSTO, R.; VARGAS, M. D.; RONCONI, C. M.; SERNA, C. J.; VEINTEMILLAS-VERDAGUER, S.; DEL PUERTO MORALES, M. Degradation of magnetic nanoparticles mimicking lysosomal conditions followed by AC susceptibility. **Biomedical Engineering / Biomedizinische Technik**, v. 60, n. 5, p. 417–425, 2015.

HAJHEYDARI, Z.; AKBARI, J.; SAEEDI, M. Comparing the therapeutic effects of finasteride gel and tablet in treatment of the androgenetic alopecia. **Indian Journal of**, v. 75, n. 1, p. 47–51, 2009.

HANESCH, M. Raman spectroscopy of iron oxides and (oxy)hydroxides at low laser power and possible applications in environmental magnetic studies. **Geophysical Journal International**, v. 177, n. 3, p. 941–948, 2009.

HERRERA, W. T.; RAMOS GUIVAR, J. A.; GONZÁLEZ, J. C.; BAGGIO-SAITOVITCH, E. M. Structural and vibrational studies of fatty acids-functionalized iron oxide nanoparticles via alkaline co-precipitation route. In: NANOCON 2015 - 7TH INTERNATIONAL CONFERENCE ON NANOMATERIALS - RESEARCH AND APPLICATION, CONFERENCE PROCEEDINGS 2015.

HIGGINS, C. A.; CHRISTIANO, A. M. Regenerative medicine and hair loss: how hair follicle culture has advanced our understanding of treatment options for androgenetic alopecia. **Regenerative Medicine**, v. 9, n. 1, p. 101–111, 2014.

HORNUNG, A.; POETTLER, M.; FRIEDRICH, R. P.; WEIGEL, B.; DUERR, S.; ZALOGA, J.; CICHA, I.; ALEXIOU, C.; JANKO, C. Toxicity of Mitoxantrone-loaded Superparamagnetic Iron Oxide Nanoparticles in a HT-29 Tumour Spheroid Model. **Anticancer research**, v. 36, n. 6, p. 3093–101, 2016.

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.

IEHLÉ, C.; DÉLOS, S.; GUIROU, O.; TATE, R.; RAYNAUD, J. P.; MARTIN, P. M. Human prostatic steroid 5 alpha-reductase isoforms-a comparative study of selective inhibitors. **The Journal of steroid biochemistry and molecular biology**, v. 54, n. 5–6, p. 273–9, 1995.

INUI, S.; ITAMI, S. Molecular basis of androgenetic alopecia: From androgen to paracrine mediators through dermal papilla. **Journal of dermatological science**, 2011.

INUI, S.; ITAMI, S. Androgen actions on the human hair follicle: perspectives. **Experimental dermatology**, 2013.

IOCCA, D. C. Síntese, caracterização, estabilidade e efeitos biológicos in vitro de nanopartícula

magnética asociada a anfotericina b, 2013.

JACINTHO, G. V. M.; BROLO, A. G.; CORIO, P.; SUAREZ, P. a Z.; RUBIM, J. C. Structural Investigation of MFe_2O_4 ($M = Fe, Co$) Magnetic Fluids. **The Journal of Physical Chemistry C**, v. 113, n. 18, p. 7684–7691, 2009.

JAIN, B.; SINGH, B.; KATARE, O. P.; VYAS, S. P. Development and characterization of minoxidil-loaded liposomal system for delivery to pilosebaceous units. **Journal of Liposome Research**, v. 20, n. 2, p. 105–114, 2009.

JAIN, T. K.; REDDY, M. K.; MORALES, M. A.; LESLIE-PELECKY, D. L.; LABHASETWAR, V. Biodistribution, Clearance, and Biocompatibility of Iron Oxide Magnetic Nanoparticles in Rats. **Molecular Pharmaceutics**, v. 5, n. 2, p. 316–327, 2008.

JANKOVIC, SLOBODAN M JANKOVIC, S. e. Dermatology Online Journal UC Davis. **Dermatology Online Journal**, v. 4, n. 1, p. 1–19, 1998.

JIN, X.; CHALMERS, J. J.; ZBOROWSKI, M. Iron transport in cancer cell culture suspensions measured by cell magnetophoresis. **Analytical chemistry**, v. 84, n. 10, p. 4520–6, 2012.

JUBB, A. M.; ALLEN, H. C. Vibrational spectroscopic characterization of hematite, maghemite, and magnetite thin films produced by vapor deposition. **ACS Applied Materials and Interfaces**, v. 2, n. 10, p. 2804–2812, 2010.

KALIYADAN, F.; NAMBIAR, A.; VIJAYARAGHAVAN, S. Androgenetic alopecia: An update. **Indian Journal of Dermatology, Venereology, and Leprology**, v. 79, n. 5, p. 613, 2013.

KANG, Y.; RISBUD, S.; RABOLT, J.; STROEVE, P. Synthesis and characterization of nanometer-size Fe_3O_4 and $\gamma-Fe_2O_3$ particles. **Chemistry of Materials**, 1996.

KANTI, V.; HILLMANN, K.; KOTTNER, J.; STROUX, A.; CANFIELD, D.; BLUME-PEYTAVI, U. Effect of minoxidil topical foam on frontotemporal and vertex androgenetic alopecia in men: a 104-week open-label clinical trial. **Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology**, v. 30, n. 7, p. 1183–1189, 2016.

KAUFMAN, K. D.; ROTONDA, J.; SHAH, A. K.; MEEHAN, A. G. Long-term treatment with finasteride 1 mg decreases the likelihood of developing further visible hair loss in men with androgenetic alopecia (male pattern hair loss). **European Journal of Dermatology**, v. 18, n. 4, p. 400–406, 2008.

KAUFMAN, K.; ROTONDA, J.; SHAH, A. alopecia (male pattern hair loss) Long-term treatment with finasteride 1 mg decreases the likelihood of developing further visible hair loss in men with androgenetic. **European Journal of**, 2008.

KIM, N. A.; CHOI, D. H.; LIM, J. Y.; KIM, K. H.; LIM, D. G.; LEE, E.; PARK, E. S.; JEONG, S. H. Investigation of polymeric excipients for dutasteride solid dispersion and its physicochemical characterization. **Archives of Pharmacal Research**, v. 37, n. 2, p. 214–224, 2014.

KLIGMAN, A. M. The Human Hair Cycle. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 33, n. 6, p. 307–316, 1959.

KOLOSNAJ-TABI, J.; LARTIGUE, L.; JAVED, Y.; LUCIANI, N.; PELLEGRINO, T.; WILHELM, C.; ALLOYEAU, D.; GAZEAU, F. Biotransformations of magnetic nanoparticles in the body. **Nano Today**, v. 11, n. 3, p. 280–284, 2016.

KRATZ, F. Albumin as a drug carrier: Design of prodrugs, drug conjugates and nanoparticles. **Journal of Controlled Release**, v. 132, n. 3, p. 171–183, 2008.

KRAUSE, K.; FOITZIK, K. Biology of the hair follicle: the basics. **Seminars in cutaneous medicine and surgery**, v. 25, n. 1, p. 2–10, 2006.

KUMAR, C. S. S. R. **Raman spectroscopy for nanomaterials characterization**. Springer Science & Business Media, 2012.

KUMAR, R.; SINGH, B.; BAKSHI, G.; KATARE, O. P. Development of Liposomal Systems of Finasteride for Topical Applications: Design, Characterization, and In Vitro Evaluation. **Pharmaceutical Development and Technology**, v. 12, n. 6, p. 591–601, 2007.

LACAVA, L. M.; LACAVA, Z. G. M.; AZEVEDO, R. B.; CHAVES, S. B.; GARCIA, V. A. P.; SILVA, O.; PELEGRINI, F.; BUSKE, N.; GANSAU, C.; DA SILVA, M. F.; MORAIS, P. C. Use of magnetic resonance to study biodistribution of dextran-coated magnetic fluid intravenously administered in mice. **Journal of Magnetism and Magnetic Materials**, v. 252, n. 1–3 SPEC. ISS., p. 367–369, 2002.

LADEMANN, J.; RICHTER, H.; SCHAEFER, U. F.; BLUME-PEYTAVI, U.; TEICHMANN, A.; OTBERG, N.; STERRY, W. Hair Follicles – A Long-Term Reservoir for Drug Delivery. **Skin**

Pharmacology and Physiology, v. 19, n. 4, p. 232–236, 2006.

LADEMANN, J.; RICHTER, H.; TEICHMANN, A.; OTBERG, N.; BLUME-PEYTAVI, U.; LUENGO, J.; WEISS, B.; SCHAEFER, U. F.; LEHR, C.-M.; WEPF, R.; STERRY, W. Nanoparticles – An efficient carrier for drug delivery into the hair follicles. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 66, n. 2, p. 159–164, 2007.

LAPTEVA, M.; KALIA, Y. Microstructured bicontinuous phase formulations: their characterization and application in dermal and transdermal drug delivery. **Expert opinion on drug delivery**, 2013.

ŁASZCZ, M.; TRZCIŃSKA, K.; WITKOWSKA, A.; LIPIEC-ABRAMSKA, E.; SZCZEPEK, W. J. Phase transition studies of dutasteride crystalline forms. **CrystEngComm**, v. 17, n. 11, p. 2346–2352, 2015.

LAWRENCE, M. J.; REES, G. D. Microemulsion-based media as novel drug delivery systems. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 64, p. 175–193, 2012.

LEE, M. J.-E.; VEISEH, O.; BHATTARAI, N.; SUN, C.; HANSEN, S. J.; DITZLER, S.; KNOBLAUGH, S.; LEE, D.; ELLENBOGEN, R.; ZHANG, M.; OLSON, J. M. Rapid pharmacokinetic and biodistribution studies using choleroxin-conjugated iron oxide nanoparticles: a novel non-radioactive method. **PloS one**, v. 5, n. 3, p. e9536, 2010. a.

LEE, S. E.; CHOI, K. J.; MENON, G. K.; KIM, H. J.; CHOI, E. H.; AHN, S. K.; LEE, S. H. Penetration pathways induced by low-frequency sonophoresis with physical and chemical enhancers: Iron oxide nanoparticles versus lanthanum nitrates. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 130, n. 4, p. 1063–1072, 2010. b.

LEGODI, M. A.; WAAL, D. The preparation of magnetite, goethite, hematite and maghemite of pigment quality from mill scale iron waste. **Dyes and Pigments**, v. 74, n. 1, p. 161–168, 2006.

LENANE, P.; MACARTHUR, C.; PARKIN, P. C.; KRAFCHIK, B.; DEGROOT, J.; KHAMBALIA, A.; POPE, E. Clobetasol propionate, 0.05%, vs hydrocortisone, 1%, for alopecia areata in children: a randomized clinical trial. **JAMA Dermatology**, v. 150, n. 1, p. 47–50, 2014.

LENIN, R.; JOY, P. A. Role of Primary and Secondary Surfactant Layers on the Thermal Conductivity of Lauric Acid Coated Magnetite Nanofluids. **The Journal of Physical Chemistry C**, v. 120, n. 21, p. 11640–11651, 2016.

LETTI, C. J. **Estudo de nanocompósitos formados por partículas de óxidos de ferro e polímeros por meio da Espectroscopia Raman**. 2013.

LETTI, C. J.; PATERNO, L. G.; PEREIRA-DA-SILVA, M. A.; MORAIS, P. C.; SOLER, M. A. G. The role of polymer films on the oxidation of magnetite nanoparticles. **Journal of Solid State Chemistry**, v. 246, p. 57–64, 2017.

LEVY, M.; LUCIANI, N.; ALLOYEAU, D.; ELGRABLI, D.; DEVEAUX, V.; PECHOUX, C.; CHAT, S.; WANG, G.; VATS, N.; GENDRON, F.; FACTOR, C.; LOTERSZTAJN, S.; LUCIANI, A.; WILHELM, C.; GAZEAU, F. Long term in vivo biotransformation of iron oxide nanoparticles. **Biomaterials**, v. 32, n. 16, p. 3988–3999, 2011.

LEW, B.-L.; SHIN, M.-K.; SIM, W.-Y. Acute diffuse and total alopecia: A new subtype of alopecia areata with a favorable prognosis. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 60, n. 1, p. 85–93, 2009.

LI, W.; ZALOGA, J.; DING, Y.; LIU, Y.; JANKO, C.; PISCHETSRIEDER, M.; ALEXIOU, C.; BOCCACCINI, A. R.; SCHMIDT-BURKHARDT CHAIR, H. Facile preparation of multifunctional superparamagnetic PHBV microspheres containing SPIONs for biomedical applications OPEN. **Nature Publishing Group**, 2016.

LOLLI, F.; PALLOTTI, F.; ROSSI, A.; FORTUNA, M. C.; CARO, G.; LENZI, A.; SANSONE, A.; LOMBARDO, F. Androgenetic alopecia : a review. **Endocrine**, 2017.

LONG, Y.; CHEN, L.; YU, X.; LENG, Z.; HU, J.; YU, X. Facile Synthesis and Special Phase Transformation of Hydrophilic Iron Oxides Nanoparticles. **Journal of Nanomaterials**, v. 2017, p. 1–5, 2017.

LUDWIG, E. Classification of the types of androgenetic alopecia (common baldness) occurring in the female sex. **The British Journal of Dermatology**, v. 97, n. 3, p. 247–254, 1977.

MACDONALD, G. **GSK Japão atrasa o lançamento de drogas de alopecia após a parada de fabricação da Catalent**. 2015.

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.; THAPA, R. K.; RHYU, J. Y.; CHOI, H. Y.; KIM, J. O.; YONG, C. S.; YOO, B. K. Design and in vitro evaluation of finasteride-loaded liquid crystalline nanoparticles for topical delivery. **AAPS PharmSciTech**, v. 14, n. 1, p. 45–52, 2013. a.

MADHESWARAN, T.; BASKARAN, R.; YONG, C. S.; YOO, B. K. Enhanced Topical Delivery of Finasteride Using Glyceryl Monooleate-Based Liquid Crystalline Nanoparticles Stabilized by Cremophor Surfactants. **AAPS PharmSciTech**, v. 15, n. 1, p. 44–51, 2013. b.

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.

MANDEVILLE, J. B.; MOORE, J.; CHESLER, D. A.; GARRIDO, L.; WEISSLEDER, R.; WEISSKOFF, R. M. Dynamic liver imaging with iron oxide agents: effects of size and biodistribution on contrast. **Magnetic resonance in medicine**, v. 37, n. 6, p. 885–90, 1997.

MATOS, B. N. Desenvolvimento de uma formulação tópica contendo nanopartículas de quitosana como estratégia para aumentar a penetração folicular do minoxidil sulfato no tratamento da alopecia androgênica, 2014.

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.

MAURIZI, L.; SAKULKHU, U.; GRAMOUN, A.; VALLEE, J.-P.; HOFMANN, H. A fast and reproducible method to quantify magnetic nanoparticle biodistribution. **The Analyst**, v. 139, n. 5, p. 1184–1191, 2014.

MEJÍAS, R.; GUTIÉRREZ, L.; SALAS, G.; PÉREZ-YAGÜE, S.; ZOTES, T. M.; LÁZARO, F. J.; MORALES, M. P.; BARBER, D. F. Long term biotransformation and toxicity of dimercaptosuccinic acid-coated magnetic nanoparticles support their use in biomedical applications. **Journal of Controlled Release**, v. 171, n. 2, p. 225–233, 2013.

MESSIAS, C.; SANTOS, B. Estudo pela técnica SERS do arranjo de moléculas bioativas adsorvidas em nanopartículas de óxido de ferro e de suas aplicações em sistemas biológicos, 2012.

MIGUEL, L.; RIVERA, R. Síntese de complexos nanoestruturados formados por óxidos de ferro e sulfato de condroitina, 2013.

MOFTAH, N.; ABD-ELAZIZ, G.; AHMED, N. Mesotherapy using dutasteride-containing preparation in treatment of female pattern hair loss: photographic, morphometric and ultrastuctural evaluation. **of Dermatology**, 2013.

MORAIS, P. C.; LARA, M. C. F. L.; TOURINHO, F. A. A Resonance Study of Magnetic Interaction in Single-Particle Systems and Agglomerates. **Journal of Magnetic Resonance, Series A**, v. 121, n. 1, p. 70–73, 1996.

MORAIS, P. C.; LARA, M. C. F. L.; TRONCONI, A. L.; TOURINHO, F. A.; PEREIRA, A. R.; PELEGRINI, F. Magnetic particle–particle interaction in frozen magnetic fluids. **Journal of Applied Physics**, v. 79, n. 10, p. 7931–7935, 1996.

MORAIS, P. C.; LARA, M. C. L.; NETO, K. S. Electron spin resonance in superparamagnetic particles dispersed in a non-magnetic matrix. **Philosophical Magazine Letters**, v. 55, n. 4, p. 181–183, 1987.

MORAIS, P. C.; LIMA, E. C. D.; RABELO, D.; REIS, A. C.; PELEGRINI, F. Magnetic resonance of magnetite nanoparticles dispersed in mesoporous copolymer matrix. **IEEE Transactions on Magnetics**, v. 36, n. 5, p. 3038–3040, 2000. a.

MORAIS, P. C.; WILLIAM DA SILVA, S.; GODOY SOLER, M. A.; BUSKE, N. Raman Investigation of Uncoated and Coated Magnetic Fluids. **The Journal of Physical Chemistry A**, v. 104, n. 13, p. 2894–2896, 2000. b.

MORAIS, P.; SILVA, S. Da; SOLER, M.; BUSKE, N. Raman spectroscopy in magnetic fluids. **Biomolecular engineering**, v. 17, p. 41–49, 2001.

MOSINIEWICZ-SZABLEWSKA, E.; CLAVIJO, A. R.; CASTILHO, A. P. O. R.; PATERNO, L. G.; PEREIRA-DA-SILVA, M. A.; WIĘCKOWSKI, J.; SOLER, M. A. G.; MORAIS, P. C. Magnetic studies of layer-by-layer assembled polyvinyl alcohol/iron oxide nanofilms. **Physical Chemistry Chemical Physics**, v. 20, n. 41, p. 26696–26709, 2018.

MURA, S.; PIROT, F.; MANCONI, M.; FADDA, A. M.; I, C. B. L.; PHARMACEUTIQUES, S. Liposomes and niosomes as potential carriers for dermal delivery of minoxidil. **Journal of Drug Targeting**, v. 15, n. 2, p. 101–108, 2007. a.

MURA, S.; PIROT, F.; MANCONI, M.; FALSON, F.; FADDA, A. M. Liposomes and niosomes as potential carriers for dermal delivery of minoxidil. **Journal of Drug Targeting**, v. 15, n. 2, p. 101–108, 2007. b.

MYSORE, V. Finasteride and sexual side effects. **Indian dermatology online journal**, v. 3, n. 1, p. 62–65, 2012.

NAKAMOTO, K. **Infrared and Raman Spectra of Inorganic and Coordination Compounds**. Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc., 2008.

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**, v. 117, p. 372–384, 2017.

NUNES, E. S.; LIMA, E. C. D.; SOLER, M. a G.; SILVA, F. R. L.; AZEVEDO, R. B.; MORAIS, P. C. Evidence of iron (III) reduction in γ -Fe₂O₃ nanoparticles due to meso-2,3-dimercaptosuccinic acid functionalization. **Materials Research Express**, v. 1, n. 1, p. 016107, 2014.

OLIVEIRA, M.; LEMOS, M.; CARNEIRO, B.; LUCIANA, J.; SIQUEIRA, N. Development of a Promising Antitumor Compound Based on Rhodium (II) Succinate Associated with Iron Oxide Nanoparticles Coated with Lauric Acid / Albumin Hybrid : Synthesis , Colloidal Stability and Cytotoxic Effect in Breast Carcinoma Cells. v. 17, p. 1–12, 2017.

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.

PADOIS, K.; CANTIÉNI, C.; BERTHOLLE, V.; BARDEL, C.; PIROT, F.; FALSON, F. Solid lipid nanoparticles suspension versus commercial solutions for dermal delivery of minoxidil. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 416, n. 1, p. 300–4, 2011.

PAPAKOSTAS, D.; RANCAN, F.; STERRY, W.; BLUME-PEYTAVI, U.; VOGT, A. Nanoparticles in dermatology. **Archives of Dermatological Research**, v. 303, n. 8, p. 533–550, 2011.

PARK, S. Y.; NA, S. Y.; KIM, J. H.; CHO, S.; LEE, J. H. Iron plays a certain role in patterned hair loss. **Journal of Korean Medical Science**, v. 28, n. 6, p. 934–938, 2013.

PAUS, R. Therapeutic strategies for treating hair loss. **Drug Discovery Today: Therapeutic Strategies**, v. 3, n. 1, p. 101–110, 2006.

PAUS, R.; FOITZIK, K. In search of the “hair cycle clock”: a guided tour. **Differentiation; research in biological diversity**, v. 72, n. 9–10, p. 489–511, 2004.

PENG, D.; HUANG, K.; LIU, Y.; LIU, S. Preparation of novel polymeric microspheres for controlled release of finasteride. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 342, n. 1–2, p. 82–86, 2007.

PEREIRA, M. N.; SCHULTE, H. L.; DUARTE, N.; LIMA, E. M.; SÁ-BARRETO, L. L.; GRATIERI, T.; GELFUSO, G. M.; CUNHA-FILHO, M. S. S. Solid effervescent formulations as new approach for topical minoxidil delivery. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 96, p. 411–419, 2017.

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. 593–604, 2018.

PERERA, E.; SINCLAIR, R. Androgenetic alopecia. In: **Textbook of Trichology**. v. 11p. 1–13.

PIRES, F. Q.; ANGELO, T.; SILVA, J. K. R.; BARRETO, L. C. L.; LIMA, E. M.; GELFUSO, G. M.; GRATIERI, T.; CUNHA-FILHO, M. S. S. Use of mixture design in drug-excipient compatibility determinations: Thymol nanoparticles case study. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 137, p. 196–203, 2017.

PLANZ, V.; LEHR, C.-M.; WINDBERGS, M. In vitro models for evaluating safety and efficacy of novel technologies for skin drug delivery. **Journal of Controlled Release**, v. 242, p. 89–104, 2016.

PLASSAT, V.; MARTINA, M. S.; BARRATT, G.; MÉNAGER, C.; LESIEUR, S. Sterically stabilized superparamagnetic liposomes for MR imaging and cancer therapy: Pharmacokinetics and

biodistribution. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 344, n. 1–2, p. 118–127, 2007.

PRAÇA, F. S. G.; MEDINA, W. S. G.; PETRILLI, R.; ELOY, J. O.; ASCENSO, A.; CAMPOS, P. M.; 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, n. April 2017, p. 121–132, 2018.

PRICE, V.; MENEFE, E.; SANCHEZ, M. Changes in hair weight in men with androgenetic alopecia after treatment with finasteride (1 mg daily): three-and 4-year results. **Journal of the American Academy of Dermatology**, 2006.

PRIDGEN, E. M.; ALEXIS, F.; KUO, T. T.; LEVY-NISSENBAUM, E.; KARNIK, R.; BLUMBERG, R. S.; LANGER, R.; FAROKHZAD, O. C. Transepithelial Transport of Fc-Targeted Nanoparticles by the Neonatal Fc Receptor for Oral Delivery. **Science Translational Medicine**, v. 5, n. 213, p. 213ra167-213ra167, 2013.

PROW, T.; GRICE, J.; LIN, L.; FAYE, R.; BUTLER, M. Nanoparticles and microparticles for skin drug delivery. **Advanced drug delivery**, 2011.

PY-DANIEL, K. R.; NAMBAN, J. S.; DE ANDRADE, L. R.; DE SOUZA, P. E. N.; PATERNO, L. G.; AZEVEDO, R. B.; SOLER, M. A. G. Highly efficient photodynamic therapy colloidal system based on chloroaluminum phthalocyanine/pluronic micelles. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 103, p. 23–31, 2016.

RABER, A. S.; MITTAL, A.; SCHÄFER, J.; BAKOWSKY, U.; REICHRATH, J.; VOGT, T.; SCHAEFER, U. F.; HANSEN, S.; LEHR, C. M. Quantification of nanoparticle uptake into hair follicles in pig ear and human forearm. **Journal of Controlled Release**, v. 179, n. 1, p. 25–32, 2014.

RAMEZANI, V.; HONARVAR, M.; SEYEDABADI, M.; KARIMOLLAH, A.; RANJBAR, A.; HASHEMI, M. Formulation and optimization of transdermal formulations containing minoxidil and caffeine, 2018.

RAMOS, A. P. **Espalhamento de Luz Dinâmico aplicado à caracterização de nanopartículas. In: Técnicas de nanocaracterização. Volume 3.** Elsevier ed. Rio de Janeiro.

RAMOS GUIVAR, J. A.; SADROLLAHI, E.; MENZEL, D.; RAMOS FERNANDES, E. G.; LÓPEZ, E. O.; TORRES, M. M.; ARSUAGA, J. M.; ARENCIBIA, A.; LITTERST, F. J. Magnetic, structural and surface properties of functionalized maghemite nanoparticles for copper and lead adsorption. **RSC Advances**, v. 7, n. 46, p. 28763–28779, 2017.

RAO, Y. F.; CHEN, W.; LIANG, X. G.; HUANG, Y. Z.; MIAO, J.; LIU, L.; LOU, Y.; ZHANG, X. G.; WANG, B.; TANG, R. K.; CHEN, Z.; LU, X. Y. Epirubicin-loaded superparamagnetic iron-oxide nanoparticles for transdermal delivery: Cancer therapy by circumventing the skin barrier. **Small**, v. 11, n. 2, p. 239–247, 2015.

RAO, Y.; ZHENG, F.; ZHANG, X.; GAO, J.; LIANG, W. In vitro percutaneous permeation and skin accumulation of finasteride using vesicular ethosomal carriers. **AAPS PharmSciTech**, v. 9, n. 3, p. 860–5, 2008.

RASHDAN, S.; BOUOUDINA, M.; AL-SAIE, A. Effect of the preparation route, PEG and annealing on the phase stability of Fe₃O₄ nanoparticles and their magnetic properties. **Journal of Experimental Nanoscience**, v. 8, n. 2, p. 210–222, 2013.

RATHNAYAKE, D.; SINCLAIR, R. Male androgenetic alopecia. **Expert opinion on pharmacotherapy**, v. 11, n. 8, p. 1295–304, 2010.

RAYNAUD, J. P.; COUSSE, H.; MARTIN, P. M. Inhibition of type 1 and type 2 5 alpha-reductase activity by free fatty acids, active ingredients of permixon(R). **Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology**, v. 82, n. 2–3, p. 233–239, 2002.

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, 2004.

RIVERA, L. M.; PATERNO, L. G.; CHAVES, N. L.; GREGUREC, D.; BÁO, S. N.; MOYA, S. E.; JAIN, M.; AZEVEDO, R. B.; MORAIS, P. C.; SOLER, M. A. G. Biocompatible superparamagnetic carriers of chondroitin sulfate. **Materials Research Express**, 2019.

ROGERS, N.; AVRAM, M. Medical treatments for male and female pattern hair loss. **Journal of the American Academy of Dermatology**, 2008.

ROJAS, J. M.; GAVILÁN, H.; DEL DEDO, V.; LORENTE-SOROLLA, E.; SANZ-ORTEGA, L.; DA SILVA, G. B.; COSTO, R.; PEREZ-YAGÜE, S.; TALELLI, M.; MARCIELLO, M.; MORALES, M. P.; BARBER, D. F.; GUTIÉRREZ, L. Time-course assessment of the aggregation and

- metabolization of magnetic nanoparticles. **Acta Biomaterialia**, v. 58, p. 181–195, 2017.
- ROOK, A. Endocrine influences on hair growth. **British medical journal**, 1965.
- ROQUE, L. V.; DIAS, S.; CRUZ, N.; ROBERTO, A. Design of Finasteride-Loaded Nanoparticles for Potential Treatment of Alopecia. **Skin Pharmacology and Physiology**, v. 30, p. 197–204, 2017.
- ROSSI, A.; ANZALONE, A.; FORTUNA, M. C.; CARO, G.; GARELLI, V.; PRANTEDA, G.; CARLESIMO, M. Multi-therapies in androgenetic alopecia : review and clinical experiences, v. 00, n. 2, p. 1–9, 2016.
- RUIZ, A.; HERNÁNDEZ, Y.; CABAL, C.; GONZÁLEZ, E.; VEINTEMILLAS-VERDAGUER, S.; MARTÍNEZ, E.; MORALES, M. P. Biodistribution and pharmacokinetics of uniform magnetite nanoparticles chemically modified with polyethylene glycol. **Nanoscale**, v. 5, n. 23, p. 11400, 2013.
- SAKR, F. M.; GADO, A. M.; MOHAMMED, H. R.; ADAM, A. N. I. Preparation and evaluation of a multimodal minoxidil microemulsion versus minoxidil alone in the treatment of androgenic alopecia of mixed etiology: a pilot study. **Drug Design, Development and Therapy**, v. 7, p. 413–423, 2013.
- SALDANHA, C. de A. Universidade de Brasília Instituto de Biologia Programa de Pós-graduação em Biologia Animal. Avaliação da atividade antifúngica da anfotericina paracoccidioidomycose, 2012.
- SANTANA, J. F. B.; SOLER, M. A. G.; DA SILVA, S. W.; GUEDES, M. H.; LACAVAL, Z. G. M.; AZEVEDO, R. B.; MORAIS, P. C. Investigation of the interaction between magnetic nanoparticles surface-coated with carboxymethyl dextran and blood cells using Raman spectroscopy. **Journal of Magnetism and Magnetic Materials**, v. 289, p. 452–454, 2005.
- SANTOS, L.; SHAPIRO, J. Update on male pattern hair loss. **Journal of drugs in dermatology: JDD**, 2014.
- SEENEY, C. E. The emerging applications of magnetic nanovectors in nanomedicine. **Pharmaceutical Patent Analyst**, v. 4, n. 4, p. 285–304, 2015.
- SHANSHANWAL, S. .; DHURAT, R. Superiority of dutasteride over finasteride in hair regrowth and reversal of miniaturization in men with androgenetic alopecia: A randomized controlled open-label, evaluator-blinded study. **Indian Journal of Dermatology, Venereology, and Leprology**, v. 83, n. 1, p. 47–54, 2017.
- SHAPIRO, J.; OTBERG, N. **Hair Loss and Restoration**. CRC Press, 2015.
- SHAW, D. J. **Introduction to Colloid and Surface Chemistry**. Butterworth-Heinemann, 1992.
- SHEN, L.; LAIBINIS, P. E.; HATTON, T. A. Bilayer Surfactant Stabilized Magnetic Fluids: Synthesis and Interactions at Interfaces. **Langmuir**, v. 15, n. 2, p. 447–453, 1999.
- SILVA, J. R. Da. **Nanopartículas magnéticas funcionalizadas com bicamadas de laurato/laurato e laurato/pluronic estudo da associação com anfotericina B**, 2008.
- SILVA, L. A. D.; ANDRADE, L. M.; DE SÁ, F. A. P.; 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.
- SINCLAIR, R. D. Male androgenetic alopecia (Part II). **Journal of Men's Health and Gender**, v. 2, n. 1, p. 38–44, 2005.
- SMITH, C. A.; SIMPSON, C. A.; KIM, G.; CARTER, C. J.; FELDHEIM, D. L. Gastrointestinal Bioavailability of 2.0 nm Diameter Gold Nanoparticles. **ACS Nano**, v. 7, n. 5, p. 3991–3996, 2013.
- SOLER, M. A. G. Layer-by-layer assembled iron oxide based polymeric nanocomposites. **Journal of Magnetism and Magnetic Materials**, v. 467, p. 37–48, 2018.
- SOLER, M. A. G.; ALCANTARA, G. B.; SOARES, F. Q.; VIALI, W. R.; SARTORATTO, P. P. C.; FERNANDEZ, J. R. L.; DA SILVA, S. W.; GARG, V. K.; OLIVEIRA, A. C.; MORAIS, P. C. Study of molecular surface coating on the stability of maghemite nanoparticles. **Surface Science**, v. 601, n. 18, p. 3921–3925, 2007. a.
- SOLER, M. A. G.; LIMA, E. C. D.; NUNES, E. S.; SILVA, F. L. R.; OLIVEIRA, A. C.; AZEVEDO, R. B.; MORAIS, P. C. Spectroscopic Study of Maghemite Nanoparticles Surface-Grafted with DMSA. **The Journal of Physical Chemistry A**, v. 115, n. 6, p. 1003–1008, 2011.
- SOLER, M. A. G.; MELO, T. F. O.; DA SILVA, S. W.; LIMA, E. C. D.; PIMENTA, A. C. M.; GARG, V. K.; OLIVEIRA, A. C.; MORAIS, P. C. Structural stability study of cobalt ferrite-based nanoparticle using micro Raman spectroscopy. **Journal of Magnetism and Magnetic Materials**, v. 272–276, n. III, p. 2357–2358, 2004.
- SOLER, M. A. G.; PATERNO, L. G. **Nanomateriais Magnéticos. Coleção Nanociência e**

Nanotecnologia: Nanoestruturas - Princípios e Aplicações. volume 1 ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2015.

SOLER, M. A. G.; PATERNO, L. G. Magnetic Nanomaterials. **Nanostructures.** Elsevier, 2017. p. 147–186.

SOLER, M. A. G.; QU, F. Raman Spectroscopy of Iron Oxide Nanoparticles. In: **Raman Spectroscopy for Nanomaterials Characterization.** Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2012. p. 379–416.

SOLER, M. a G.; BÁO, S. N.; ALCÂNTARA, G. B.; TIBÚRCIO, V. H. S.; PALUDO, G. R.; SANTANA, J. F. B.; GUEDES, M. H.; LIMA, E. C. D.; LACAVALA, Z. G. M.; MORAIS, P. C. Interaction of erythrocytes with magnetic nanoparticles. **Journal of nanoscience and nanotechnology,** v. 7, n. 3, p. 1069–1071, 2007. b.

SOLER, M.; ALCANTARA, G.; SOARES, F.; VIALI, W. Study of molecular surface coating on the stability of maghemite nanoparticles. **Surface Science,** 2007. c.

SOLER, M.; LIMA, E.; NUNES, E. Spectroscopic study of maghemite nanoparticles surface-grafted with DMSA. **The Journal of,** 2011.

SOUSA, I. V. D. De; TOSTI, A. New investigational drugs for androgenetic alopecia. **Expert opinion on,** v. 22, n. 5, p. 573–589, 2013.

SOUZA, A. T. De. Síntese e caracterização de nanopartículas magnéticas de óxido de ferro para aplicações biomédicas – um estudo citotóxico em linhagem celular de carcinoma cervical humano (células HeLa) Aryane Tofanello de Souza ferro para aplicações biomédicas, 2011.

STOUGH, D. B.; RAO, N. A.; KAUFMAN, K. D.; MITCHELL, C. **European journal of dermatology : EJD.**: John Libbey Eurotext, 2002. v. 12

STOUT, S. M.; STUMPF, J. L. Finasteride Treatment of Hair Loss in Women. **Annals of Pharmacotherapy,** v. 44, n. 6, p. 1090–1097, 2010.

STRÖM, V.; HULTENBY, K.; GRÜTTNER, C.; GRÜTTNER, G.; TELLER, J.; XU, B.; HOLGERSSON, J. A novel and rapid method for quantification of magnetic nanoparticle-cell interactions using a desktop susceptometer. **Nanotechnology,** v. 15, p. 457–466, 2004.

SUNG, C. T.; JUHASZ, M. L. W.; CHOI, F. D.; MESINKOVSKA, N. A. The Efficacy of Topical Minoxidil for Non-Scarring Alopecia: A Systematic Review. **Journal of drugs in dermatology : JDD,** v. 18, n. 2, p. 155–160, 2019.

GRATIERI, T., GELFUSO, G. M., LOPEZ, R. F. V. Basic principles and applications of iontophoresis for cutaneous penetration of drugs. **Quim. Nova,** v. 31, n. 6, p. 1490–1498, 2008.

TABBAKHIAN, M.; TAVAKOLI, N.; JAAFARI, M. R.; DANESHAMOUI, S. Enhancement of follicular delivery of finasteride by liposomes and niosomes. **International Journal of Pharmaceutics,** v. 323, n. 1–2, p. 1–10, 2006.

TAMPUCCI, S.; BURGALASSI, S.; CHETONI, P.; LENZI, C.; PIRONE, A.; MAILLAND, F.; CASERINI, M.; MONTI, D. Topical formulations containing finasteride. part II: Determination of finasteride penetration into hair follicles using the differential stripping technique. **Journal of Pharmaceutical Sciences,** v. 103, n. 8, p. 2323–2329, 2014.

TARLOW, J. K.; CLAY, F. E.; CORK, M. J.; BLAKEMORE, A. I. F.; MCDONAGH, A. J. G.; MESSENGER, A. G.; DUFF, G. W. Severity of Alopecia Areata Is Associated with a Polymorphism in the Interleukin-1 Receptor Antagonist Gene. **Journal of Investigative Dermatology,** v. 103, n. 3, p. 387–390, 1994.

TEICHMANN, A.; JACOBI, U.; OSSADNIK, M.; RICHTER, H.; KOCH, S.; STERRY, W.; LADEMANN, J. Differential Stripping: Determination of the Amount of Topically Applied Substances Penetrated into the Hair Follicles. **Journal of Investigative Dermatology,** v. 125, n. 2, p. 264–269, 2005.

TIETZE, R.; LYER, S.; DÜRR, S.; STRUFFERT, T.; ENGELHORN, T.; SCHWARZ, M.; ECKERT, E.; GÖEN, T.; VASYLYEV, S.; PEUKERT, W.; WIEKHORST, F.; TRAHMS, L.; DÖRFLER, A.; ALEXIOU, C. Efficient drug-delivery using magnetic nanoparticles — biodistribution and therapeutic effects in tumour bearing rabbits. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine,** v. 9, n. 7, p. 961–971, 2013.

TIWARI, G.; TIWARI, R. Bioanalytical method validation: An updated review. **Pharmaceutical Methods,** v. 2, n. 1, p. 25–38, 2010.

TOMBÁČZ, E.; BICA, D.; HAJDÚ, A.; ILLÉS, E.; MAJZIK, A.; VÉKÁS, L. Surfactant double

layer stabilized magnetic nanofluids for biomedical application. **Journal of Physics: Condensed Matter**, v. 20, n. 20, p. 204103, 2008.

TROST, L.; BERGFELD, W.; CALOGERAS, E. The diagnosis and treatment of iron deficiency and its potential relationship to hair loss. **Journal of the American Academy**, 2006.

TRÜEB, R. Molecular mechanisms of androgenetic alopecia. **Experimental gerontology**, v. 37, p. 981–990, 2002.

TULLY, A. S.; SCHWARTZENBERGER, J.; STUDDIFORD, J. Androgenic Alopecia. **Journal of Men's Health**, v. 7, n. 3, p. 270–277, 2010.

UPRIT, S.; KUMAR, R.; ROY, A.; PARE, A. Preparation and characterization of minoxidil loaded nanostructured lipid carrier gel for effective treatment of alopecia. **Saudi Pharmaceutical Journal**, v. 21, n. 4, p. 379–385, 2013.

VAN BEERS, B. E.; SEMPOUX, C.; MATERNE, R.; DELOS, M.; SMITH, A. M. Biodistribution of ultrasmall iron oxide particles in the rat liver. **Journal of magnetic resonance imaging : JMRI**, v. 13, n. 4, p. 594–9, 2001.

VAN NESTE, D.; FUH, V.; SANCHEZ-PEDRENO, P.; LOPEZ-BRAN, E.; WOLFF, H.; WHITING, D.; ROBERTS, J.; KOPERA, D.; STENE, J.-J.; CALVIERI, S.; TOSTI, A.; PRENS, E.; GUARRERA, M.; KANOJIA, P.; HE, W.; KAUFMAN, K. D. Finasteride increases anagen hair in men with androgenetic alopecia. **British Journal of Dermatology**, v. 143, n. 4, p. 804–810, 2000.

VENÂNCIO, J. H.; ANDRADE, L. M.; ESTEVES, N. L. S.; BRITO, L. B.; VALADARES, M. C.; OLIVEIRA, G. A. R.; LIMA, E. M.; MARRETO, R. N.; GRATIERI, T.; TAVEIRA, S. F. Topotecan-loaded lipid nanoparticles as a viable tool for the topical treatment of skin cancers. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 69, n. 10, p. 1318–1326, 2017.

VIALI, W. R.; ALCANTARA, G. B.; SARTORATTO, P. P. C.; SOLER, M. A. G.; MOSINIEWICZ-SZABLEWSKA, E.; ANDRZEJEWSKI, B.; MORAIS, P. C. Investigation of the Molecular Surface Coating on the Stability of Insulating Magnetic Oils. **The Journal of Physical Chemistry C**, v. 114, n. 1, p. 179–188, 2010.

VOGT, A.; BLUME-PEYTAVI, U. Selective hair therapy: bringing science to the fiction. **Experimental Dermatology**, v. 23, n. 2, p. 83–96, 2014.

VOGT, A.; MANDT, N.; LADEMANN, J.; SCHAEFER, H.; BLUME-PEYTAVI, U. Follicular Targeting—A Promising Tool in Selective Dermatotherapy. **Journal of Investigative Dermatology Symposium Proceedings**, v. 10, n. 3, p. 252–255, 2005.

WANG, W.; CHEN, L.; HUANG, X.; SHAO, A. Preparation and Characterization of Minoxidil Loaded Nanostructured Lipid Carriers. **AAPS PharmSciTech**, v. 18, n. 2, p. 509–516, 2017.

WAWRZYCKA, I.; STĘPNIAK, K.; MATYJASZCZYK, S.; KOZIOŁ, A. E.; LIS, T.; ABBOUD, K. A. Structural characterization of polymorphs and molecular complexes of finasteride. **Journal of Molecular Structure**, v. 474, n. 1–3, p. 157–166, 1999.

WELZ, B. **Atomic absorption spectrometry**. Wiley-VCH, 1999.

WERBER, R. T. **EMX plus EMX premiumX Xenon User's Guide**. 1.3 ed. Billerica, 2011.

WOOD, A. J. J.; PRICE, V. H. Treatment of Hair Loss. **New England Journal of Medicine**, v. 341, n. 13, p. 964–973, 1999.

WU, C.; KAPOOR, A. Dutasteride for the treatment of benign prostatic hyperplasia. **Expert opinion on pharmacotherapy**, v. 14, n. 10, p. 1399–1408, 2013.

YALN, O. Ferromagnetic Resonance. In: **Ferromagnetic Resonance - Theory and Applications**. InTech, 2013.

YANG, K.; PENG, H.; WEN, Y.; LI, N. Re-examination of characteristic FTIR spectrum of secondary layer in bilayer oleic acid-coated Fe₃O₄ nanoparticles. **Applied Surface Science**, v. 256, n. 10, p. 3093–3097, 2010.

YIM, E.; NOLE, K. L. B.; TOSTI, A. 5 α -Reductase inhibitors in androgenetic alopecia. **Current opinion in endocrinology, diabetes, and obesity**, v. 21, n. 6, p. 493–8, 2014.

YIP, R. Iron deficiency. **Bulletin of the World Health Organization**, v. 76 Suppl 2, n. Suppl 2, p. 121–3, 1998.

ZHANG, J.; MICHNIAK-KOHN, B. Investigation of microemulsion microstructures and their relationship to transdermal permeation of model drugs: ketoprofen, lidocaine, and caffeine. **International journal of pharmaceutics**, 2011.

ZHUANG, J.; FAN, K.; GAO, L.; LU, D.; FENG, J.; YANG, D.; GU, N.; ZHANG, Y.; LIANG,

M.; YAN, X. Ex vivo detection of iron oxide magnetic nanoparticles in mice using their intrinsic peroxidase-mimicking activity. **Molecular pharmaceutics**, v. 9, n. 7, p. 1983–9, 2012.