



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM NANOTECNOLOGIA
FARMACÊUTICA

CÍRIA VIEIRA BARBOSA

**LIPOSSOMAS DE MINOXIDIL PARA TRATAMENTO TÓPICO DA ALOPÉCIA
ANDROGÊNICA:** desenvolvimento, caracterização e avaliação da permeação
cutânea *in vitro* e *in vivo*.

Recife - PE

2015

CÍRIA VIEIRA BARBOSA

LIPOSSOMAS DE MINOXIDIL PARA TRATAMENTO TÓPICO DA ALOPÉCIA ANDROGÊNICA: desenvolvimento, caracterização e avaliação da permeação cutânea *in vitro* e *in vivo*.

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Nanotecnologia Farmacêutica, como requisito à obtenção do título de Doutora em Nanotecnologia.

Orientadora: Profa. Dra. Nereide Stela Santos
Magalhães

Co-orientadora: Profa. Dra. Noemia Pereira da Silva
Santos

Recife-PE

2015

Universidade Federal de Pernambuco
Centro de Ciências da Saúde
Programa de Pós-Graduação em Nanotecnologia Farmacêutica – PPGNanoFarma

LIPOSSOMAS DE MINOXIDIL PARA TRATAMENTO TÓPICO DA ALOPÉCIA
ANDROGÊNICA: desenvolvimento, caracterização e avaliação da permeação
cutânea *in vitro* e *in vivo*.

Círia Vieira Barbosa

Aprovada pela Banca Examinadora em Defesa realizada no dia 06 de abril de 2015.

Banca Examinadora:

Profa. Dra. Nereide Stela Santos Magalhães (Orientadora)
Universidade Federal de Pernambuco

Profa. Dra. Beate Saegesser Santos (Examinador Externo)
Universidade Federal de Pernambuco

Prof. Dr. Nicodemos Teles de Pontes Filho (Examinador Externo)
Universidade Federal de Pernambuco

Prof. Dr. Davi Pereira de Santana (Examinador Externo)
Universidade Federal de Pernambuco

Prof. Dr. Eryvaldo Sócrates Tabosa do Egito (Examinador Interno)
Universidade Federal do Rio Grande do Norte

***Dedico ao meu marido Tadeu e aos meus
filhos Davi e Clara.***

AGRADECIMENTOS

A Deus e à Virgem Maria pela força poderosa que impulsiona meus dias.

Ao meu marido Tadeu Barbosa e meus filhos Davi e Clara pelo amor incondicional, compreensão e apoio neste tempo de afastamento.

Aos meus pais (*in memoriam*), José e Marta Isabel, pelos ensinamentos de coragem, honestidade e esperança.

Aos meus familiares em Recife e Maceió, pelo incentivo e carinho de sempre.

À minha orientadora, Profa. Dra. Nereide Stela Santos Magalhães pela grande oportunidade.

À minha co-orientadora, Profa. Dra. Noemia Pereira da Silva Santos, pela orientação, amizade e palavras de incentivo.

Ao Prof. Dr. Francisco Carlos Amanajás Aguiar Júnior pela colaboração nas análises histológicas.

À Profa. Dra. Danielle Cristine A. C. Santana pela grande ajuda, orientação e carinho nas horas em que mais precisei.

Ao Prof. Dr. Geraldo Veríssimo de Souza Barbosa (UFAL) pela gentil e competente contribuição com as análises estatísticas.

À Profa. Dra. Janaina Bortoluzi (UFAL) e ao Prof. Dr. Ticiano Gomes do Nascimento (UFAL) pela amizade e ajuda em métodos analíticos.

À Dra. Milena Ferraz pelas análises em HPLC e ajuda no ensaio *in vivo*.

À Profa. Dra. Paloma Lys de Medeiros pela orientação sobre morfologia de folículos, pela atenção carinhosa e disponibilidade.

À Profa. Dra. Beate Saegesser Santos pelos esclarecimentos sobre calorimetria e pela amizade.

Ao doutorando Anivaldo Pereira Duarte Júnior por sua grande colaboração nos ensaios *in vitro* e análises em HPLC, serei eternamente grata por sua amizade e de sua esposa Patrícia.

Aos meus amigos, Danielle Rocha, Laís Macedo, Camila Vila Nova, Rebecca Torelli, Thiers Campos, Larissa Chaves e, em especial, Catarine Cavalcanti pela companhia, carinho e pelas boas risadas de nosso convívio.

Às colegas do SLC, Rafaela e Marcela por torcerem por mim e pelas preciosas informações quando precisei.

Aos alunos de Iniciação Científica, Luanna, Jéssica, Tamires e Andressa pelo auxílio no ensaio *in vivo*.

Às alunas de Iniciação Científica do Centro Acadêmico de Vitória (CAV/UFPE) Sandrelli e Juliana pela prestimosa colaboração no processamento de peças para estudo histológico.

Aos colegas do PPGCF Danilo, Giovana, Talita, Elisson, Alice e Carina pela ajuda e solidariedade.

Aos técnicos Rafael Padilha e Janaína do Laboratório de Microscopia do LIKA, pela ajuda, palavra amiga e recepção calorosa no laboratório.

A Marlos Medeiros e Karina Saraiva do Laboratório de Microscopia de Transmissão do Instituto Aggeu Magalhães, pela competência, profissionalismo e boa vontade.

Aos profissionais do CETENE Raphael Nascimento, Wilson Souza, Gian Duarte e Adriana Campos pelas análises qualitativas, esclarecimentos e boa vontade.

Aos meus companheiros de república (Família 100 Futuro) Marina, Cristina, Gabriela, Natália, Luciana, Gérson e Cadu por atenuarem minhas saudades de casa.

A todos que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho, muito obrigada.

RESUMO

A alopecia androgênica (AGA) é a mais comum das doenças crônicas dermatológicas e, entre os tratamentos utilizados para esta disfunção, o minoxidil (MNX) a 2% e 5% em soluções hidroalcoólicas tópicas apresenta sintomas relacionados à absorção sistêmica do fármaco, irritação do couro cabeludo devido ao álcool contido na formulação e retorno dos sintomas após interrupção do tratamento. O objetivo deste trabalho foi preparar, caracterizar e avaliar o perfil de liberação, a retenção no estrato córneo (EC) e nos folículos pilosos do MNX em lipossomas (LMNX) e destes lipossomas incorporados ao gel de hidroxipropilmetilcelulose (LMNX/HPMC). Estudos de estabilidade, difração de Raios-X (DR-X), espectroscopia no infravermelho (FTIR) e calorimetria diferencial exploratória (DSC) foram realizados para LMNX/HPMC (4 mg/mL). O perfil de liberação *in vitro*, retenção e permeação foi realizado em células de difusão de Franz, comparando-se às formulações LMNX e LMNX/HPMC a solução hidroalcoólica de MNX (20 mg/mL). A atividade promotora de crescimento capilar *in vivo* de LMNX/HPMC foi avaliada em ratos Wistar tratados por via tópica com os LMNX/HPMC e medicamento referência (Regaine[®]) a 2%. Análises de DR-X, FTIR e DSC sugerem interação fármaco-lipossoma e lipossoma-hidrogel. Porém, nos resultados da liberação *in vitro*, os coeficientes de difusão do MNX a partir de LMNX ($D \times 10^{-6} = 4,8205 \pm 0,0451 \text{ cm}^2/\text{s}$) e a partir de LMNX/HPMC ($D \times 10^{-6} = 4,5900 \pm 0,0451 \text{ cm}^2/\text{s}$) são semelhantes ($p > 0,05$) indicando que HPMC não interfere na liberação do fármaco. A retenção no EC *in vitro* apresentou-se na seguinte ordem decrescente: MNX em solução ($19,05 \pm 1,58 \text{ } \mu\text{g}/\text{cm}^2$) > LMNX ($8,65 \pm 2,15 \text{ } \mu\text{g}/\text{cm}^2$) > LMNX/HPMC ($4,08 \pm 0,70 \text{ } \mu\text{g}/\text{cm}^2$). Contudo, a retenção *in vitro* de MNX nos folículos a partir de LMNX/HPMC ($2,42 \pm 0,77 \text{ } \mu\text{g}/\text{cm}^2$) foi semelhante à obtida a partir da solução de MNX ($4,40 \pm 2,81 \text{ } \mu\text{g}/\text{cm}^2$) e significativamente menor que a obtida a partir de LMNX ($14,60 \pm 4,47 \text{ } \mu\text{g}/\text{cm}^2$), possivelmente devido à maior habilidade de formulações lipossomais promoverem depósito folicular. Ao contrário do observado para o MNX em solução, a partir das formulações lipossomais, não foi detectada a presença de MNX no meio receptor. Nos estudos *in vivo*, o número de folículos por milímetro linear de pele apresentou-se na seguinte ordem decrescente: grupo referência ($25,82 \pm 1,04$) > LMNX/HPMC ($20,97 \pm 0,46$) > controle ($11,79 \pm 0,25$), indicando a grande eficiência de LMNX/HPMC, que apesar de possuir uma

concentração de MNX vinte vezes menor que o medicamento referência, sua atividade foi apenas 19% inferior à deste. LMNX/HPMC foi capaz de prolongar a fase anágena de folículos dos animais, desde a primeira semana de tratamento (100% de folículos em fase anágena) e apresentou o menor tempo entre início e final do crescimento de novos pelos comparado ao produto referência e ao grupo controle. Portanto, conclui-se que o sistema lipossomal foi capaz de evitar a penetração de MNX através da pele, mostrou-se hábil em promover depósito folicular e que sua incorporação ao gel de HPMC não influenciou na liberação do fármaco, constituindo-se assim em formulações adequadas ao uso tópico do minoxidil.

Palavras-chave: Lipossomas. Folículo piloso. Minoxidil. Alopecia.

ABSTRACT

The androgenic alopecia is the most common of the chronic dermatologic diseases and, among the treatments used on this dysfunction, the minoxidil (MNX) at concentrations of 2% and 5% administered in topical hydroalcoholic solutions presents some symptoms related to the systemic absorption of the drug, scalp irritation due to the alcohol contained on the formulation and return of symptoms after treatment interruption. The aim of this work was to prepare, characterize and evaluate the release profile, the retention in the stratum corneum (SC) and in the hair follicles of MNX entrapped in liposomes (LMNX) and these liposomes incorporated to a hydroxypropyl methylcellulose gel (LMNX/HPMC). Stability studies, X-Ray diffraction, Fourier transformed infrared spectroscopy (FTIR) and differential scanning calorimetry (DSC) were performed for the LMNX/HPMC (4 mg/mL). The in vitro release profile, the retention and the permeation on the SC and hair follicles were realized utilizing Franz diffusion cells, comparing the LMNX and LMNX/HPMC formulations with the hydroalcoholic MNX solution (20 mg/mL). Promoter activity assays of LMNX/HPMC on hair growth in vivo were performed on Wistar rats treated by topical via with LMNX/HPMC and a reference medicament (Regaine[®]) at 2%. XRD analysis, FTIR and DSC suggest drug - liposome and liposome - hydrogel interaction. However, results from the in vitro release studies, the MNX's coefficients of diffusion from the LMNX ($D \times 10^{-6} = 4.8205 \pm 0.0451 \text{ cm}^2/\text{s}$) and the LMNX/HPMC ($D \times 10^{-6} = 4.5900 \pm 0.0451 \text{ cm}^2/\text{s}$) were similar ($p > 0.05$) indicating that the HPMC doesn't interfere in the drug's release. The retention in the SC presented decreasing in the following order: MNX in solution ($19.05 \pm 1.58 \text{ } \mu\text{g}/\text{cm}^2$) > LMNX ($8.65 \pm 2.15 \text{ } \mu\text{g}/\text{cm}^2$) > LMNX/HPMC ($4.08 \pm 0.70 \text{ } \mu\text{g}/\text{cm}^2$). However, the MNX's in vitro retention in the follicles from the LMNX / HPMC ($2.42 \pm 0.77 \text{ } \mu\text{g}/\text{cm}^2$) was similar to the one obtained from the MNX's solution ($4.40 \pm 2.81 \text{ } \mu\text{g}/\text{cm}^2$) and significantly lower than the one obtained from the LMNX ($14.60 \pm 4.47 \text{ } \mu\text{g}/\text{cm}^2$), possibly due to the greater ability of liposomal formulations promote follicular depots. Contrary to the observed for the MNX in solution, liposomal formulations did not release in the receiver compartment. In the in vivo studies, it was observed that the number of follicles per linear millimeter of skin presented decreasing in the following order: reference medicament (25.82 ± 1.04) > LMNX/HPMC (20.97 ± 0.46) > control group (11.79 ± 0.25). It denotes

the big efficiency of the LMNX/HPMC, since despite having a MNX's concentration 20 times lower than the reference medicament, its activity was only 19% inferior. LMNX/HPMC enabled extending the hair follicles' anagen phase of the animals, since the first week of treatment (100% of follicles in the anagen phase). It presented the shortest time between beginning and end of the new hair growth, compared to the reference product and the control group. Thus, it could be concluded that the liposomal system was able to prevent the penetration of MNX through the skin, proved to be skilled in promoting follicular depot and that its incorporation to the HPMC gel didn't influenced on the drug release, constituting so suitable formulations for the topical usage of minoxidil.

Key words: Liposomes. Hair follicle. Minoxidil. Alopecia.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	- Desenho esquemático da pele: epiderme, derme e hipoderme....	23
Figura 2	- Desenho esquemático do folículo piloso. A. Secção longitudinal. B. Estrutura detalhada do bulbo capilar.....	24
Figura 3	- Desenho esquemático do ciclo capilar.....	25
Figura 4	- Estrutura química do MNX	26
Figura 5	- Diagrama simplificado do EC e duas micro-rotas de penetração de fármacos	28
Figura 6	- Representação esquemática modificada dos sítios alvo de ação de fármacos nos folículos pilosos terminal e <i>vellus</i>	30
Figura 7	- Célula de difusão vertical do tipo “Franz” (a) e sistema automatizado de difusão vertical (b).....	34
Figura 8	- Desenho esquemático da retirada do EC pela técnica de <i>tape stripping</i> . Aplicação da formulação no compartimento doador (a) e retirada do EC (b).....	35
Figura 9	- <i>Stripping</i> diferencial com cola de cianoacrilato.....	36
Figura 10	- Características estruturais dos lipossomas: convencionais – (A) fármaco hidrofílico no interior do lipossoma; (B) fármaco lipofílico adsorvido ou no interior da bicamada lipídica; (C) catiônico; (D) de longa circulação (<i>Stealth</i> [®]); (E) sítio-específicos, (F) com anticorpos ligantes na superfície e (G) com peptídeos e proteínas ligantes na superfície; (H) virossomas; (I) DNA-plasmídeo encapsulado em lipossomas catiônicos.....	39
Figura 11	- Representação esquemática das metodologias de preparação de MLV, SUV e LUV.....	41
Figura 12	- Estrutura química da hidroxipropilmetilcelulose	42
Figura 13	- Curva analítica de minoxidil obtida por HPLC.....	67
Figura 14	- Cromatogramas obtidos com injeção das diluições de MNX.....	68
Figura 15	- Microscopia óptica da dispersão lipossomal contendo minoxidil..	70
Figura 16	- Fotomicrografias de LMNX por microscopia eletrônica de transmissão. Vários MLVs (A) e no detalhe, MLV exibe múltiplas bicamadas concêntricas (B).....	71
Figura 17	- Espalhabilidade das formulações contendo HPMC nas concentrações de 2,0 % e 2,5 %.....	76
Figura 18	- Aspecto macroscópico das formulações com hidrogel de HPMC a 1,5 – 2,0 e 2,5% (A, B e C).....	77
Figura 19	- Difractogramas de MNX, lipossomas sem fármaco (LIPB), com fármaco (LMNX), do polímero puro (HPMC) e da mistura LMNX/HPMC.....	78
Figura 20	- Espectro de absorção no Infravermelho do minoxidil (MNX).....	80
Figura 21	- Espectros de Infravermelho do MNX, lipossoma vazio (LIPB) e do lipossoma contendo o fármaco (LMNX).....	81
Figura 22	- Espectros de Infravermelho da HPMC, lipossomas com MNX (LMNX) e de LMNX em HPMC.	82
Figura 23	- Curvas de Calorimetria Diferencial Exploratória de MNX (a), LIPB (b), LMNX (c), HPMC (d) e LMNX/HPMC 1:4 .(e).....	85
Figura 24	- Perfil de liberação <i>in vitro</i> do MNX a partir de solução, lipossomas (LMNX) e lipossomas em hidrogel de	

	hidroxipropilmetilcelulose (LMNX/HPMC) 1:4 (n = 4).....	87
Figura 25	- Estudo <i>in vivo</i> de crescimento de pelos. Fotografias dos ratos tratados com LMNX/HPMC (A), padrão (B) e controle (C) no dia do início do crescimento dos pelos (6° dia).....	96
Figura 26	- Aspecto histológico em corte transversal dos folículos capilares: Anágeno terminal com bainha interna e externa (A) e Telógeno terminal com enrugamento da bainha radicular interna (B)	100
Figura 27	- Fotografia de ratos dos três grupos estudados apresentando crescimento de pelos no grupo tratado com LMNX/HPMC (a), grupo tratado com Regaine® a 2% (b) e controle negativo (c). Foto-micrografias de folículos capilares de ratos Wistar após 28 dias de tratamento: <i>Foto-micrografia A</i> grupo tratado com LMNX/HPMC, <i>Foto-micrografia B</i> grupo tratado com Regaine® a 2% e <i>Foto-micrografia C</i> controle negativo. As setas apontam folículos anágenos em A e B e, folículos telógenos em C.....	101

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	- Concentrações de MNX para elaboração da curva analítica.....	50
Tabela 2	- Volumes e concentrações de MNX contidos nas soluções metanólicas adicionadas às fitas adesivas contendo EC ou sem EC.....	50
Tabela 3	- Volumes e concentrações de MNX contidos nas soluções metanólicas adicionadas às amostras de cola de cianoacrilato contendo material retido nos folículos.....	51
Tabela 4	- Composição do hidrogel de hidroxipropilmetilcelulose	54
Tabela 5	- Formulações utilizadas nos estudos de permeação e retenção em EC e folículos	58
Tabela 6	- Resultados das áreas dos picos obtidos por HPLC e coeficientes de correlação para elaboração da curva analítica do MNX em comprimento de onda de 281 nm.....	66
Tabela 7	- Características das dispersões lipossomais contendo MNX nas concentrações de 2 mg/mL (LMNX 2) e 4 mg/mL (LMNX 4).....	72
Tabela 8	- Características das dispersões lipossomais contendo MNX (LMNX2 e LMNX4) após os testes de estabilidade acelerada.....	73
Tabela 9	- Características da dispersão lipossomal LMNX4 após o teste de estabilidade em longo prazo.	75
Tabela 10	- Parâmetros físico-químicos da formulação LMNX/HPMC.....	75
Tabela 11	- Quantidade liberada acumulada de MNX a partir de diferentes formulações ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$).....	87
Tabela 12	- Parâmetros cinéticos obtidos dos experimentos de liberação de MNX em função do tempo a partir de diferentes formulações.....	88
Tabela 13	- Resultados da recuperação para três (3) níveis de concentrações (0,5; 1,0 e $4 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) diferentes de MNX após ensaio de <i>tape stripping</i>	90
Tabela 14	- Resultados da recuperação para três (3) níveis de concentrações (0,5; 1,0 e $4 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) diferentes de MNX após ensaio de <i>stripping diferencial</i>	91
Tabela 15	- Quantidade de minoxidil permeado após 12 h.....	92
Tabela 16	- Perfil de retenção do MNX no EC e folículos a partir da formulação LMNX/HPMC.....	93
Tabela 17	- Retenção do MNX no EC em formulações lipossomais e solução através de membrana de orelha de porco. Média \pm dp das três formulações.....	94
Tabela 18	- Retenção intrafolicular do MNX de formulações lipossomais e solução através de membrana de orelha de porco. Média \pm dp das três formulações.....	97
Tabela 19	- Efeito dos tratamentos sobre o tempo de crescimento capilar (dias).....	98
Tabela 20	- Número de folículos por milímetro linear de pele de rato (Média \pm epm).	99
Tabela 21	- Médias das percentagens de folículos anágenos e telógenos em cada grupo.....	102

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

MNX Minoxidil

FDA Food and Drug Administration

FT-IR Espectroscopia no infravermelho com Transformada de Fourier

HPMC- Hidroxipropilmetilcelulose

DSC Calorimetria Diferencial Exploratória

DR-X Difração de Raios-X

CHCl₃ Clorofórmio

MeOH Metanol

PG Propilenoglicol

AGA Alopecia androgênica

HEPT Height Equivalent Plate Theoretical

LQ Limite de Quantificação

LD Limite de Determinação

ICH International Conference on Harmonisation

PDA Photodiode-Array-Detector

HPLC High Performance Liquid Chromatography

EC Estrato córneo

LMNX Lipossomas contendo minoxidil

LIPB Lipossoma sem fármaco

USP United States Pharmacopeia

TP Tamanho de partícula

PDI Polydispersity index

EE% Eficiência de encapsulação

MLV Multilamellar vesicles

SUV Small unilamellar vesicle

HPC/HPMC Hidroxipropil Celulose/Hidroxipropil Metilcelulose

DHT Di-hidrotestosterona

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	18
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	21
2.1 A pele	22
2.2 O folículo piloso	23
2.3 Minoxidil (MNX)	25
2.4 Permeabilidade da pele e anexos cutâneos.....	28
2.5 Liberação, permeação e retenção cutânea in vitro.....	33
2.6 Nanossistemas contendo MNX.....	36
2.7 Lipossomas.....	38
2.7.1 Métodos de obtenção dos lipossomas.....	40
2.8 Hidroxipropilmetilcelulose	41
3. OBJETIVOS	44
3.1 Objetivo geral.....	45
3.2 Objetivos específicos.....	45
4. MATERIAIS E MÉTODOS	46
4.1 Materiais.....	47
4.1.1 Equipamentos e acessórios.....	47
4.1.2. Soluções.....	48
4.1.3 Pele	48
4.2 Obtenção da curva analítica do minoxidil	48
4.2.1 Estudo de recuperação do minoxidil extraído das amostras de pele.....	50
4.2.2 Estudo de recuperação do minoxidil extraído das amostras de conteúdo folicular	51
4.3 Obtenção dos lipossomas contendo minoxidil.....	51
4.3.1 Caracterização dos lipossomas contendo minoxidil.....	52
4.3.1.2 <i>Determinação da eficiência de encapsulação (EE%)</i>	<i>52</i>
4.3.1.3 <i>Análise do tamanho de partícula e índice de polidispersão.....</i>	<i>53</i>
4.3.1.4 <i>Determinação do potencial zeta.....</i>	<i>53</i>
4.3.1.5 <i>Microscopia eletrônica de transmissão.....</i>	<i>53</i>
4.3.1.6 <i>Estudo de estabilidade.....</i>	<i>54</i>
4.4 Obtenção do hidrogel de hidroxipropilmetilcelulose (HPMC).....	54
4.5 Caracterização físico-química das formulações.....	55
4.5.1 Determinação da concentração do minoxidil.....	55
4.5.2 Determinação da espalhabilidade	55
4.5.3 Difração de Raios-X.....	56
4.5.4 Espectroscopia no infravermelho (FT-IR)	57
4.5.5 Calorimetria diferencial exploratória (DSC).....	57
4.6 Estudo <i>in vitro</i> de liberação do MNX a partir das formulações.....	57
4.6.1 Determinação da quantidade real de MNX liberada – Cálculos para a correção da diluição.....	58
4.6.2 Determinação da cinética de liberação	59
4.6.3 Estudo <i>in vitro</i> do perfil de retenção no EC e folículos a partir da formulação LMNX/HPMC.....	60
4.6.3.1 <i>Ensaio in vitro de determinação da retenção no EC.....</i>	<i>60</i>
4.6.3.2 <i>Ensaio in vitro de determinação da penetração folicular.....</i>	<i>61</i>
4.6.3.3 <i>Estudos in vitro de permeação e retenção cutânea do MNX a partir das formulações desenvolvidas.....</i>	<i>61</i>

4.7 Ensaio <i>in vivo</i> de avaliação da eficácia de LMNX/HPMC.....	62
4.7.1 Indução da fase anágena	62
4.7.2 Tratamento.....	62
4.7.3 Parâmetros histológicos a serem analisados.....	63
4.7.3.1 Análise qualitativa.....	63
4.7.3.2 Análise quantitativa.....	63
5. ANÁLISES ESTATÍSTICAS	64
6. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	65
6.1 Obtenção da curva analítica do minoxidil	66
6.2 Obtenção e caracterização das dispersões lipossomais.....	68
6.3 Estudo da estabilidade	73
6.4 Caracterização físico-química das formulações	75
6.4.1 Determinação da espalhabilidade.....	75
6.5 Estudo de interação fármaco-lipossoma e nanossistema-polímero.	77
6.5.1 Difração de Raios – X	77
6.5.2 Espectroscopia no infravermelho (FT-IR)	79
6.5.3 Calorimetria Diferencial Exploratória (DSC)	83
6.6 Estudo <i>in vitro</i>	86
6.6.1 Estudo <i>in vitro</i> do perfil de liberação.....	86
6.6.2 Permeação e retenção cutânea <i>in vitro</i>	90
6.6.2.1 Recuperação do minoxidil extraído das amostras de pele	90
6.6.2.2 Ensaio de recuperação do minoxidil extraído das amostras de conteúdo folicular.....	91
6.6.2.3 Determinação da penetração cutânea <i>in vitro</i>	92
6.6.2.4 Estudo <i>in vitro</i> do perfil de retenção no EC e folículos a partir da formulação MNX/HPMC.....	92
6.6.2.5 Determinação da retenção de MNX no estrato córneo <i>in vitro</i>	93
6.6.2.6 Determinação da retenção folicular <i>in vitro</i>	95
6.7 Ensaio <i>in vivo</i>	96
6.7.1 Análise qualitativa.....	97
6.7.2 Análise quantitativa.....	104
7. CONCLUSÃO.....	107
REFERÊNCIAS.....	109
ANEXO A – Autorização da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA/UFPE).....	128

1. INTRODUÇÃO

1. Introdução

A Alopecia androgênica (AGA) é a mais comum das doenças crônicas dermatológicas e afeta cerca de 80% dos homens caucasianos e 40% das mulheres. A perda de cabelos é hereditária, androgênio-dependente e inicia-se na adolescência e prossegue, ao longo dos anos, com padrão de distribuição definido (BLUMEYER et al., 2011; TRÜEB, 2002).

A estimulação androgênica leva, além do encurtamento dos fios, à substituição de pelos terminais (grandes e pigmentados) por pelos *velus* que são finos e despigmentados (TRÜEB, 2002).

Dentre os tratamentos utilizados para esta patologia, o uso do minoxidil (MNX) em concentrações de 2% e 5% veiculado em soluções hidroalcoólicas tópicas apresenta alguns inconvenientes como sintomas relacionados à absorção sistêmica do fármaco (RUMSFIELD; WEST; FIEDLER-WEISS, 1987; JAIN et al., 2010), irritação do couro cabeludo devido ao álcool contido na formulação (SINCLAIR, 2005) e retorno dos sintomas após interrupção do tratamento por um período de 4 a 6 meses (MURA et al., 2007).

Uma estratégia para contornar o retorno dos sintomas da AGA é aumentar o depósito de MNX no folículo piloso. A utilização de MNX associado a promotores de absorção (GRICE et al., 2010), a veículos que aumentem o tempo de contato do fármaco com a pele (REDDY; MUTALIK; RAO, 2006), ao uso da iontoforese (GELFUSO et al., 2013) ou a a e a incorporação do MNX em nanossistemas (KNORR et al., 2009; MEIDAN; BONNER; MICHINIYAK, 2005; WOSICKA; CAL, 2010; SHIM et al., 2004; MURA et al., 2007; MURA et al., 2010; PADOIS et al., 2011; MALLI; DARANDALE; PRADEEP, 2013) têm sido estudados com esse propósito.

Os nanossistemas carreadores possuem, dentre outras, as propriedades de aumentar a biodisponibilidade e reduzir as reações adversas dos medicamentos (PIMENTEL et al., 2007). Deste modo, vários estudos têm sido feitos com intuito de verificar a influência da composição e do tamanho de partículas na penetração folicular e na formação de depósito de fármacos (TOLL et al., 2004; MURA et al., 2007; JAIN et al., 2010; GILLET et al., 2011).

Outra maneira de facilitar a penetração folicular de partículas é através da massagem durante a aplicação do produto (McELNAY et al., 1993; GENINA et al., 2002). Acredita-se que isto ocorra devido ao deslocamento do “plug” folicular, uma

1. Introdução

mistura de material queratinizado, lipídios, restos celulares e bactérias (MARKS; DAWBER, 1971; THIELITZ et al., 2001) que obstrui a abertura do folículo piloso.

Dentre os diversos nanocarreadores, os lipossomas podem ser uma alternativa adequada para minimizar os já elencados problemas relacionados ao uso do minoxidil, pois além de grande biocompatibilidade devido à sua estrutura em bicamadas ser similar às membranas biológicas, se configuram em sistemas de liberação capazes de promover depósito da substância ativa no sítio de administração (GREGORIADES, 2006; TORCHILIN, 2005).

Em substituição à solução hidroalcoólica comumente utilizada em formulações contendo MNX, os polímeros hidrofílicos parecem ser os mais adequados já que têm sido exaustivamente utilizados como veículo de fármacos devido às suas propriedades muco-adesiva e promotora de penetração (PEPPAS; SAHLIN, 1996; SHOJAEI, 1998). Em seus estudos com o MNX livre incorporado a diversos hidrogéis, Reddy, Mutalik e Rao (2006) observaram que o gel de HPMC além de se mostrar atóxico, promoveu uma menor percentagem de liberação do MNX que misturas como HPC/HPMC.

Por fim, a motivação que gerou este trabalho foi a possibilidade de se elaborar um nanossistema como carreador de MNX e incorporá-lo em veículo polimérico como forma de solucionar os problemas relacionados à irritabilidade promovida pelo veículo hidroalcoólico, além de verificar a melhora na ação promotora de crescimento de folículos pilosos promovida pelo depósito intrafolicular de MNX e pelo maior tempo de contato da formulação com a pele.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2. Revisão da literatura

2.1 A pele

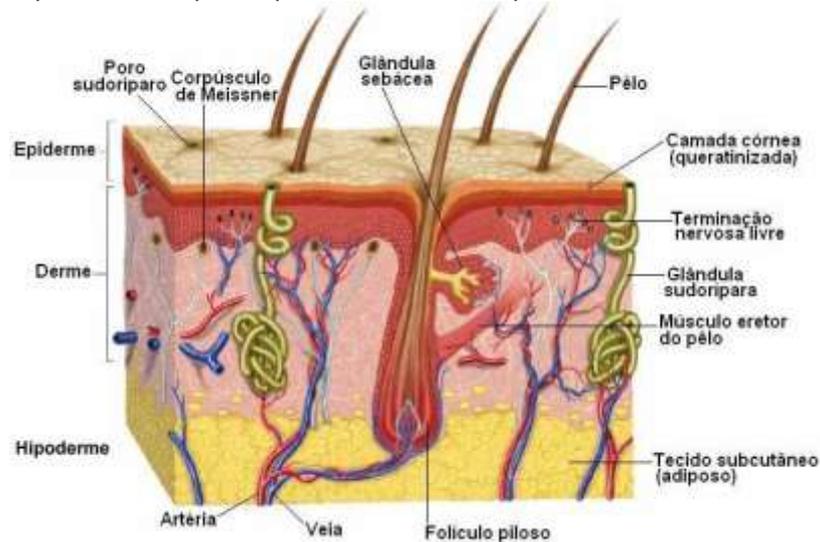
A pele (Figura 1) é formada basicamente por três camadas: a epiderme dá origem aos anexos cutâneos: unhas, pelos, glândulas sudoríparas e glândulas sebáceas (ZATZ, 1993), a derme, com 3–5 mm de espessura, é composta por proteínas como o colágeno, a elastina e um hidrogel interfibrilar de glicosaminoglicanos, sais e água onde encontram-se embebidos estruturas como vasos sanguíneos e linfáticos, terminações nervosas, unidades pilossebáceas e glândulas sebáceas e sudoríparas (MAGHRABY et al., 2008).

A Epiderme é composta de cinco camadas que se organizam da parte interna para a mais externa em camadas denominadas de camada basal, camada espinhosa, camada granulosa e a mais externa, o estrato córneo (MAGHRABY; BARRY; WILLIAMS, 2008).

O estrato córneo (EC) possui uma espessura de 10 – 15 μm (CHRISTOPHERS; KLIGMAN, 1964) e é formado por células mortas ricas em queratina denominadas corneócitos que estão imersos numa matriz intercelular rica em lipídios. A queratina existente nos corneócitos promove resistência química e física ao tecido (ZATZ, 1993) e sua hidratação, plasticidade à pele, que do contrário, quando desidratada, apresenta diminuição de sua resistência à permeabilidade (FORSLIND, 1994).

2. Revisão da literatura

Figura 1 - Desenho esquemático da pele: epiderme, derme e hipoderme.



Fonte: www.betaneamartins.com.br

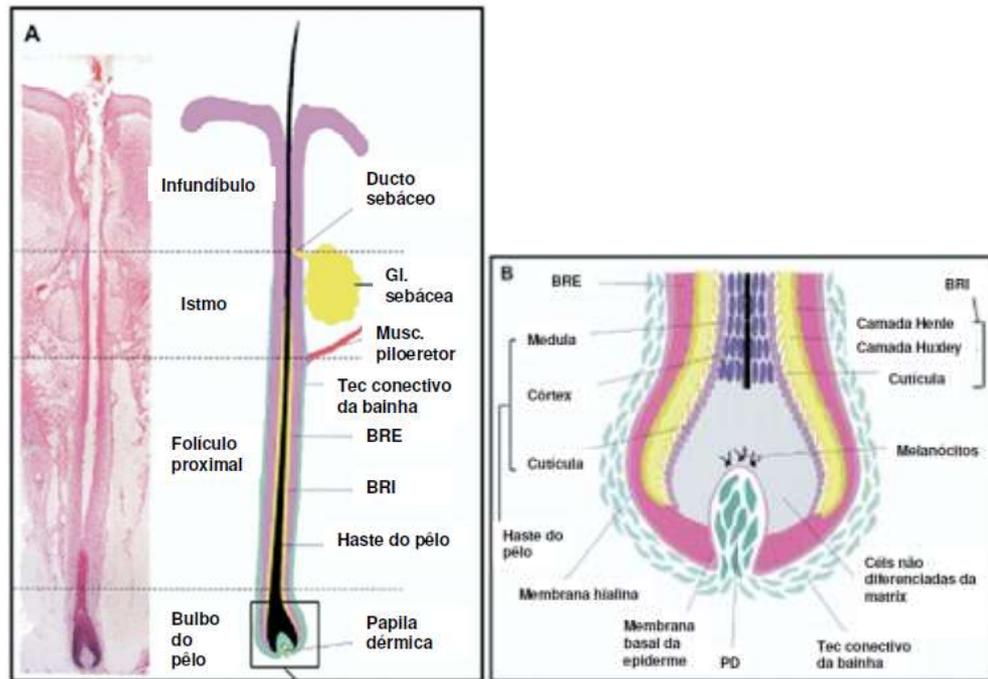
2.2 O folículo piloso

O folículo piloso está classificado em dois tipos: os pelos terminais que são longos (> 2 cm) com espessura maior que 0,03 mm, são pigmentados e possuem cavidade medular (SILVER, 1975; LOURENÇO, 2006) e os pelos *velus* que possuem espessura < 2,0 μm , comprimento de, no máximo, 2 cm e não possuem pigmento. O diâmetro do folículo exerce influência na penetração dos fármacos pela via transfolicular; logo, os pelos terminais possuem maior poder de penetração que os *velus* (TOLL et al., 2004; LOURENÇO, 2006).

Três bainhas envolvem a raiz do folículo piloso (Figura 2). A bainha mais externa da raiz se apresenta como uma invaginação da epiderme situada entre a matriz germinativa e a superfície do couro cabeludo; a bainha interna da raiz envolve o pelo separando-o da bainha externa da raiz, e estende-se apenas parcialmente pelo folículo; por fim, a bainha conjuntiva formada de tecido conjuntivo constituindo uma extensão da derme que envolve toda estrutura epitelial do folículo piloso.

2. Revisão da literatura

Figura 2 - Desenho esquemático do folículo piloso. A. Secção longitudinal. B. Estrutura detalhada do bulbo capilar.

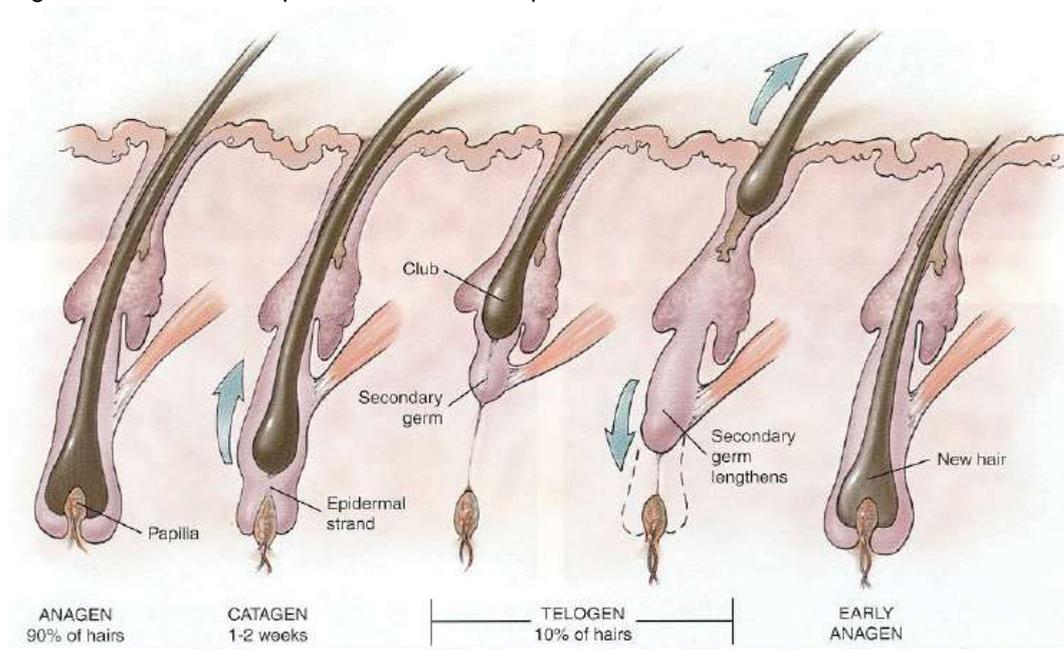


Fonte: Krause, Foitzik, 2006.

Na extremidade mais profunda do folículo piloso se encontra o bulbo e neste, a matriz e a papila dérmica. A parte inferior do bulbo possui elevada atividade mitótica e as células da matriz, embora possuam baixa taxa de mitose, são capazes de se diferenciar em células do pelo e de bainha epitelial interna. A papila dérmica é composta de uma massa de fibroblastos totalmente envolvidos pela matriz epitelial; além disto, seu tamanho define o tamanho do pelo a ser formado (RAMACHANDRAN; FLEISHER, 2000; MEIDAN; BONNER; MICHINIAK, 2005; GELFUSO et al., 2013).

A maioria dos estudos sobre alopecia androgênica está focada na evolução de unidades pilossebáceas (HERNANDEZ, 2004) que são formadas pelo folículo piloso juntamente com a glândula sebácea e o músculo eretor do pelo; cujo ciclo evolutivo (Figura 3) caracteriza-se pela anagênese, ou fase de crescimento que dura anos, catagênese, ou de transição, com duração de poucas semanas e, telogênese ou fase de repouso, com duração de poucos meses quando ocorre morte e queda dos pelos (BLUME-PEYTAVI; VOGT, 2011).

Figura 3 - Desenho esquemático do ciclo capilar



Fonte: <http://ebookbrowse.com/alopecia-020529-slides-pps-d145614587>

A duração da anagênese depende da testosterona e da enzima 5- α -redutase capaz de converter este hormônio no metabólito ativo dihidrotestosterona (DHT). Este, por sua vez, liga-se a receptores androgênicos localizados nas células do bulbo do folículo piloso desencadeando processos que reduzem a anagênese (BIENOVÁ et al., 2005; GELFUSO et al., 2013).

2.3 Minoxidil

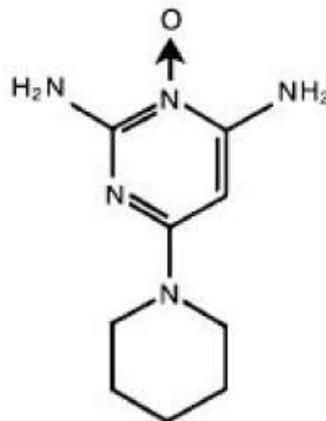
Dentre os tratamentos utilizados para alopecia androgênica encontra-se o uso do MNX (2,4-diamino-6-piperidinopyrimidine 3-oxide) em soluções tópicas de 2% e 5%. Este fármaco foi introduzido na terapêutica clínica, na década de 70, como anti-hipertensivo sendo logo observada a hipertricose como efeito relacionado ao seu uso oral (BURTON; MARSHALL, 1979; JAIN et al., 2010). A partir desta descoberta, foi desenvolvida a solução hidroalcoólica tópica de MNX a 2%, aprovada pelo FDA como primeiro medicamento para tratamento da alopecia areata e androgênica (WONG; SCIFECT, 1994).

2. Revisão da literatura

O MNX é uma substância cristalina, branca, inodora, de ponto de fusão 248°C, massa molar de 209,25 g/mol, pouco solúvel em água (2,2 mg/mL a 25°C) e em outros solventes (propilenoglicol: 75 mg/mL; etanol: 29 mg/mL; metanol: 44 mg/mL; DMSO: 6,5 mg/mL). Mais hidrofóbico que hidrofílico, possui coeficiente de partição n-octanol/água de 1,24 a 25°C (GORECKI, 1988; THE MERCK INDEX, 1988).

Sabe-se que a conversão do MNX (Figura 4) em sua forma ativa MNX sulfato, dá-se no folículo pela ação da fenolsulfoiltransferase, enzima presente em grande quantidade no folículo piloso (BUHL et al., 1990; KUDLACEK; CLEMENS; ANDERSON, 1995; GELFUSO et al., 2013), mas quanto a seu mecanismo de ação, este ainda não está totalmente esclarecido embora, nos últimos quarenta anos, vários estudos tenham sido publicados sobre este fármaco.

Figura 4 - Estrutura química do MNX



Fonte: Gelfuso, 2009.

A hipótese inicial para o mecanismo de ação do MNX tópico seria, segundo Headington (1987), a promoção da vasodilatação e aumento do fluxo sanguíneo na papila dérmica; ou que o mais provável mecanismo seria por estímulo do germe secundário dos folículos em fase telógena estimulando a evolução para a anágena (MORI & UNO, 1990) ou ainda que o MNX estimula o crescimento capilar pela abertura intracelular dos canais de potássio (BUHL et al., 1992; HARMON; LUTZ; DUCOTE, 1993).

2. Revisão da literatura

Han (2004) avaliou a proliferação das células da papila dérmica, em meio de cultura, pelo ensaio de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolium brometo (MTT) e mediu as expressões de quinase regulada por sinal extracelular (ERK), Akt, Bcl-2 e Bax por Western blot. Avaliaram também a alongação dos folículos capilares. Concluiu, com o aumento de (ERK), Akt, Bcl-2 e Bax que o MNX pode estimular o crescimento capilar em humanos através de efeitos proliferativos e anti-apoptóticos sobre as células da papila dérmica, prolongando assim, a anagênese do ciclo capilar o que corrobora a hipótese de Katsuoka et al., (1987).

Sakita et al. (1999) verificaram que aplicações tópicas de MNX aumentaram a fenestração nas paredes dos capilares foliculares em torno dos bulbos capilares, confirmando assim, a alegação de que aplicações tópicas de MNX são capazes de aumentar o fluxo sanguíneo cutâneo (WESTER et al., 1984) e causar lesões angioproliferativas (PAVLOVITCH; HUBERT; LEIBOVITCH,, 1990). Em seus estudos, Kwack et al. (2011) observaram que aplicações de uma solução de MNX a 3% na região dorsal de camundongos C57BL/6 foram capazes de expandir a fase anágena por ativação da β -catenina nas células da papila dérmica.

Embora, entre as estratégias utilizadas no tratamento da alopecia androgênica, o uso de soluções de MNX seja a mais efetiva, estudos reportam que a interrupção do tratamento, por um período de 4 a 6 meses, leva ao retorno da queda dos cabelos (MURA et al., 2007). Além disso, há relatos de que duas aplicações tópicas diárias deste fármaco têm ocasionado efeitos cardiovasculares indesejáveis (RUMSFIELD; WEST; FIEDLER-WEISS, 1987; JAIN et al., 2010) como também, irritação do couro cabeludo promovida pela presença do álcool nas soluções (SINCLAIR, 2005).

Grice et al. (2010) realizaram um estudo in vitro com o MNX incorporado em veículos contendo concentrações variadas de água, etanol e propilenoglicol visando conhecer a importância da composição do veículo na penetração do fármaco no estrato córneo, anexos cutâneos e pele humana. Verificaram que, nos primeiros 30 minutos, as formulações contendo etanol promoveram maior retenção do MNX no estrato córneo e anexos cutâneos, comparadas às formulações sem etanol;

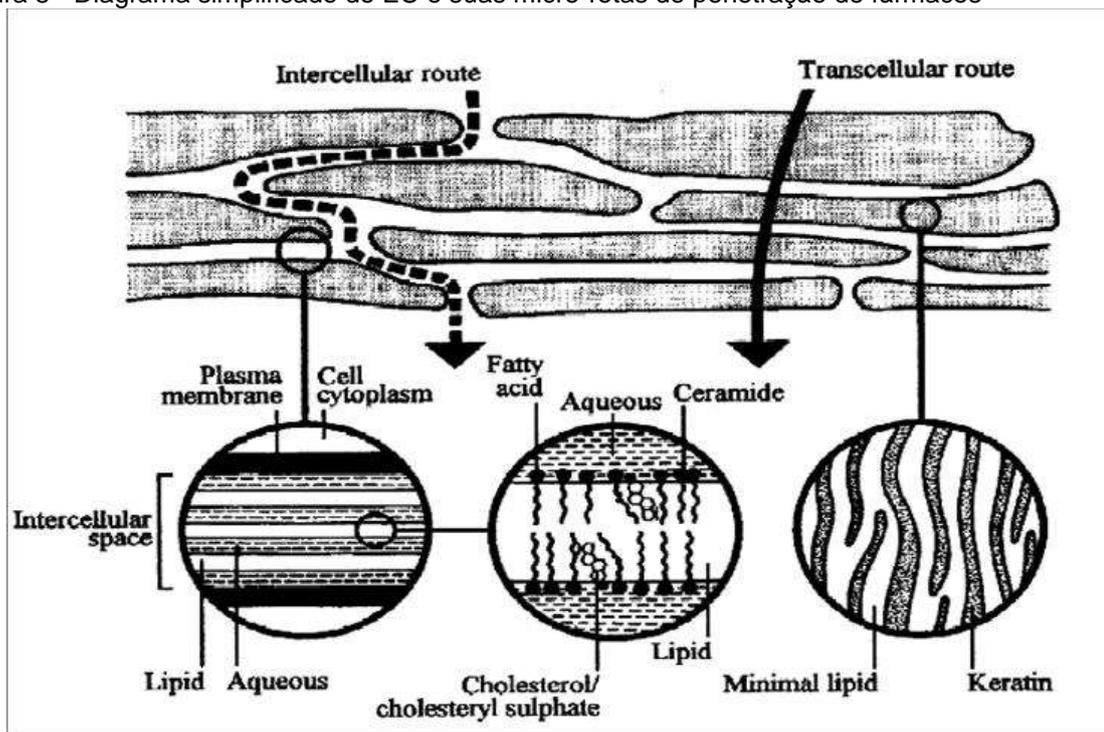
2. Revisão da literatura

verificaram também que o MNX, em veículo contendo maior concentração de propilenoglicol, apresentou aumento da penetração no fluido receptor após 12 horas.

2.4 Permeabilidade da pele e anexos cutâneos

A permeação cutânea (Figura 5) de fármacos aplicados sobre a epiderme intacta é, em geral, limitada pelo estrato córneo. Além desta, outras rotas de permeação são identificadas: a via intercelular, em que o fármaco se difunde através dos espaços entre os corneócitos (MOSER et al., 2001; GELFUSO et al., 2013) e, a via dos apêndices cutâneos representada pelos folículos pilosos e glândulas sebáceas e sudoríparas.

Figura 5 - Diagrama simplificado do EC e suas micro-rotas de penetração de fármacos



Fonte: Barry (2001).

Esta última via era até pouco tempo, considerada de pouca importância no transporte de substâncias através da pele por representar apenas 0,1% da área total

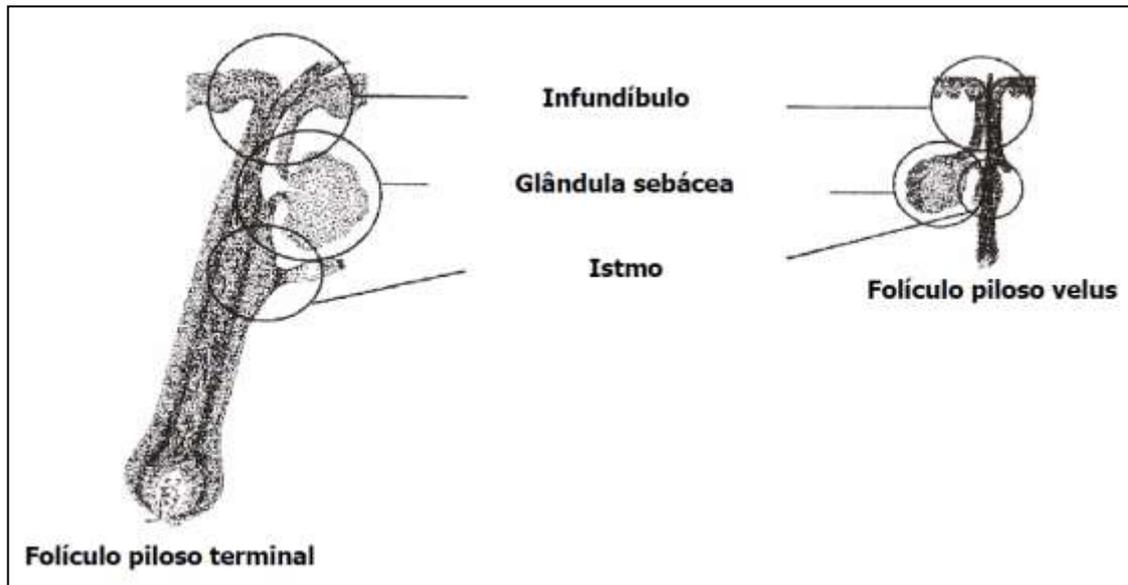
2. Revisão da literatura

da pele. Hoje, sabe-se que a distribuição dos folículos capilares varia nas regiões do corpo e que, as áreas somadas de abertura folicular do rosto e do couro cabeludo, chegam a 10% da área total da pele (KNORR et al., 2009; WOSICKA; CAL, 2010). Sabe-se também que a via transfolicular além de atuar como um importante depósito de fármacos na pele (MEIDAN; BONNER; MICHIANIK, 2005; GELFUSO et al., 2013) comparável ao EC em algumas área do corpo (OTBERG et al., 2004) pode ser a via preferencial de permeação e penetração de fármacos, como é o caso do quimioterápico cisplatina (SIMONETTI et al., 2009) e também de fármacos para tratamento de doenças associadas ao folículo piloso como também, as que afetam a pele em geral (VOGT et al., 2005).

As diversas regiões do folículo piloso constituem sítios específicos para a penetração de compostos administrados topicamente (Figura 6): o infundíbulo é uma região que possui poucos corneócitos diferenciados, sendo por isso, uma área de grande permeabilidade no epitélio folicular; as glândulas sebáceas são interconectadas com o folículo piloso através do ducto sebáceo, este se abre para o interior do canal folicular na região inferior do infundíbulo caracterizando uma possível rota para o tratamento da acne (VOGT et al., 2005); por fim, a região do istmo onde se encontram as células precursoras dos melanócitos (NISHIMURA et al., 2002; SHAROV et al., 2003) e as células precursoras foliculares responsáveis pelo crescimento do pelo (LOURENÇO, 2006) sugerindo uma provável rota para tratamento de doenças relacionadas ao folículo piloso.

2. Revisão da literatura

Figura 6 - Representação esquemática modificada dos sítios alvo de ação de fármacos nos folículos pilosos terminal e vellus.



Fonte: Lourenço (2006).

A grande profundidade de inserção dos folículos na pele, a redução progressiva da espessura do EC ao longo da estrutura do folículo e o rico suprimento de vasos sanguíneos (GRICE et al., 2010) fazem com que a via transfolicular seja vista, nos dias atuais, como uma alternativa viável ao transporte de fármacos e partículas que não conseguem contornar a barreira da pele pela via intercelular (PATZELT et al., 2011). Além disso, a penetração folicular pode ser facilitada pela massagem do couro cabeludo (VOGT et al.; 2005), produzindo assim aumento da área viável ou da abertura do infundíbulo (LADEMANN et al., 2009). A permeação através dos folículos pilosos ou capilares é vista hoje como importante a permeação cutânea de substâncias, chegando a ser considerada a principal via de penetração de fármacos, como a cisplatina (SIMONETTI et al., 2009) ou como depósitos de fármacos na pele (MEIDAN; BONNER; MICHINIAC, 2005; GELFUSO et al., 2013).

É crescente o número de estudos feitos sobre estratégias de direcionamento de fármacos para esta via. A utilização de iontoforese (MEIDAN; BONNER; MICHINIAC, 2005; GELFUSO et al., 2013) ou de nano e microsistemas com tamanho, composição e cargas de superfícies controlados (DU PLESSIS et al., 1994; TOLL et al., 2004; JAIN et al., 2010) tem apontado esta via de permeação

2. Revisão da literatura

como promissora para distúrbios relacionados ao folículo piloso como alopecia e acne (MEIDAN; BONNER; MICHINIÁK, 2005).

Aspectos como a condição e umidade da pele (ANSEL; POPOVICH; ALLEN, 2000); propriedades físico-químicas do fármaco e do veículo utilizado (CAMPOS, 1994; JATO, 1997; ANTÔNIO, 2007) são capazes de afetar a absorção percutânea, e esta obedece às seguintes etapas:

- a) Liberação do fármaco do veículo;
- b) Penetração através das barreiras da pele;
- c) Ativação da resposta farmacológica.

Para que ocorra a difusão passiva de um fármaco pela interface veículo/estrato córneo, a substância precisa ser primeiramente solubilizada para então, sofrer partição (ANSEL; POPOVICH; ALLEN, 2007).

Segundo Aulton (2005), a difusão pode ser definida como transferência espontânea de uma substância com alto potencial químico, para uma região de potencial mais baixo, conduzida pelo gradiente de concentração.

O fluxo (J) com que o fármaco atravessa o estrato córneo é descrito pela 1ª Lei de Fick que descreve que a taxa de difusão é proporcional ao gradiente de concentração (Equação I) (MOSER et al., 2001).

$$J = \frac{D_m C_{s,m}}{L} \cdot \frac{C_v}{C_{s,v}} \quad \text{Equação (I)}$$

Onde:

D_m = coeficiente de difusão do fármaco na membrana

$C_{s,m}$ = solubilidade do fármaco na membrana

C_v = concentração do fármaco no veículo

$C_{s,v}$ = solubilidade do fármaco no veículo

2. Revisão da literatura

Visando aumentar a permeação de um fármaco através do estrato córneo, alguns artifícios são possíveis, como aumento da saturação do fármaco no veículo, com conseqüente aumento da razão $C_v / C_{s,v}$; ou ainda, explorar estratégias de interação fármaco-estrato córneo, como por exemplo: aumento do coeficiente de difusão do fármaco na membrana (D_m) obtido pela desorganização do estrato córneo; ou através do aumento da solubilidade do fármaco na membrana ($C_{s,m}$) utilizando solventes como o propilenoglicol e o etanol (MOSER et al., 2001; SILVA, 2012).

A segunda Lei de Fick se aplica a experimentos onde se emprega uma membrana permanente separando dois compartimentos: o compartimento doador, que contém a maior concentração de fármaco e, o compartimento receptor onde a concentração do fármaco é zero (*sink conditions*), dessa forma, o gradiente de concentração é mantido. A quantidade acumulada de fármaco (m) que passa através da membrana por unidade de área e, como função do tempo até atingir o estado de equilíbrio, é expressa pela Equação II:

$$(dm/dt) = DC_0K / h \quad \text{Equação (II)}$$

Onde:

C_0 é a concentração do fármaco na solução doadora;

K é o coeficiente de partição soluto/veículo/membrana

h é a espessura da membrana

Em um gráfico contendo o tempo de absorção (t) e a quantidade acumulada absorvida (m) por unidade de área de membrana como função do tempo, verifica-se quando a curva se torna linear e, extrapola-se esta porção linear, de modo a obter o intercepto da curva quando $m = 0$, obtendo-se assim, o *lag time* ou o tempo que leva para começar a ocorrer a absorção (AULTON, 2005).

O fluxo do soluto é proporcional ao gradiente de concentração através da membrana, para se obter o máximo de fluxo, é necessário que a solução doadora esteja saturada. Para isso, a solubilidade do fármaco pode ser otimizada pela escolha do melhor veículo e da solução receptora (JATO, 1997).

2. Revisão da literatura

2.5 Liberação, permeação e retenção cutânea *in vitro*

O EC é uma barreira que limita a taxa de penetração, mas sendo uma camada morta, mantém suas funções de barreira mesmo após a excisão. Desde que esta camada permaneça intacta, o processo passivo de penetração de substâncias na pele verificado *in vitro* é comparável ao verificado *in vivo*, mesmo alguns dias após a excisão da pele utilizada como membrana (GALEY; LONSDALE; NACHT, 1976; BARRY, 1983). Desse modo, membranas obtidas de tecido humano, de origem suína, de ratos ou de macacos podem ser mantidas sob refrigeração, por até um mês antes de serem utilizadas, sem comprometimento de suas funções de barreira.

O tecido ideal para realização de estudos *in vitro* é a pele humana, no entanto, além das variabilidades individuais, sua difícil obtenção relacionada às questões éticas e legais (HAIGH; SMITH, 1994; GUPTA; ZATZ; REREK, 1999; BENECH-KIEFFER et al., 2000) obrigam a utilização de peles de macacos, suínos e roedores, sendo as de roedores mais permeáveis que a pele humana (BRONAUGH; STEWARD, 1985).

A pele de porco serve como alternativa à pele humana devido às semelhanças fisiológica e histológica como espessura e estrutura das camadas da pele, conteúdo lipídico além de glândulas sebáceas e sudoríparas (DICK; SCOTT, 1992; JACOBI et al., 2007).

O *guideline* do FDA preconiza o uso de célula de difusão como o modelo de célula de Franz, utilizando membrana sintética, para determinação da liberação *in vitro* de formulações tópicas líquidas, semissólidas e transdérmicas (U.S. FDA/CDER, 1997; SHAH; ELKINS; WILLIAMS, 1999).

Os testes de liberação e permeação *in vitro* são realizados em célula de difusão de Franz, equipada com membrana. Membranas sintéticas são utilizadas no teste de liberação e, as naturais, nos ensaios de permeação.

A célula de Franz (Figura 7) representa o modelo bicompartimental de células de difusão, onde os compartimentos encontram-se separados por uma membrana

2. Revisão da literatura

natural ou sintética. No compartimento doador, situa-se o fármaco e, no compartimento receptor, uma solução onde este fármaco é solúvel.

Figura 7 - Célula de difusão vertical do tipo “Franz” (a) e sistema automatizado de difusão vertical (b).



Fonte: (a) <http://www.permeagear.com/franz.htm>. (b) Adaptado do manual Microette, Hanson Research.

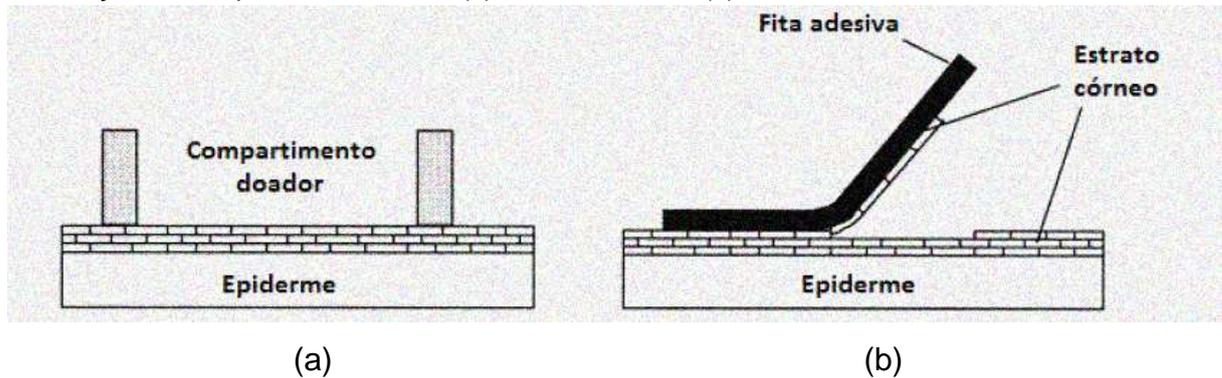
A difusão do fármaco do compartimento doador para o receptor é monitorada através de coletas de amostras da solução receptora, em tempos determinados, para posterior quantificação.

A etapa seguinte aos experimentos de permeação cutânea é quantificação do fármaco nas amostras da fase receptora, como também, a separação das camadas da pele para se saber, através de métodos de quantificação, a concentração de fármaco retido nestas (CHIEN, 2001).

A retirada do EC é feita mais comumente pela técnica de *tape stripping*, (Figura 8) (WEIGMANN et al., 1999). Nesta técnica tiras de fita adesiva são firmemente aderidas e retiradas em seguida para posterior quantificação do fármaco retido no estrato córneo e nas camadas subjacentes de pele.

2. Revisão da literatura

Figura 8 - Desenho esquemático da retirada do EC pela técnica de *tape stripping*. Aplicação da formulação no compartimento doador (a) e retirada do EC (b).



Fonte: Moser et al., (2001).

Para investigação da penetração folicular, dois métodos podem ser empregados: o bloqueio seletivo dos folículos capilares e o procedimento de *stripping* diferencial (TEICHMAN et al., 2005).

O primeiro método consiste em se bloquear com esmalte a abertura de folículos capilares de modo que a formulação aplicada seja absorvida apenas pela área não bloqueada. O segundo é realizado na membrana após a retirada do EC e consiste em se colocar uma gota de cola de cianoacrilato (Figura 9) e sobre esta, uma lâmina de vidro. Após polimerizada, a cola é arrancada, juntamente com a lâmina de vidro, trazendo consigo uma mistura de material queratinizado, lipídios, bactérias e restos celulares que são capazes de dificultar a penetração do fármaco nos orifícios foliculares. O material obtido por esta técnica é tratado com o solvente adequado e a concentração de fármaco que havia penetrado no folículo é quantificada.

Figura 9 - *Stripping* diferencial com cola de cianoacrilato.

Fonte: Arquivo pessoal.

2.6 Nanossistemas contendo MNX

Vários nanossistemas têm sido utilizados como veículos de uso tópico para o MNX, visando promover a liberação controlada do fármaco e a promoção de depósito folicular.

Jain et al., (2010) utilizando MNX encapsulado em lipossomas multilamelares (MLV) de diversas composições, obtidos por hidratação do filme lipídico, realizaram estudos *in vitro* de liberação do MNX, de permeação em pele de rato (*ex vivo*) e com membrana semipermeável, além de caracterizar cada formulação quanto aos parâmetros relativos às vesículas (tamanho, formato, eficiência de encapsulação e lamelaridade). Os resultados mostraram que lipossomas carregados positivamente apresentaram maior eficiência de penetração folicular, no entanto, a concentração e deposição de MNX em cada unidade pilosebácea foram maiores para os lipossomas neutros. Os autores atribuíram tal resultado à presença das cargas negativas da superfície da pele e dos folículos que se ligariam às partículas positivas, por troca iônica, resultando em maior penetração do fármaco; deste modo, justifica-se também, a maior deposição de MNX veiculado por lipossomas neutros.

Além dos lipossomas, formulações de vesículas formadas por tensoativos não-iônicos conhecidas como niossomas, ou contendo etanol, os etossomas têm

2. Revisão da literatura

sido sugeridas e, comparadas às soluções tópicas de MNX, estas formulações vesiculares, em reduzidas doses, têm aumentado a deposição cutânea deste fármaco (CEVC, 2004; SINICO et al. 2005; MANCONI et al. 2006; MURA et al., 2007).

Em seus estudos in vitro em pele humana, Mura e cols. (2007) analisaram o transporte transepidérmico de lipossomas e niossomas, contendo MNX, produzidos pelo método de desidratação e reidratação descrito por Kirby e Gregoriadis (1984), comparados entre si e entre a solução controle de MNX. Concluíram que os lipossomas mostraram maior penetração nas camadas da epiderme e da derme que os niossomas e a solução controle, provavelmente devido ao menor tamanho dos lipossomas e seu maior direcionamento à pele e seus anexos.

Em 2009, os estudos in vitro de Mura e seu grupo avaliaram a influência no transporte transdérmico de MNX encapsulado em vesículas elásticas com lecitina de soja e diferentes concentrações de facilitadores de penetração como Transcutol®, Labrasol® e cineol. Os resultados mostraram que os lipossomas deformáveis obtidos, comparados aos lipossomas convencionais e às soluções alcoólicas, apresentaram maior eficiência de encapsulação, estabilidade e promoveram significativo aumento da deposição de MNX na pele.

Além dos lipossomas, nano e micropartículas têm sido estudadas como forma de transportar fármacos através da pele e por via transfolicular. Neste caso, as nanopartículas são preferidas às micropartículas devido ao seu menor tamanho; há ainda a possibilidade de se aumentar a penetração destas por meio de oclusão da pele na área aplicada e, na rota transfolicular, o uso da aplicação tópica acompanhada de massagens tem aumentado a penetração e o depósito de substâncias dentro dos folículos capilares (NEUBERT, 2011).

Estudos mostram que a penetração das micropartículas nos apêndices cutâneos é proporcional ao seu tamanho (TOLL et al., 2004). Partículas com tamanho maior que 10 μm não conseguem penetrar nos orifícios foliculares nem na camada córnea; as com diâmetro entre 9 e 10 μm apenas concentram-se em torno da abertura do folículo; com 7 μm penetram mais profundamente no canal folicular, mas raramente penetram no extrato córneo (TOLL et al., 2004; LOURENÇO, 2006).

2. Revisão da literatura

As micropartículas menores que 3 μm penetram bem no interior do canal folicular, são encontradas nas camadas superficiais do estrato córneo, mas não penetram a epiderme viável (ROLLAND et al., 1993).

2.7 Lipossomas

A aplicação tópica de sistemas nano e microparticulados (nano e microemulsões e nano e micropartículas poliméricas) pode direcionar a liberação passiva de um fármaco para a rota transfolicular de acordo com o tamanho de partícula proporcionado por estes sistemas (SHIM et al., 2004; TOLL et al., 2004; GELFUSO et al., 2013).

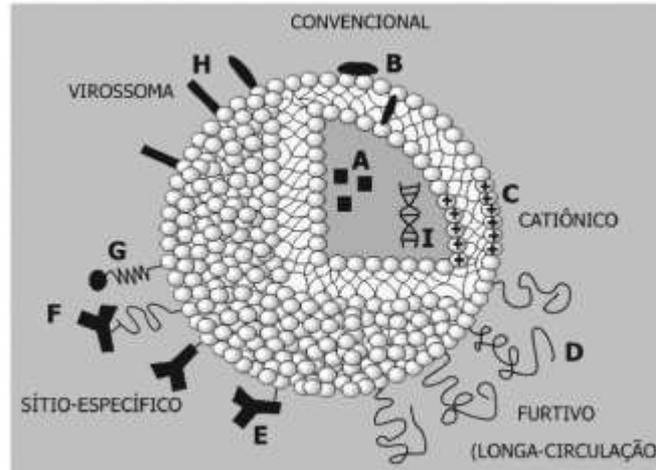
Devido a propriedades como capacidade de liberar o fármaco no sítio ativo em área específica (ROGERS, 1999), possibilitar o conhecimento prévio da taxa de liberação do fármaco na pele, proteger compostos lábeis (NACHT, 1995), estes sistemas de liberação possuem ainda a capacidade de reter por mais tempo o composto na pele, minimizando sua absorção transdérmica (ROGERS, 1999; LOURENÇO, 2006).

Entre os diversos nanossistemas, encontram-se os lipossomas. Estes são definidos como vesículas constituídas de uma ou mais bicamadas fosfolipídicas concêntricas, separadas por fases aquosas e englobando um compartimento aquoso interno se apresentam assim semelhantes a uma membrana biológica. Esta semelhança, que os torna seguros e eficazes para fins terapêuticos (FORSSÉN; WILLIS, 1998), pode ser aumentada por estratégias como modificações químicas em suas membranas (Figura 10), resultando em veículos adequados ao direcionamento de fármacos (CHONN; CULLIS, 1998; ANDRADE, 2003) ou modulação imune *in vivo* e *in vitro* (MEYENBURG et al., 2000).

Segundo Vogt et al. (2005), os lipossomas possuem comprovada habilidade no transporte de fármacos para alvos foliculares. Esta e as demais propriedades dos lipossomas podem representar uma solução para os problemas como reações sistêmicas e irritação do couro cabeludo relacionados ao uso tópico do MNX.

2. Revisão da literatura

Figura 10 - Características estruturais dos lipossomas: convencionais – (A) fármaco hidrofílico no interior do lipossoma; (B) fármaco lipofílico adsorvido ou no interior da bicamada lipídica; (C) catiônico; (D) de longa circulação (*Stealth*[®]); (E) sítio-específicos, (F) com anticorpos ligantes na superfície e (G) com peptídeos e proteínas ligantes na superfície; (H) virossomas; (I) DNA-plasmídeo encapsulado em lipossomas catiônicos.



Fonte: Batista et al., (2007)

Dentre muitas vantagens, os lipossomas podem transportar substâncias hidro e lipossolúveis; apresentam alta afinidade pelas membranas biológicas, são constituídos de anfifílicos naturais biocompatíveis e biodegradáveis, por isso, vêm sendo utilizados, para aumentar a incorporação de substâncias ativas às células, como carreadores de fármacos, biomoléculas ou agentes de diagnóstico (CHORILLI et al., 2004) como veículo para liberação controlada de princípios ativos, como carreador de proteínas através da barreira hemato-encefálica, além de proteger os fármacos contra possíveis fatores de degradação como também, reduzir seus efeitos colaterais (HAYWARD; SMITH, 1990; SUZUKI; SAKON, 1990, MAGDASSI, 1997; RICCI et al., 2006).

A nomenclatura adotada para os lipossomas baseia-se em no seu número de bicamadas lipídicas (lamelas) e tamanho (SZOKA; PAPAHAADJOPOULOS, 1980). De acordo com o número de lamelas os lipossomas podem ser denominados como: vesículas multilamelares ou MLV (“multilamellar vesicles”) constituídas por várias bicamadas lipídicas, aproximadamente concêntricas, com diâmetro que varia entre 400 e 3500 nm (JULIANO, 1981); vesículas unilamelares são melhor definidas estruturalmente e por isso mais utilizadas, representadas pelas vesículas

2. Revisão da literatura

unilamelares grandes ou LUV (“large unilamellar vesicles”), de diâmetro superior a 100 nm, bem como as vesículas unilamelares pequenas ou SUV (“small unilamellar vesicles”), com diâmetro entre 20 e 50 nm (LICHTENBERG; BARENHOLZ, 1988; SANTOS; CANTANHO, 2002).

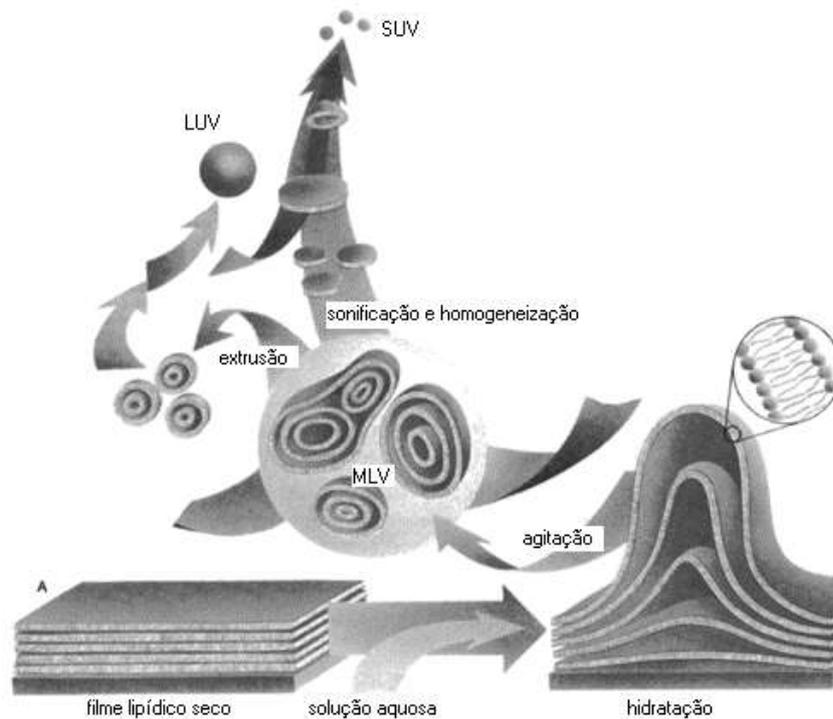
2.7.1 Métodos de obtenção dos lipossomas

O objetivo principal na preparação de lipossomas é a obtenção de vesículas com tamanho e estrutura adequados à encapsulação de fármacos ou substâncias bioativas com máxima eficiência (NEW, 1990; ANDRADE, 2003). Vários são os métodos de preparação de lipossomas conforme descritos (Figura 11) que, segundo Andrade (2003), se resumem basicamente a:

1. Dissolução dos fosfolípidios em um solvente orgânico normalmente clorofórmio ou mistura de clorofórmio e metanol;
2. Evaporação do solvente orgânico;
3. Hidratação do filme fosfolipídico em uma solução aquosa;
4. Dissolução da substância a encapsular na solução orgânica ou na solução aquosa, em função de seu equilíbrio hidrófilo/lipófilo;
5. Eliminação das substâncias não encapsuladas através de técnicas de separação como filtração em hidrogel, diálise ou centrifugação.

2. Revisão da literatura

Figura 11 - Representação esquemática das metodologias de preparação de MLV, SUV e LUV



Fonte: Santos, Castanho (2002).

A caracterização do produto final baseia-se segundo Andrade (2003), Pontes et al.-(1999) em:

1. Observações visuais e microscópicas, verificação de floculações, etc.
2. Tamanho das partículas.
3. Perfil reológico.
4. Estabilidade química.
5. Perda de material encapsulado.

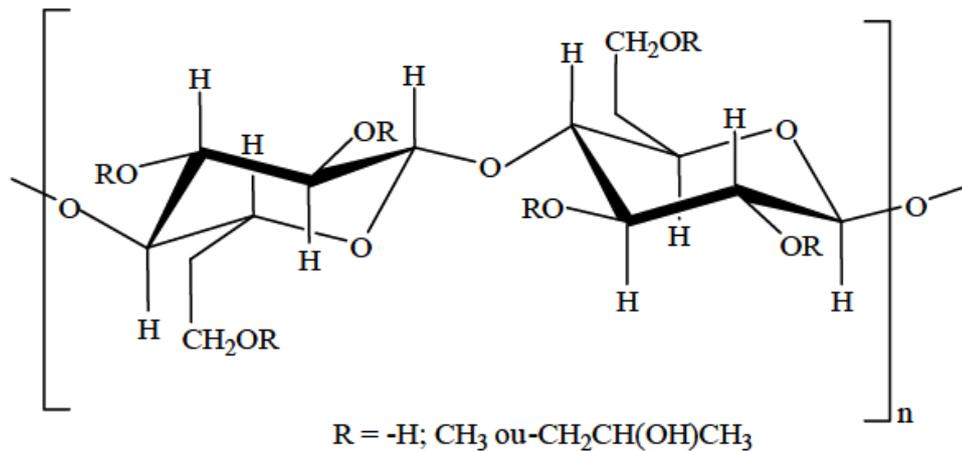
2.8 Hidroxipropilmetilcelulose

A hidroxipropilmetilcelulose (HPMC) é um éter de celulose, de caráter não iônico e de ampla utilização na indústria farmacêutica. Este polímero hidrossolúvel classifica-se de acordo com a sua viscosidade e a proporção entre os grupos substituintes

2. Revisão da literatura

(grupos metoxila e hidroxipropila) e seu grau de hidratação depende das características físico-químicas, como a molecular, o grau de substituição e a viscosidade. Do ponto de vista de tolerância fisiológica, a HPMC (Figura 12) não apresenta relatos de irritação cutânea ou relatos de toxicidade associada ao seu uso (XAVIER, 2006).

Figura 12 - Estrutura química da hidroxipropilmetilcelulose



Fonte: Vuebas, 2006.

Xavier (2006) estudou a influência do hidrogel de HPMC na penetração cutânea de genisteína em β -ciclodextrina. Verificou que o hidrogel comportou-se como uma matriz hidrogelificada capaz de controlar a liberação da genisteína quando comparada à formulação contendo genisteína em veículo volátil. Segundo a autora, isto se explica pelo fato de que ao evaporar o solvente, a genisteína contida na solução fica prontamente disponível sobre a pele, ao contrário do hidrogel que funciona como uma barreira a ser atravessada pela substância ativa até alcançar a pele.

Reddy, Mutalik e Rao (2006) realizaram estudos de permeação *in vitro*, em pele de camundongo e membrana de diálise, determinação de viscosidade, potencial de irritação cutânea e estabilidade a 4, 25 e 37°C, de quatro géis de MNX usando carbopol, hidroxipropilcelulose (HPC), hidroxipropilmetilcelulose e uma combinação dos dois últimos. A viscosidade dos géis apresentou-se dentro dos níveis adequados ao uso tópico (13,780±100 e 24,950±150 cP). Ao fim de 24 horas

2. Revisão da literatura

de experimento, o percentual de permeação através da membrana de diálise foi praticamente o mesmo para todos os géis (92.05 ± 1.52 e $93.52 \pm 1.95\%$), mas a percentagem de liberação do MNX contido no hidrogel de HPMC foi menor que na mistura HPC/HPMC. Nenhum dos géis apresentou irritabilidade cutânea e todos se mostraram estáveis durante o período de três meses.

3. OBJETIVOS

3. *Objetivos*

3.1 Objetivo geral

Desenvolver preparação lipossomal contendo minoxidil e avaliar sua atividade promotora de crescimento capilar em ratos Wistar.

3.2 Objetivos específicos

- Produzir (MLVs) com características adequadas ao uso tópico;
- Elaborar e caracterizar veículo utilizando polímero não iônico derivado da celulose;
- Avaliar o transporte *in vitro* dos lipossomas, através de pele de orelha de porco pelo método de célula de Franz;
- Investigar a atividade da formulação lipossomal nos modelos experimentais de alopecia *in vivo*.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Materiais

- Fosfatidilcolina de soja (PC) (98% Epikuron 200[®]) - Lucas Meyer de (Hamburgo, Alemanha)
- Colesterol (CH) - Sigma (Saint Louis, USA)
- Minoxidil (P.A.) - Sigma (Saint Louis, USA)
- Minoxidil (grau farmacêutico) - Valdequímica (São Paulo, Brasil)
- Solução de parabenos (Phenova[®]) - Mapric (São Paulo, Brasil)
- Hidroxipropilmetilcelulose (HPMC) - Henrifarma (São Paulo, Brasil)
- Metanol, P.A. - Merck (Darmstadt, Alemanha)
- Clorofórmio, P.A. - Merck (Darmstadt, Alemanha)
- Fosfato de sódio dibásico anidro P.A. - Merck (Darmstadt, Alemanha)
- Fosfato de sódio monobásico monohidratado, P.A. - Merck (Darmstadt, Alemanha)
- Hidróxido de sódio, P.A. - Merck (Darmstadt, Alemanha)
- Metanol grau cromatográfico - Merck (Darmstadt, Alemanha)
- Ácido acético glacial, P.A. - Merck (Darmstadt, Alemanha)
- Docusato de sódio – Synth (São Paulo, Brasil)
- Ácido perclórico – VETEC (Rio de Janeiro, Brasil)
- Trealose - Merck (Darmstadt, Alemanha)

4.1.1 Equipamentos e Acessórios

- Ultra-turrax modelo T25 - Janke & Kunkel, Alemanha
- Agitador mecânico modelo LR-51B – YAMATO, Japão
- Contador de partícula Delsa Nano S – BECKMAN COULTER[®], EUA
- Potenciômetro modelo W3B – BEL, Brasil
- Sonda de ultrassom modelo Vibracell – BIOBLOCK SCIENTIFIC, EUA
- Microscópio óptico modelo H55OS – NIKON, Japão
- Rotaevaporador modelo TE 184 – TECNAL, Brasil

4. Materiais e Métodos

- Células de difusão modelo Microette Q-Pak – HANSON, EUA
- Cromatógrafo modelo Alliance 2695 – Waters, EUA
- Medidor de potencial zeta Zetatrac modelo NC-148 – Microtrac, EUA
- Microscópio eletrônico de transmissão modelo G2 Spirit Biotwin TECNAI - República Tcheca
- Centrífuga modelo KR 20.000 T – KUBOTA - Japão
- Balança analítica modelo AY 220 – SHIMADZU - Japão
- Placa agitadora eletrônica her – TELESYSTEM

4.1.2 Soluções

- Tampão fosfato de sódio 0,1 M pH 7,4
- Foram dissolvidos em balão de 1000 mL contendo água destilada, 10,4520g de fosfato de sódio monobásico heptahidratado e 3,0408g de fosfato de sódio dibásico monohidratado. O pH foi ajustado para 7,4 com NaOH a 0,1 M.
-

4.1.3 Pele

A pele da região dorsal de orelha de porco foi usada como modelo para este ensaio. Para isto, as peles da face externa da orelha de porcos recentemente sacrificados foram afastadas da cartilagem e de resquícios de gordura com auxílio de pinça e bisturi. Em seguida, foram armazenadas a temperatura de -20°C, por até um mês antes de sua utilização.

4.2 Obtenção da curva analítica do minoxidil

A curva analítica de minoxidil (0,5 – 12,0 µg/mL) foi obtida, segundo USP-30 (2007), por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) utilizando o equipamento Alliance 2695 (Waters, Miliford, EUA) acoplado a um detector de arranjos de diodos (PDA) 2998 (Waters, EUA), operado a 281 nm. Foi utilizada uma coluna de fase reversa C₁₈ (150 mm × 4,6 mm, 5 mm, XBridge™ Waters) protegida por uma pré-

4. Materiais e Métodos

coluna da mesma composição (20 mm × 4,6mm), a taxa de fluxo de 0,9 mL.min⁻¹ a 39°C e um volume de injeção de 20 µL. O desempenho do sistema cromatográfico foi avaliado a partir dos seguintes parâmetros: número de pratos teóricos, fator de cauda e altura equivalente do prato teórico (HEPT), observando-se os cromatogramas obtidos na concentração de 4 µg/mL. Os limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) foram estimados de acordo com as diretrizes do ICH. O limite de detecção foi calculado através da fórmula: $LD = 3,3 (\sigma / I)$ e o limite de quantificação, através da fórmula: $LQ = 10 (\sigma / I)$, onde σ é o desvio padrão do intercepto com relação ao eixo dos Y e I é o valor da inclinação da curva analítica. Posteriormente, estabeleceu-se correlação linear entre concentração, considerada variável independente (x), e relação entre as áreas dos picos cromatográficos do fármaco e do padrão interno, considerada variável dependente (y). A linearidade foi avaliada através de análise de regressão linear, utilizando ajuste dos dados pelo método dos mínimos quadrados.

Fase móvel

Foi preparada uma solução formada pela mistura de metanol, água e ácido acético glacial (700:300:10) e adicionados 3,0 g de docusato sódico por litro de solução. O pH foi ajustado para 3,0 com ácido perclórico. A solução obtida foi filtrada a vácuo utilizando membrana de 0,45 µm (Millipore[®], Massachusetts, EUA) e degaseificada em banho de ultrassom por pelo menos 10 minutos.

Solução padrão

Para a solução padrão, preparada em duplicata, foram pesados 10 mg de minoxidil e transferidos para um balão volumétrico de 50 mL, onde foi adicionada fase móvel, obtendo-se assim, uma solução de concentração conhecida de cerca de 0,2 mg/mL. Em seguida, foram preparadas em triplicata, 06 diluições de cada solução padrão, em fase móvel, obtendo-se as concentrações apresentadas na Tabela 1. Cada diluição foi filtrada através de filtros millex acoplados a seringa

4. Materiais e Métodos

plástica, diretamente nos vials, identificada e injetada em HPLC. Os ensaios foram realizados em triplicata.

Tabela 1 - Concentrações de MNX para elaboração da curva analítica.

Concentração de MNX ($\mu\text{g/mL}$)	Volume da alíquota (μL)	Volume final (mL)
0,5	25,0	10
1,0	25,0	5,0
2,0	50,0	5,0
4,0	100,0	5,0
8,0	200,0	5,0
12,0	300,0	5,0

4.2.1 Estudo de recuperação do minoxidil extraído das amostras de pele

Para este ensaio foram fixados em superfície lisa fragmentos de pele de orelha de porco ($n = 3$ para cada concentração testada) com o estrato córneo voltado para cima, e procedeu-se à retirada desta camada da pele através da técnica de *tape stripping*, que consiste na aplicação de 15 fitas adesivas (3M[®]) consecutivamente. Em um tubo de extração foram colocadas as 15 fitas sem estrato córneo. Cada uma das 15 fitas, utilizadas por amostra, foi dobrada, colocada em tubo de extração e adicionada de soluções metanólicas de MNX com concentrações conhecidas de MNX (Tabela 2).

Tabela 2 - Volumes e concentrações de MNX contidos nas soluções metanólicas adicionadas às fitas adesivas contendo EC ou sem EC.

Solução de MNX* Volume da alíquota (μL)	Concentração teórica de MNX ($\mu\text{g/mL}$)
25	0,5
50	1,0
100	4,0

*Solução-mãe de MNX = 200 $\mu\text{g/mL}$

O solvente foi evaporado e foram adicionados 2,5 mL de fase móvel para extração do MNX das fitas contendo EC. As amostras foram agitadas em vórtex por cerca de 3 minutos em seguida, mantidas em banho de ultrassom por 30 minutos.

4. Materiais e Métodos

Por fim, foram centrifugadas durante 15 minutos a 8792 g, 4°C. O sobrenadante foi filtrado e analisado por HPLC.

4.2.2 Estudo de recuperação do minoxidil extraído das amostras de conteúdo folicular

O passo seguinte foi avaliar a recuperação do MNX extraído através da técnica de *stripping* diferencial com cola de cianoacrilato (TEICHMANN et al., 2005). Sobre cada recorte de pele sem EC, foi colocada uma gota de cola de cianoacrilato (Loctite®, São Paulo, Brasil) e sobre esta, uma lâmina de vidro que, após polimerização (aproximadamente 5 minutos), foi retirada trazendo aderida à sua superfície o material retido dentro dos folículos. Esse material foi transferido para tubos de extração e adicionado de soluções metanólicas de MNX com concentrações conhecidas (Tabela 3). O processo de extração se deu como descrito no item anterior (4.2.1).

Tabela 3 - Volumes e concentrações de MNX contidos nas soluções metanólicas adicionadas às amostras de cola de cianoacrilato contendo material retido nos folículos.

Solução de MNX* Volume da alíquota (µL)	Concentração teórica de MNX (µg/mL)
25	1,0
100	4,0
200	8,0

* Solução-mãe de MNX = 200 µg/mL

4.3 Obtenção dos lipossomas contendo minoxidil

Os lipossomas multilamelares (MLVs) contendo minoxidil nas concentrações de 2 e 4 mg/mL foram obtidos pelo método de hidratação do filme lipídico (LASIC, 1993). Foram pesados a fosfatidilcolina de soja (0,7568 g), colesterol (0,0952 g), minoxidil (0,010 g e 0,020 g) e solubilizados em mistura de clorofórmio:metanol (3:1) sob agitação magnética. Em seguida, os solventes empregados foram removidos por secagem à pressão reduzida, com o auxílio de um rotaevaporador. O filme obtido foi hidratado com 5 mL de tampão fosfato pH 6,8. A dispersão lipossomal

4. Materiais e Métodos

obtida (LMNX) foi analisada e fotografada por microscópio óptico (Nikon H55OS, Japão) acoplado a câmara fotográfica, com o objetivo de verificar a formação de vesículas multilamelares e a presença de cristais de MNX. Em seguida, dispersão lipossomal foi sonicada em sonda de ultrassom (Bioblock Scientific Vibra cell, USA) em banho de gelo, por 20 segundos, a 200 W e 40 Hz e armazenada, sob refrigeração, em frascos de vidro âmbar devidamente identificados para posterior caracterização e utilização.

4.3.1 Caracterização dos lipossomas contendo minoxidil

4.3.1.2 Determinação da eficiência de encapsulação (EE%)

Na determinação do teor de MNX nas suspensões lipossomais foram transferidas alíquotas de LMNX2 e LMNX4 equivalente a 40,0 µg do analito para balão volumétrico de 10 mL. Em seguida, adicionou-se 0,5 mL de metanol. As amostras foram submetida à sonicação por 2 minutos para romper a estrutura lamelar dos lipossomas e liberar o minoxidil encapsulado. Por fim, os volumes das amostras foram completados com a fase móvel, obtendo-se uma concentração teórica de minoxidil, na amostra, que foi de 4,0 µg/mL. As amostras foram filtradas através de membranas de celulose de poros de 0,22 µm (Millipore, Massachusetts, EUA) e analisadas por HPLC. A concentração de MNX nas amostras foi determinada pela curva analítica. Os ensaios de doseamento foram realizados em triplicata.

Para determinação da taxa de fármaco livre (não encapsulado) foi utilizado o método indireto de ultrafiltração/centrifugação (CAVALCANTI et al., 2011). Foram transferidas alíquotas de 400 µL de LMNX2 e LMNX4 para unidades filtrantes Ultrafree® (Millipore, EUA; cut-off = 10.000 Da) e procedeu-se à técnica de centrifugação a 8792 g durante 1 hora. Vinte e cinco microlitros do conteúdo filtrado foram diluídos em 25 mL de fase móvel e o MNX foi quantificado por HPLC conforme descrito no parágrafo anterior. Os dados da eficiência de encapsulação foram calculados utilizando a Equação (II).

$$E (\%) = \frac{Teor - MNX \text{ não encapsulado}}{Teor} \times 100 \quad \text{Equação III}$$

4.3.1.3 Análise do tamanho de partícula e índice de polidispersão

A análise do diâmetro médio de partícula e índice de polidispersão PDI foi executada pela técnica de espectroscopia de correlação de fótons. Alíquotas de 300 µL de LMNX2 e LMNX4 foram diluídas em 1000 µL de água deionizada e submetidas à leitura em equipamento Delsa Nano S, (Beckman Coulter, Pasadena, USA).

4.3.1.4 Determinação do potencial zeta

Para determinação da carga de superfície (potencial zeta) dos lipossomas, foram diluídos 50 µL de LMNX em 5 mL de água ultra-pura e analisados em aparelho Zetatrac NC-148 (Microtrac, North Largo, EUA).

4.3.1.5 Microscopia Eletrônica de Transmissão

Uma alíquota de LMNX foi diluída em água destilada (1:200), em seguida, uma gota desta diluição foi colocada no filme suporte de carbono. Após um minuto, o suporte foi enxugado com papel de filtro e corado com uma gota solução a 1% de ácido fosfotúngstico. A gota foi seca por capilaridade em papel de filtro após 1 minuto de contato. As telas foram deixadas no dessecador até o momento de serem levadas ao microscópio eletrônico de transmissão (Tecnai G2 Spirit Biotwin, República Tcheca) que foi operado a 80 KV.

4.3.1.6 Estudo de estabilidade

As dispersões lipossomais obtidas (LMNX2 e LMNX4) foram submetidas, em triplicata, a estudo de estabilidade acelerada através de centrifugação (3,165 g) por 1 hora a 4°C (centrífuga Kubota, Japão) e estresse mecânico em agitador com movimento horizontal (Polytest 20, Bioblock Scientific, USA) a 180 vibrações/minuto durante 48 horas a 37°C. Para avaliação da estabilidade em longo prazo, aspecto macroscópico, variação de pH, tamanho de partícula e índice de polidispersão (PDI) foram monitorados logo após a preparação e pelo período de estocagem nos tempos 7, 14, 30 e 60 dias (CAVALCANTI et al., 2011).

4.4 Obtenção do hidrogel de hidroxipropilmetilcelulose (HPMC) e incorporação de LMNX

A preparação do hidrogel de HPMC em concentrações de 1,5, 2,0 e 2,5% (Tabela 4) deu-se por aquecimento da água destilada até 70°C, quando foi adicionada a solução de parabenos/fenoxietanol (Phenova[®]) e mantido sob agitação magnética em placa aquecedora até completa solubilização do conservante. Em seguida, a água preservada foi vertida no HPMC previamente pesado e disperso em propilenoglicol e deixado em repouso para hidratar até o dia seguinte, quando foi submetido à agitação (400 rpm) em misturador mecânico (YAMATO, modelo LR-51B, Japão). O pH (6,5) do gel obtido foi determinado diretamente nas amostras utilizando potenciômetro modelo W3B – BEL (Brasil).

Os produtos foram envasados em frascos de vidro com tampa e identificados para posterior caracterização.

Tabela 4 - Composição do hidrogel de hidroxipropilmetilcelulose.

Composição	Concentrações (m/V)
HPMC	1,5 - 2,0 - 2,5%
Propilenoglicol	5%
Solução de parabenos/fenoxietanol (Phenova [®])	0,2%
Água destilada qsp	100 mL

4. Materiais e Métodos

A dispersão lipossomal (LMNX), contendo minoxidil na concentração de 4,0 mg/mL, foi incorporada na proporção 1:4 (v/v) ao hidrogel de hidroxipropilmetilcelulose (HPMC) em suas três concentrações (1,5; 2,0 e 2,5%) com homogeneização manual (HURLER et al., 2013) obtendo-se formulação com concentração final de MNX igual a 1 mg/mL. As formulações foram armazenadas a 4°C e avaliadas macroscopicamente, a cada 3 dias, quanto à homogeneidade por um período de 15 dias.

4.5 Caracterização físico-química das formulações

A caracterização físico química dos LMNX, do fármaco livre, da mistura física LMNX:hidrogel de HPMC (1:4) e do polímero isolado deu-se através das seguintes análises:

4.5.1 Determinação da concentração de MNX em LMNX/HPMC

Para a determinação do teor de MNX em LMNX/HPMC, foram pesados 100 mg da formulação aos quais foram adicionados 0,5 mL de metanol. Em seguida, a amostra foi agitada por um minuto em vórtex e levada ao banho de ultrassom por 10 minutos. Por fim, completou-se o volume para 10 mL com fase móvel (seção 4.2). Filtrou-se e injetou-se em HPLC.

4.5.2 Determinação da espalhabilidade

A determinação da espalhabilidade de LMNX/HPMC nas três concentrações (1,5%, 2,0% e 3,0%) foi realizada por metodologia descrita por Knorst (1991). Nesta metodologia utilizam-se placas de vidro posicionadas sobre uma escala de papel milimetrado para determinar a superfície que a amostra abrange, através da medição dos diâmetros perpendiculares, para realização do cálculo do diâmetro médio. Procedeu-se da seguinte forma: com auxílio de uma seringa, colocou-se 0,5 g da amostra sobre a placa de vidro e, sobre esta, uma placa de vidro de peso

4. Materiais e Métodos

conhecido (52,6446 g). Após 1 minuto, foi realizada a leitura dos diâmetros abrangidos pela amostra. Em intervalos de 1 minuto, foram adicionadas outras placas de vidro de pesos conhecidos (70,0193 g, 70,2349 g e 70,3389 g) e, medidos os diâmetros de espalhamento da amostra. Estas medidas foram expressas em espalhabilidade da amostra em função do peso aplicado, correspondentes à média de três determinações de acordo com a Equação (III). Este ensaio foi repetido para cada uma das amostras em estudo. A espalhabilidade (E_i), a $24 \pm 2^\circ\text{C}$, foi calculada a partir da seguinte Equação (IV)

$$E_i = [d^2 \cdot \pi / 4] \quad (\text{Equação IV})$$

Onde:

E_i = espalhabilidade da amostra para um determinado peso i (mm^2)

D = diâmetro médio (mm) alcançado pela amostra após a sobreposição de cada placa

4.5.3 Difração de Raios-X

As amostras a serem analisadas por DRX, FTIR e DSC foram MNX (pó), gel de HPMC e LMNX/HPMC na forma de filmes armazenados em dessecador, lipossoma sem MNX (LIPB) e LMNX liofilizados contendo 10% de trealose como crioprotetor.

Os estudos de cristalinidade do MNX, lipossomas sem fármaco (LIPB), LMNX, HPMC e LMNX/HPMC foram conduzidos em difratômetro de Raios-X (DS Advance, Bruker Optic, Germany), com radiação Cu-Ni ($\lambda = 1,542 \text{ \AA}$) a 30 kV, 30 mA e ângulo de difração na faixa de 3° e 60° .

4. Materiais e Métodos

4.5.4 Espectroscopia no infravermelho (FT-IR)

Os espectros de infravermelho foram obtidos de um Espectrômetro FT Bruker Vertex 70 (Bruker Optik, Ettlingen, Germany). As amostras foram analisadas em faixa de comprimento de onda de 650 a 4000 cm^{-1} usando o aparato de reflectância total atenuada (ATR).

4.5.5 Calorimetria diferencial exploratória (DSC)

A calorimetria diferencial exploratória (DSC) foi realizada em equipamento da marca Netzsch STA 449 F3 Jupiter (Netzsch, Selb, Alemanha). As curvas calorimétricas foram realizadas a partir de temperatura ambiente até 400°C, a 10°C min^{-1} , em fluxo de nitrogênio, utilizando uma cápsula aberta de alumínio contendo aproximadamente 5 mg de amostra.

4.6 Estudo *in vitro* de liberação do MNX a partir das formulações desenvolvidas

Vários estudos já foram efetuados visando analisar liberação e permeação de MNX em nanocarreadores em produtos de uso tópico (SHIM et al., 2004; JAIN et al., 2010; MALI et al., 2013). Baseada nestes estudos, foi feita a escolha de tampão fosfato pH 7,4 como solução receptora.

Na montagem do aparato de difusão, as membranas de acetato de celulose (Cut-off = MW 12000 – 14000, Fisher Scientific, EUA) foram dispostas sobre as células de difusão de Franz (área da membrana ~ 1,86 cm^2 e volume receptor de ~ 7 mL, n = 6 para cada formulação) já preenchidas pela solução receptora constituída de tampão fosfato 0,1 M pH 7,4. A solução receptora foi mantida sob agitação magnética a 300 rpm e à temperatura de 37 ± 0,5°C. As formulações foram dispostas sobre as membranas nos compartimentos doadores das células de difusão vertical. Alíquotas de 1 mL da fase receptora foram coletadas automaticamente em intervalos de tempo pré-determinados (15, 30 e 45 minutos, em seguida, a cada hora até 12 horas). O volume de meio receptor foi

4. Materiais e Métodos

imediatamente resposto a cada coleta. Para obtenção da concentração de fármaco liberada na fase receptora, as alíquotas retiradas (1 mL) foram filtradas e analisadas por HPLC nas condições descritas no item 3.2.2.1. As formulações utilizadas neste estudo (LMNX e LMNX/HPMC) possuíam concentrações diferentes de MNX correspondentes a 4 mg/mL e 1 mg/mL respectivamente.

As formulações utilizadas neste estudo, suas concentrações de minoxidil bem como, a quantidade colocada sobre a área da membrana (fase doadora) se encontram na Tabela 5.

Tabela 5 - Formulações utilizadas nos estudos de permeação e retenção em EC e folículos

Formulações	Concentração de MNX (mg/mL)	Quantidades colocadas sobre as membranas (mL)
LMNX	4,0	0,50
LMNX/HPMC	1,0	0,50
*MNX solução	20,0	0,05

*Só para ensaio de retenção no EC e folículos.

4.6.1 Determinação da quantidade real de MNX liberada – Cálculos para a correção da diluição.

Devido à retirada das alíquotas para análise, fez-se necessária a correção dessa diluição no cálculo da quantidade liberada acumulada de MNX ao longo das 12 horas de estudo, segundo a Equação (V):

$$Q_{\text{real, t}} = C_{\text{mensurada, t}} \cdot V_r + V_a \cdot \sum^{n-1} C_a \quad \text{Equação - V}$$

Onde: $Q_{\text{real,t}}$ = quantidade real liberada acumulada no tempo t

$C_{\text{mensurada, t}}$ = concentração mensurada da amostra no tempo t

V_r = volume do receptor (7,0 mL)

V_a = volume de amostra coletada (2 mL)

C_a = concentração de amostra coletada.

4. Materiais e Métodos

Dessa forma, a quantidade real liberada acumulada de fármaco no tempo t é igual à quantidade mensurada no tempo t , somada à quantidade total retirada do compartimento receptor, para a quantificação das amostras anteriores.

4.6.2 Determinação da cinética de liberação de MNX a partir das formulações estudadas

O perfil de liberação do MNX, a partir das formulações LMNX e LMNX/HPMC, foi obtido graficamente relacionando-se a quantidade liberada acumulada de ativo por área pelo tempo do experimento. O perfil obtido foi utilizado para determinação da cinética de liberação, através da construção de três modelos gráficos:

- a) Quantidade real liberada acumulada ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$) *versus* tempo (h) - Modelo Cinético de Ordem Zero
- b) Quantidade real liberada acumulada ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$) *versus* \sqrt{t} (h) – Modelo Cinético de Higuchi;
- c) Log da Quantidade real liberada acumulada ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$) *versus* tempo (h) – Modelo Cinético de Primeira Ordem.

Os dados foram analisados estatisticamente pelo método de regressão linear dos mínimos quadrados e, o gráfico que apresentou maior coeficiente de correlação linear (r) definiu a cinética de liberação (COSTA; LOBO, 2001). Após a definição da cinética de liberação, foi determinada a velocidade de liberação do MNX a partir das formulações através da inclinação da reta correspondente. Com o objetivo de normalizar os resultados obtidos para as formulações, as quais continham concentrações iniciais de MNX diferentes, o coeficiente de difusão (D), em $\text{cm}^2.\text{s}^{-1}$ foi calculado através da Equação VI (MERCLIN; BRAMER; EDSMAN, 2004)

$$Q = 2C_0 \sqrt{Dt/\pi} \quad (\text{Equação VI})$$

Onde: Q = quantidade do fármaco liberada por unidade de área,

4. Materiais e Métodos

C_0 é a concentração inicial do fármaco nas formulações

D = coeficiente de difusão

t = tempo total do experimento

Esta equação é válida para os primeiros 60% liberados do ativo. Para que esta equação possa ser utilizada, o gráfico desta liberação inicial do fármaco relacionada com a raiz quadrada do tempo deve ser linear.

4.6.3 Estudo *in vitro* do perfil de retenção no EC e folículos a partir da formulação LMNX/HPMC

Visando verificar se o tempo de contato da formulação LMNX/HPMC com a pele tem influência sobre a retenção do MNX na pele e nos folículos, foram realizados ensaios de permeação em células de Franz em quatro diferentes tempos (2, 4, 6 e 12 horas).

Neste ensaio, as peles de orelha de porco foram colocadas nas células de difusão vertical do tipo Franz com a fase receptora preenchida com tampão fosfato pH 7,4 e a fase doadora recoberta por quantidade determinada (500 mg) da formulação LMNX/HPMC. As condições do estudo foram as mesmas observadas para o ensaio de cinética de liberação do fármaco, sendo que, ao final de cada ensaio, as células foram desmontadas, as alíquotas obtidas da fase receptora foram filtradas e submetidas à análise por HPLC. As membranas de orelha de porco foram submetidas aos ensaios de *tape stripping* e *stripping* diferencial conforme descrito a seguir nos itens 4.6.3.1 e 4.6.3.2

4.6.3.1 Ensaio *in vitro* de determinação da retenção no EC

Após os experimentos de permeação, a verificação da retenção cutânea do MNX, se deu através da técnica de *tape stripping*. Para isto, as peles de orelha de porco foram retiradas das células de difusão, lavadas com água destilada para retirada do excesso de formulação e, secas com papel toalha. Em seguida, foram fixadas com fitas adesivas em superfície lisa, com o estrato córneo voltado para cima de forma

4. Materiais e Métodos

que apenas a área de permeação ficasse exposta. Sobre esta área, foram aplicadas 15 fitas adesivas (3M[®]) para retirada do estrato córneo o que foi visualizado pelo brilho da pele sinalizando que a epiderme viável foi atingida (LIRA, 2007). A primeira fita foi desprezada por conter excesso de formulação e as fitas restantes foram colocadas em tubos de extração contendo 2,5 mL da fase móvel, agitados em vórtex por 3 minutos e mantidos em banho de ultrassom por 30 minutos. Em seguida, os tubos foram centrifugados durante 15 minutos a 10.000 rpm, 4°C. Após filtração, as soluções foram analisadas por HPLC para determinação da quantidade de MNX presente no estrato córneo (EC).

4.6.3.2 Ensaio *in vitro* de determinação da penetração folicular

O passo seguinte foi o *stripping* diferencial com cola de cianoacrilato (TEICHMANN et al., 2005) para determinação da retenção intrafolicular de MNX. Sobre cada recorte de pele sem EC, foi colocada uma gota de cola de cianoacrilato (Loctite[®], São Paulo, Brasil) e sobre esta, uma lâmina de vidro que, após polimerização (aproximadamente 5 minutos), foi retirada trazendo aderida à sua superfície o material retido dentro dos folículos. Esse material foi transferido para tubos de extração contendo 2,5 mL de fase móvel e procedeu-se à recuperação do MNX conforme procedimento descrito no item anterior (item 4.6.3.1).

4.6.3.3 Estudos *in vitro* de permeação e retenção cutânea do MNX a partir das formulações desenvolvidas

Após conhecimento do perfil de retenção no EC e nos folículos a partir da formulação LMNX/HPMC, as retenções no EC e nos folículos a partir das formulações LMNX e MNX solução foram avaliadas em estudos *in vitro* com duração de 12 horas. As quantidades de formulações colocadas sobre as membranas na fase doadora foram as mesmas utilizadas nos ensaios de liberação (Tabela 5).

4.7 Ensaio *in vivo* de avaliação de eficácia de LMNX/HPMC

Para realização dos estudos *in vivo* foram empregados 36 ratos (*Ratus norvegicus, albinus Wistar*), machos, com idade de 7 a 8 semanas e peso variando entre 120 e 150 gramas. Procedentes do Biotério do Departamento de Nutrição, UFPE. Estes animais foram mantidos em ambiente ventilado sob a temperatura controlada com ração e água *ad libitum*. Os animais foram acondicionados sob condições de controle de temperatura ($25\pm 2^\circ\text{C}$) e aclimatizados para um ciclo de 12h:12h claro:escuro. Os experimentos com os animais foram conduzidos de acordo com o protocolo da comissão de ética em experimentação animal (CEEA) da UFPE (n° 23076.028641/2013-73).

4.7.1 Indução da Fase anágena

A indução da fase anágena nos ratos Wistar deu-se conforme protocolo de Roy et al., (2008). Cada animal foi pesado e previamente anestesiado com uma associação de ketamina/xilazina por via intramuscular na dose de 15mg/kg e 50mg/kg, respectivamente. Em seguida, dispostos em decúbito dorsal sobre a mesa operatória e submetidos à depilação (área de 3 cm^2) com retirada manual dos pelos. Um removedor de pelo comercializado (cera depilatória fria) também foi utilizado para assegurar a completa remoção do folículo piloso.

4.7.2 Tratamento

Os animais tiveram os dorsos marcados com solução de ácido pícrico e foram separados aleatoriamente em cinco grupos experimentais ($n = 36$), a saber: Grupo Controle = animais não tratados; Grupo referência = animais tratados com 1 mL (Rogaine[®] solução a 2%). Grupo Tratado = animais tratados com 1 mL de LMNX/HPMC (1 mg/mL).

4. Materiais e Métodos

Os grupos experimentais (n=12) foram subdivididos em quatro subgrupos (n=3) conforme o período de tratamento, 7, 14, 21 e 28 dias. A aplicação das formulações na área depilada foi realizada com massagens com duração de 1 minuto, uma vez ao dia, durante 28 dias. A cada 7 dias de tratamento, um subgrupo de 3 animais foi morto por overdose de anestésico (urethane 1,25g/kg), em seguida as áreas demarcadas foram removidas e conservadas em solução de formaldeído tamponada a 10%. Posteriormente, os espécimes foram submetidos à desidratação, diafanização e inclusão em blocos de parafina para serem cortados em micrótomo e corados com Hematoxilina e Eosina (H.E.).

4.7.3 Parâmetros histológicos a serem analisados

4.7.3.1 Análise Qualitativa

A análise qualitativa do crescimento dos pelos foi realizada pela observação visual dos seguintes parâmetros: tempo de início do crescimento dos pelos na área depilada e tempo de crescimento completo dos pelos para cobrir totalmente a área depilada (ROY et al., 2007). O tempo inicial e final do crescimento capilar foi registrado para cada grupo de ratos em relação ao padrão e o controle, durante o tratamento.

4.7.3.2 Análise Quantitativa

A análise quantitativa de da eficácia de LMNX/HPMC dividiu-se em duas etapas:

a) Determinação de número de folículos por milímetro linear de pele de rato

A determinação do número de folículos pilosos por milímetro linear de pele de rato foi feita por contagem em cortes longitudinais de 4 µm de espessura fotografados por câmara acoplada a microscópio ótico com aumento de 1000X.

4. Materiais e Métodos

b) Determinação da proporção de folículos pilosos de acordo com as fases do ciclo capilar

A proporção de folículos pilosos em fases cíclicas anágena (fase de crescimento ativo) e telógena (fase de repouso) foi determinada por contagem dos folículos presentes em cortes transversais (4 μm) de pele de rato.

5. ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Para análise estatística dos dados foi utilizado o Programa SPSS 15.0. Para comparação das médias dos tratamentos, foram utilizados os testes de Kruskal-Wallis e Tukey, a 5% de probabilidade de erro.

6. RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1 Obtenção da curva analítica do minoxidil

As condições analíticas para determinação do MNX foram baseadas nos dados de literatura (USP 30, 2007; GORECKI, 1988). A curva analítica apresentou-se linear entre as concentrações de 0,5 a 12 µg/mL apresentando um coeficiente de correlação de 0,9999 (Tabela 4). Os dados foram obtidos a partir de 3 curvas analíticas autênticas.

O Limite de Quantificação (LQ) de um método analítico representa a menor concentração da substância em análise que pode ser medida com precisão e exatidão. Sendo assim, valores de concentração maiores ou iguais ao LQ estimado, podem ser medidos com precisão e exatidão o que representa a sensibilidade do método (BRASIL, 2003; USP, 2007; BABY, 2007). O LQ deste método foi de 0,324 µg/mL e os resultados obtidos a partir de três curvas autênticas se encontram na Tabela 6.

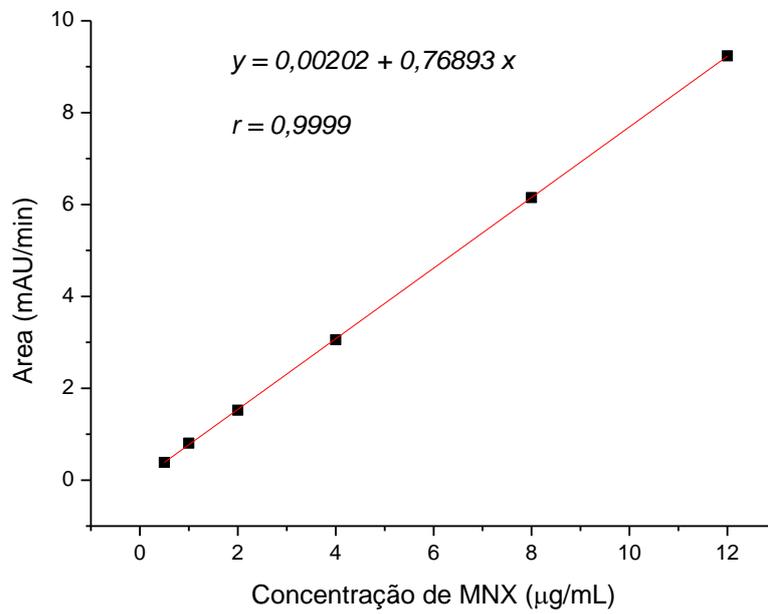
Tabela 6 - Resultados das áreas dos picos obtidos por HPLC e coeficientes de correlação para elaboração da curva analítica do MNX em comprimento de onda de 281 nm.

Concentração (µg/mL)	Áreas (mAU/min)		
	Curva 1	Curva 2	Curva 3
0,5	0,39144	0,37215	0,38934
1,0	0,84598	0,77201	0,79653
2,0	1,52980	1,50413	1,53284
4,0	3,08617	2,99173	3,09340
8,0	6,26655	6,11980	6,06885
12,0	9,55556	9,13337	9,02303
	r = 0,99991	r = 0,99992	r = 0,99999
	Média r ± dp = 0,99994 ± 0,00008		

A Figura 13 mostra a curva analítica obtida por HPLC do MNX em fase móvel constituída por metanol:água:ácido acético (70:30:10). Os resultados representam a média ± desvio padrão de três determinações. A equação da reta, de ajuste dos dados, foi: área = - 0193 + 0,77819 [MNX] e o coeficiente de correlação linear = 0,9999 mostrando que a curva analítica encontra-se dentro da faixa de linearidade do método.

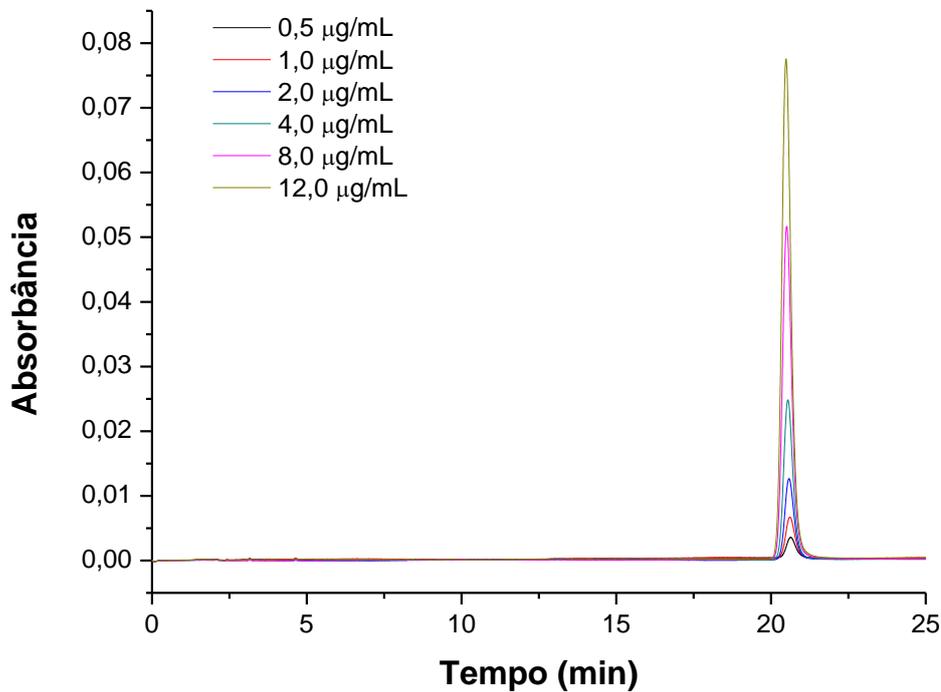
6. Resultados e Discussão

Figura 13 - Curva analítica de minoxidil obtida por HPLC.



Os cromatogramas obtidos através da quantificação do MNX encontram-se representados pela Figura 14. O tempo de retenção foi de aproximadamente 20 minutos.

Figura 14 - Cromatogramas obtidos com injeção das diluições de minoxidil.



6.2 Obtenção e caracterização das dispersões lipossomais

Tamanho, carga e lipofilia de nanossistemas, além da escolha do nanocarreador ou o uso de facilitadores de penetração, são importantes parâmetros físico-químicos relacionados ao transporte transdérmico e transfolicular (ILLEL, 1997; LAUER et al., 1995; TOLL et al., 2004). A definição do tamanho de vesícula para a realização deste estudo deu-se inicialmente, baseada nos relatos Toll et al., (2004) e Jain et al., (2010) sobre penetração folicular de nanocarreadores. Os primeiros autores verificaram que microesferas de poliestireno com tamanho de 0,75 a 1,5 µm apresentaram maior tendência à penetração folicular em pele humana, embora partículas de até 6 µm tenham sido capazes de penetrar em folículos terminais e vellus no compartimento entre a cutícula e a bainha radicular interna dos folículos.

6. Resultados e Discussão

Jain e colaboradores realizaram estudos de permeação em pele de rato albino utilizando lipossomas multilamelares neutros de tamanhos entre 3 e 4 μm e verificaram, através de microscopia de fluorescência, a penetração destas vesículas em toda a extensão dos folículos capilares. Além destes, os estudos de Du Plessis et al., (1994) relatam que lipossomas de tamanho intermediário (300 nm) apresentaram maior retenção de fármaco na pele que as vesículas pequenas (60 nm).

Embora o estudo de Toll et al., (2004) tenha sido elaborado com microesferas, a elaboração de lipossomas proposta nesta tese, tem a intenção de verificar se a maleabilidade proporcionada pela maior fluidez destas vesículas de tamanho intermediário (aproximadamente 600 nm) que contêm colesterol, resulta em maior penetração folicular e retenção no estrato córneo.

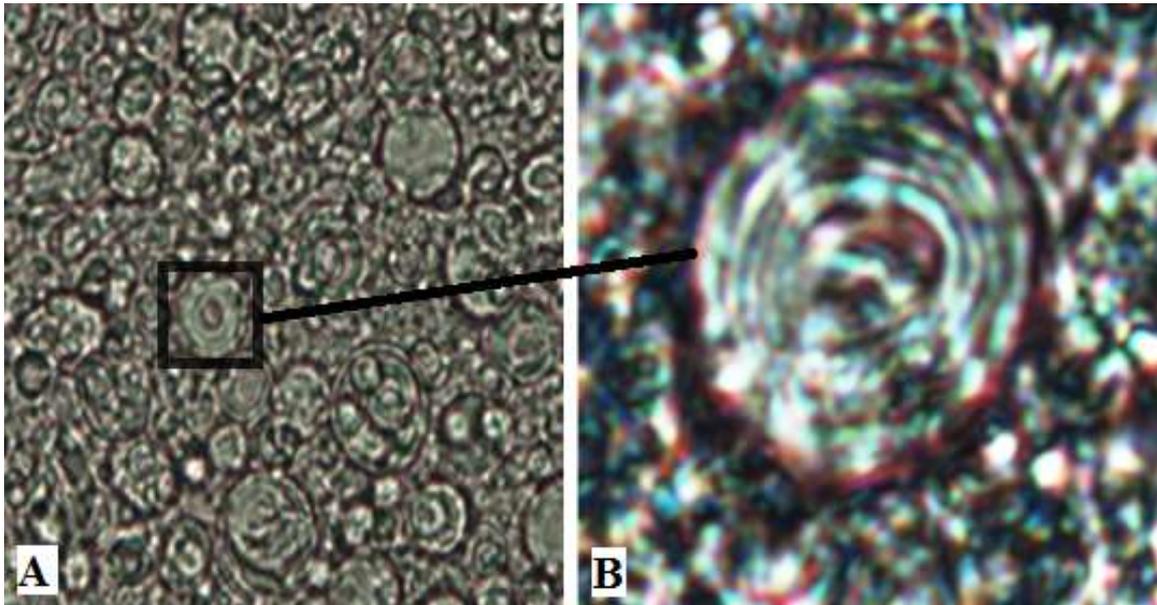
Foram elaboradas inicialmente, pelo método de hidratação do filme lipídico (BANGHAM; STANDISH; WATKINS, 1965), duas dispersões lipossomais (LMNX2 e LMNX4) de 234 mM, contendo minoxidil nas concentrações de 2 e 4 mg/mL respectivamente.

Antes de serem submetidas à sonicação, as dispersões obtidas foram examinadas por microscopia óptica com o objetivo de verificar a formação de vesículas multilamelares e a presença de cristais de MNX.

As imagens (Figura 15) revelam diversas vesículas multilamelares e, no detalhe, as bicamadas lipídicas evidenciando o núcleo central. Não foram detectados cristais de MNX.

6. Resultados e Discussão

Figura 15 - Microscopia óptica da dispersão lipossomal contendo minoxidil.



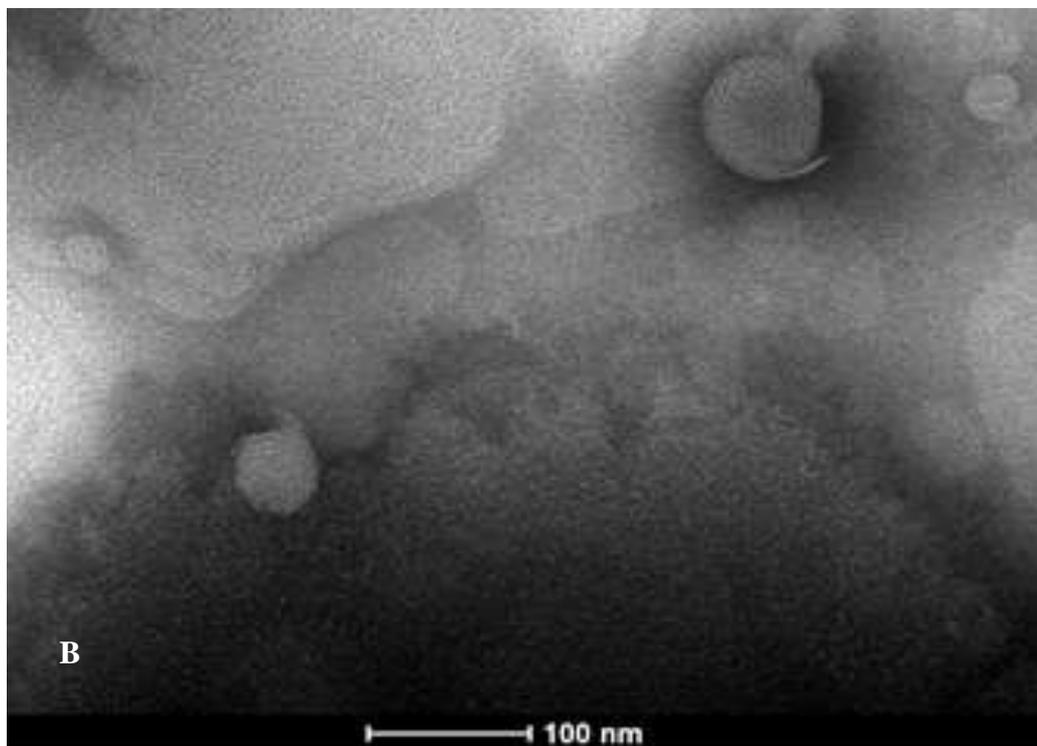
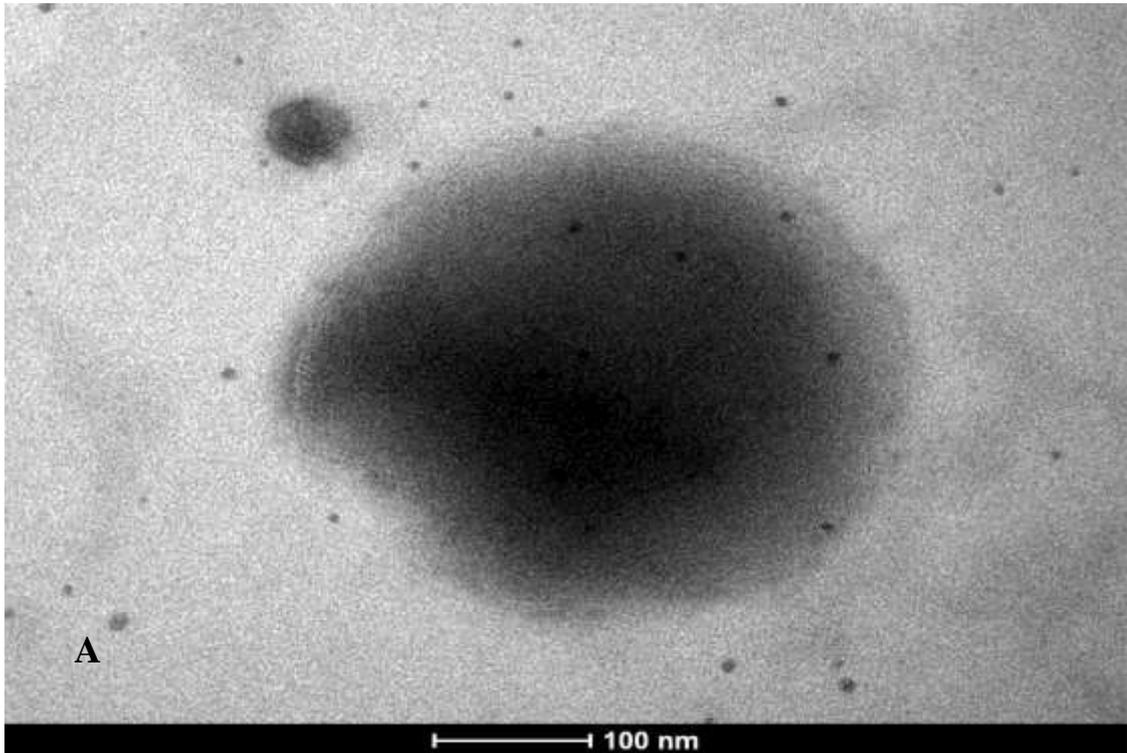
Magnificações: (A) 400X e (B) 1000X.

Fonte: Acervo pessoal

Após sonicação, os LMNX foram submetidos à análise por microscopia eletrônica de transmissão (MET). As imagens (Figura 16) confirmam a presença de vesículas multilamelares (MLVs).

6. Resultados e Discussão

Figura 16 - Fotomicrografias de LMNX por microscopia eletrônica de transmissão. MLVs (A e B) exibem múltiplas bicamadas concêntricas. Descreva o título para junto da figura



6. Resultados e Discussão

Em seguida, as dispersões foram caracterizadas quanto a tamanho de partícula (TP), índice de polidispersão (PDI), pH e eficiência de encapsulação (EE%). As características iniciais destas dispersões se encontram na Tabela 7.

Tabela 7 - Características das dispersões lipossomais contendo MNX nas concentrações de 2 mg/mL (LMNX 2) e 4 mg/mL (LMNX 4).

Características	LMNX2	LMNX4
TP (nm)	586,1 ± 5,1	588,3 ± 1,1
PDI	0,270 ± 0,003	0,283 ± 0,006
pH	6,8	6,8
EE%	43,45 ± 5,65	50,30 ± 0,10

LMNX2 (lipossomas contendo MNX 2 mg/mL); MNX4 (lipossomas contendo MNX 4 mg/mL); TP: tamanho de partícula; PDI: índice de polidispersão; EE%: eficiência de encapsulação

O valor de eficiência de encapsulação obtido para a formulação LMNX4 (50,3 ± 0,1 %) foi semelhante ao de lipossomas multilamelares contendo MNX elaborados por Jain et., (2010), com razão molar de fosfatidilcolina:colesterol (9:1) e que foi de 54,5 ± 1,22 %.

Por outro lado, quando comparados aos valores de eficiência encontrados por Mura et al., (2007), que foram de 37 ± 2 % e 15 ± 1%, os obtidos para LMNX2 e LMNX4 foram maiores. Em seu trabalho, os autores elaboraram dois tipos de lipossomas multilamelares pelo método de desidratação e reidratação descrito por Kirby e Gregoriades (1984). A primeira formulação, com composição semelhante ao deste estudo, contendo fosfatidilcolina e colesterol (20 µmol/mL e 3 µmol/mL) respectivamente, e diâmetro de 324 ± 26 µm; a segunda, composta de lecitina e dicetil fosfato (40 µmol/mL e 10 µmol/mL), com diâmetro de 206 ± 22 nm e menor eficiência de encapsulação dentre as duas formulações.

A menor eficiência de encapsulação dos lipossomas obtidos por Mura, talvez se deva ao menor diâmetro dos lipossomas e é possível haver uma relação direta entre estes dois parâmetros (MURA et al., 2007). Esta hipótese parece ser confirmada pelos resultados obtidos com os lipossomas de tamanho médio LMNX2 e LMNX4 (Tabela 6).

Outro aspecto alegado pelos autores, é que os lipossomas com maior eficiência de encapsulação eram compostos de fosfatidilcolina e colesterol, por isso, possuíam maior tamanho e estabilidade.

Jain et al., (2010) atribuem a maior eficiência de encapsulação à presença de carga de superfície que promove o aumento do espaço interlamelar devido à mesma carga na bicamada. Esta afirmação não se confirma nos resultados obtidos por Mura et al., (2007) pois as vesículas lipossomais de seu estudo possuíam carga de superfície negativa e, mesmo assim, baixa eficiência de encapsulação do minoxidil.

6.3 Estudo da estabilidade

As dispersões lipossomais (LMNX2 e LMNX4) resistiram aos testes de estabilidade acelerada (centrifugação e estresse mecânico), preservando suas características iniciais como tamanho de partícula e índice de polidispersão (Tabela 8).

Tabela 8 - Características das dispersões lipossomais contendo MNX (LMNX2 e LMNX4) após os testes de estabilidade acelerada.

Produto/parâmetro Avaliado	Centrifugação 3,165 g	Agitação mecânica 180 vibrações/min
LMNX2		
TP (nm)	587,4 ± 2,0	598,0 ± 3,4
PDI	0,273 ± 0,01	0,279 ± 0,012
pH	6,8	6,8
Aspecto macroscópico	Sem precipitação	Sem precipitação
LMNX4		
TP (nm)	588,0 ± 0,3	606,5 ± 5,3
PDI	0,279 ± 0,012	0,303 ± 0,002
pH	6,8	6,8
Aspecto macroscópico	Sem precipitação	Sem precipitação

TP: tamanho de partícula; PDI: índice de polidispersão.

Embora as duas dispersões tenham se mostrado estáveis durante os ensaios de estabilidade acelerada, a dispersão lipossomal LMNX4 foi escolhida para seguimento dos estudos devido à concentração de fármaco encapsulado (4mg/mL) que possibilita melhor ajuste de dose na formulação final, ou seja, a dispersão lipossomal em hidrogel de HPMC (LMNX/HPMC). Desse modo, a dispersão LMNX4 foi submetida ao teste de estabilidade em longo prazo.

6. Resultados e Discussão

Antes de se iniciar o teste de estabilidade em longo prazo, foi feita a determinação da carga de superfície das vesículas (potencial zeta) que teve valor praticamente neutro ($-1,32 \pm 0,01$ mV).

A escolha pela elaboração de lipossomas neutros é baseada nos estudos de Jain et al. (2010) sobre a influência da carga de superfície na penetração folicular. Os autores verificaram que os lipossomas neutros apresentaram maior habilidade de retenção nas unidades pilosebáceas que as vesículas com carga de superfície positiva e negativa. Isto se deve ao comportamento intrínseco de interação lipossoma-pele (JUNGIGER; HOFLAND; BOUWSTRA, 1991; JAIN et al., 2010). Este comportamento consiste no fato do lipossoma se misturar com os lipídios intercelulares, intumescendo-os e promovendo um espaço intracutâneo de depósito de fármaco.

No teste de estabilidade em longo prazo (Tabela 9), os LMNX4 foram armazenados a temperatura de 4°C por um período de 60 dias. As amostras apresentaram valores constantes de tamanho de partícula, PDI e pH até o período de 30 dias. Após este período, o tamanho de partícula e o PDI começaram a aumentar durante o armazenamento, comportamento que pode ser atribuído à fusão dos lipossomas. Estes resultados estão em consonância com os relatos de Jain et al. (2010) para as amostras armazenadas à temperatura de 4°C. Estes autores observaram que as vesículas armazenadas a esta temperatura foram mais estáveis que as armazenadas a 37°C, pois estas últimas apresentaram aumento de tamanho, o que os levou a concluir que a fusogenicidade é um fenômeno dependente de temperatura.

Segundo Du Plessis et al. (1996) este fenômeno se deve ao fato de que quanto maior a carga das partículas, maior a repulsão entre estas e maior a sua estabilidade; logo, o movimento browniano de partículas com carga próxima de zero, faz com que estas se choquem e fiquem aglomeradas, diminuindo assim, sua estabilidade. Assim, a presença de lipídios com cargas na composição dos lipossomas pode contribuir para o aumento de sua estabilidade por redução na agregação das vesículas.

6. Resultados e Discussão

Tabela 9 - Características da dispersão lipossomal LMNX4 após o teste de estabilidade em longo prazo.

Tempo (dias)	Aspecto macroscópico	pH	TP (nm)	PDI
0	Sem precipitação	6,8	588,3 ± 1,1	0,283 ± 0,006
7	Sem precipitação	6,8	575,5 ± 3,3	0,266 ± 0,010
15	Sem precipitação	6,8	598,7 ± 10,9	0,281 ± 0,002
30	Sem precipitação	6,7	607,4 ± 3,9	0,281 ± 0,007
60	Presença de precipitação	6,4	756,6 ± 1,4	0,399 ± 0,050

6.4 Características físico-químicas de LMNX/HPMC

As características físico-químicas da formulação LMNX/HPMC (teor de fármaco e pH) encontram-se na Tabela 10.

Tabela 10 - Parâmetros físico-químicos de formulações lipossomais contendo minoxidil (LMNX/HPMC)

Formulações Lipossomais	Teor de MNX (%)	pH	Aspecto
LMNX/HPMC (1,5%)	99,77 ± 0,62	6,4	Branco leitoso
LMNX/HPMC (2%)	99,27 ± 0,67	6,5	Branco leitoso
LMNX/HPMC (2,5%)	98,98 ± 0,96	6,5	Branco leitoso

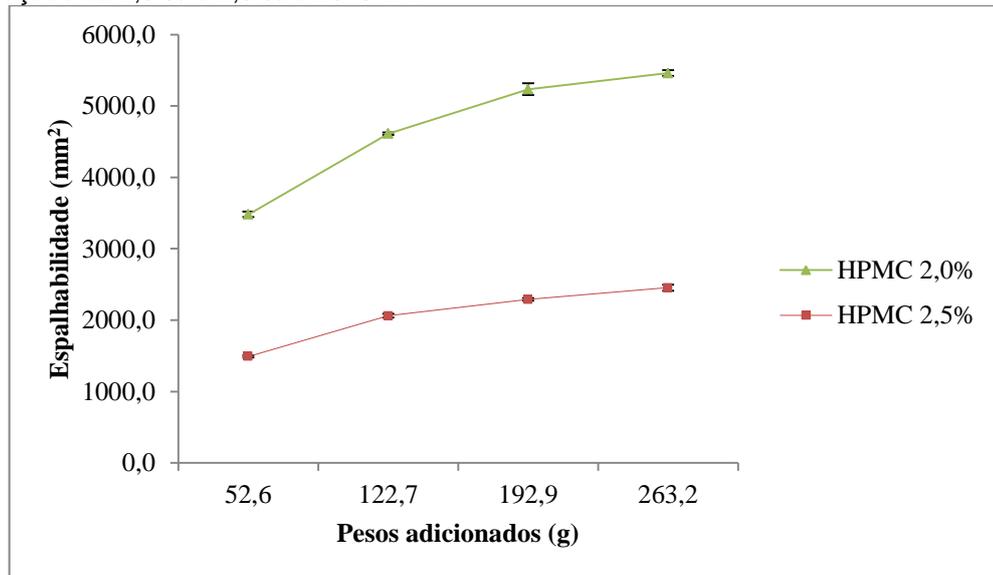
6.4.1 Determinação da espalhabilidade

Definida como a expansão de uma formulação semi-sólida sobre uma superfície após determinado período de tempo (FELTKAMP; FUCKS; SUCKER, 1983; KNORST, 1991) a espalhabilidade é uma das características de formas farmacêuticas destinadas à aplicação tópica.

Os resultados (Figura 17) se resumem às formulações contendo HPMC nas concentrações de 2% e 2,5%, pois na concentração de 1,5%, o hidrogel rapidamente extrapolou os limites de determinação da placa suporte, devido à sua grande fluidez, sendo portanto, descartada a amostra.

6. Resultados e Discussão

Figura 17 – Espalhabilidade das formulações contendo LMNX incorporado em gel de HPMC nas concentrações de 2,0 % e 2,5 % a $25^{\circ}\text{C} \pm 1$.

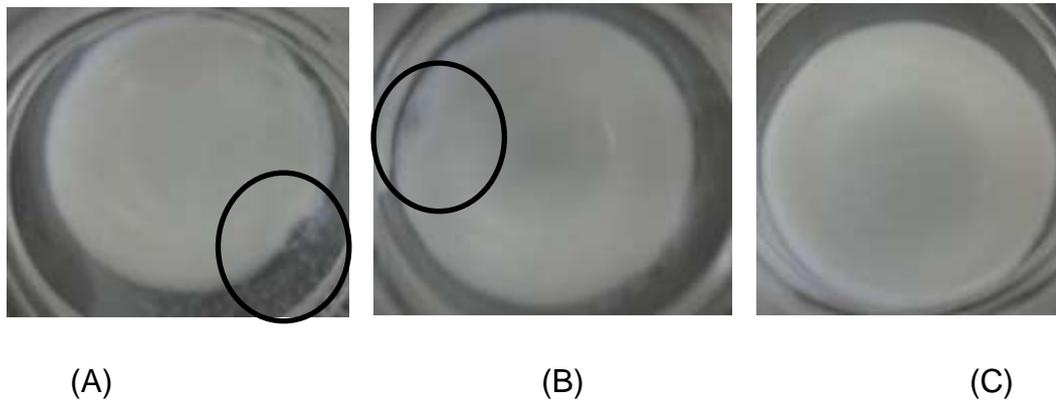


O aspecto macroscópico das formulações armazenadas a 4°C foi analisado durante 15 dias após a incorporação, para se observar a presença de separação de fases.

A incorporação de LMNX em hidrogel de HPMC (Figura 18) nas duas concentrações menores (1,5 e 2,0%) apresentou separação de fases. No hidrogel a 2,5% foi mantido o aspecto homogêneo inicial, sendo esta a concentração de HPMC escolhida para o prosseguimento do estudo apesar do menor valor de espalhabilidade.

6. Resultados e Discussão

Figura 18 - Aspecto macroscópico das formulações com hidrogel de HPMC a 1,5 – 2,0 e 2,5% (A, B e C) respectivamente.



6.5 Estudo de interação fármaco-lipossoma e nanossistema-polímero

6.5.1 Difração de Raios – X

Para verificar a existência de interações do MNX com o lipossoma e deste com o polímero, utilizou-se da difração de Raios-X. Esta ferramenta permite também analisar se a formulação se apresenta cristalina ou amorfa, dado que, segundo Essa, Rabanel e Hildgen (2010), é de grande importância no controle da liberação de fármacos, pois quanto maior o empacotamento cristalino de um polímero, menor a mobilidade das cadeias poliméricas e, portanto menor sua difusividade (LEITE, 2004).

O difratograma do MNX (Figura 19) apresenta picos de cristalinidade em 2θ de aproximadamente 12, 18, 20, 22 e 25°. Estes dados são condizentes com os dados da literatura (CALDERINI, 2006; SCHULTHEISS et al., 2009).

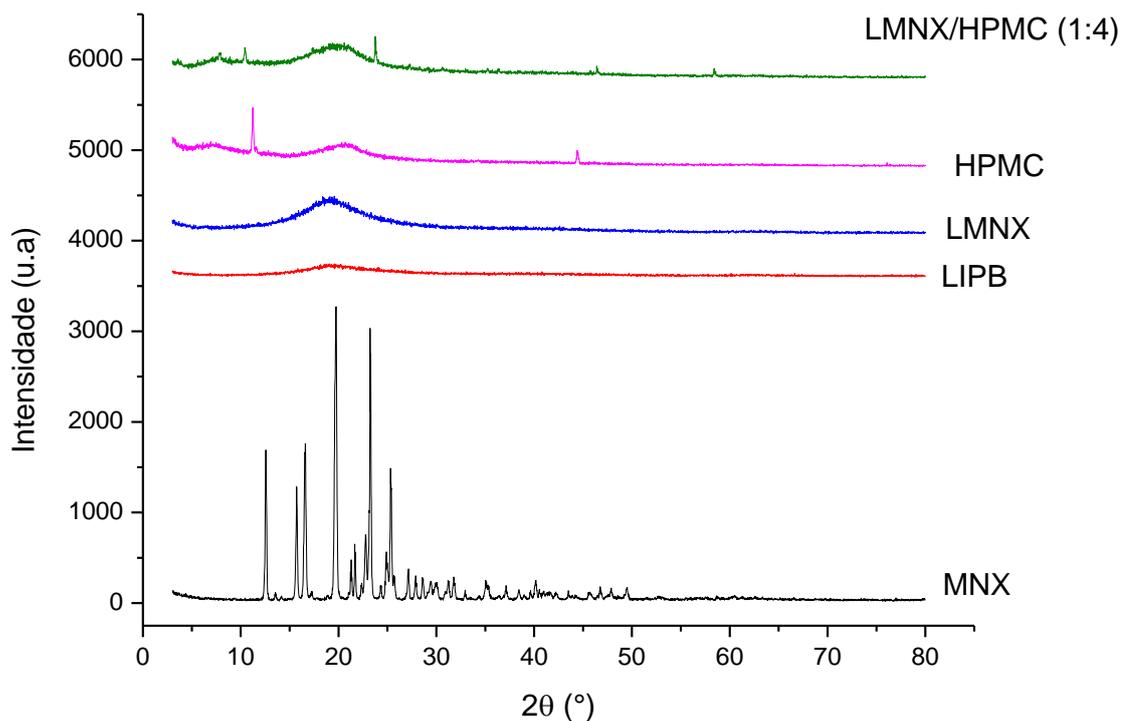
Observa-se no difratograma de LMNX que, sobre este, há predomínio da característica amorfa dos lipossomas sem o fármaco (LIPB) sobre os domínios cristalinos do MNX, bem como da natureza amorfa da HPMC sobre a mistura LMNX/HPMC (1:4) o que é sugestivo de alto grau de encapsulação do MNX e de interação do nanossistema com o polímero.

Em seus estudos sobre aumento da estabilidade de lipossomas por adsorção

6. Resultados e Discussão

de polímeros à superfície destes nanocarreadores, Rubalcava et al., (2000) observaram que o colesterol nos lipossomas contendo fosfatidilcolina, tornam a superfície das vesículas mais hidrofóbicas e, portanto, mais resistentes à adsorção da HPMC, fazendo-se necessário o aumento da concentração do polímero para que se verifique a adsorção. Isto parece explicar o fenômeno de separação de fases ocorrido durante a incorporação dos LMNX em hidrogel de HPMC elaborado nas concentrações de 1,5 e 2,0%. Quando se aumentou a concentração do polímero para 2,5%, a formulação apresentou-se homogênea.

Figura 19 - Difratogramas de formulações contendo minoxidil (MNX) e seus constituintes: lipossomas sem fármaco (LIPB), lipossomas com fármaco (LMNX), hidroxipropilmetilcelulose (HPMC) e lipossomas incorporados em gel (LMNX/HPMC).



6.5.2 Espectroscopia no infravermelho (FT-IR)

A espectroscopia no infravermelho é uma técnica qualitativa utilizada na verificação da existência de interações entre diferentes moléculas no estado sólido. Radiações na região do infravermelho não possuem energia suficiente para causar transições eletrônicas; por isso, os espectros de espécies moleculares obtidos nesta região são oriundos da absorção de energia ocorrida na transição de um estado rotacional ou vibracional para outro (SKOOG; HOOLER; NIEMAN, 2002; CALDERINI, 2006).

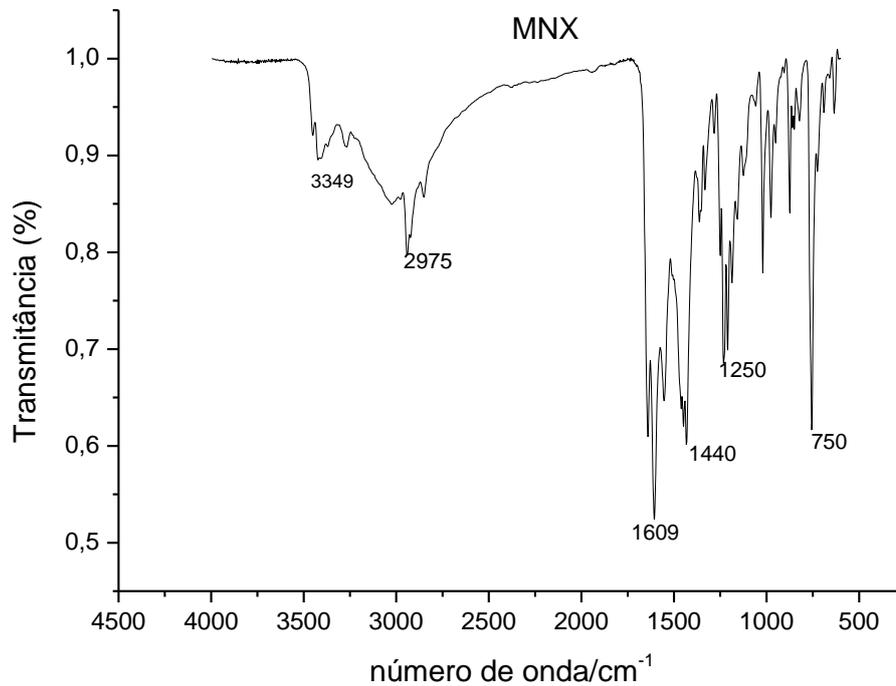
Formação de compostos de inclusão ou outras associações movidas por forças de Van der Waals ou interações hidrofóbicas não caracterizam verdadeiras ligações químicas entre moléculas, portanto, não são capazes de gerar alterações significativas nos espectros de infravermelho (SZEIJTLI, 1988; CALDERINI, 2006).

Logo, se a interação sugerida pelos difratogramas de LMNX/HPMC for por interação hidrofóbica, é de se esperar que não haja modificações importantes nos espectros de infravermelho dessas amostras. Desse modo, as amostras foram submetidas à análise por espectroscopia no infravermelho para verificação de interação molecular do MNX com o lipossoma e de LMNX com o hidrogel de HPMC.

O espectro do minoxidil na região do infravermelho (Figura 20) é condizente com as informações encontradas na literatura (GORECKI, 1988) confirmando a identidade química da amostra. Neste, são vistos: em 3349 cm^{-1} (estiramento N-H), 2975 cm^{-1} (estiramento C-H aromático e alifático), 1609 cm^{-1} (estiramento aromático C=N), 1440 cm^{-1} (estiramento angular N-H), 1250 cm^{-1} (estiramento N-O e C-N aromático) e 750 cm^{-1} (estiramento CH_2).

6. Resultados e Discussão

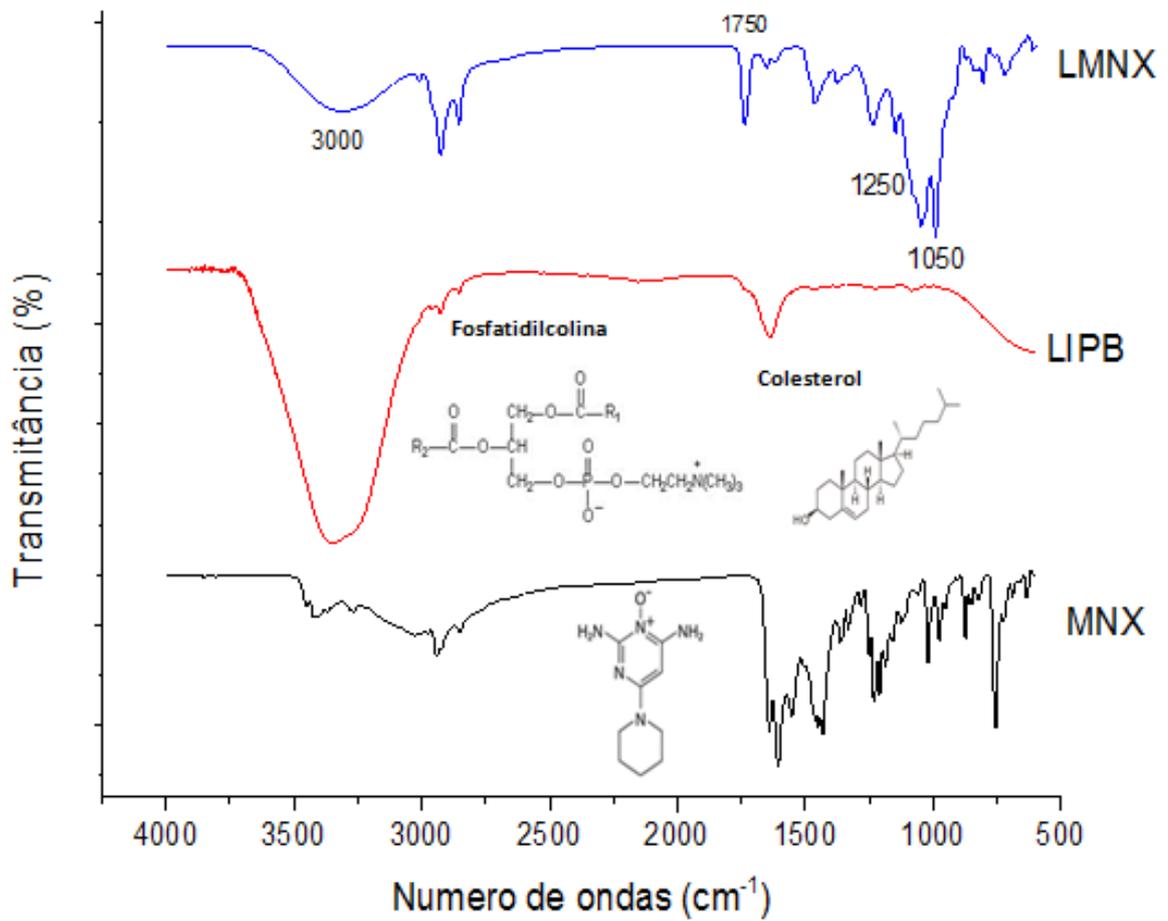
Figura 20 - Espectro de absorção no infravermelho do minoxidil (MNX) Será que não dá para por na pág.anterior



No espectro de LMNX (Figura 21) verificam-se deformações axiais CH₂ em 3000 -2850 cm⁻¹, em 1750-1735 de C=O de ésteres e em P-O-C de alifáticos, há estiramento forte em dublete entre 1050 - 970 cm⁻¹. A banda em 1250 cm⁻¹ referente ao N-O do MNX encontra-se reduzida na forma lipossomada. Por fim, LMNX apresenta redução na intensidade das bandas na região da impressão digital (1600-500) indicando interação entre o fármaco e o lipossoma.

6. Resultados e Discussão

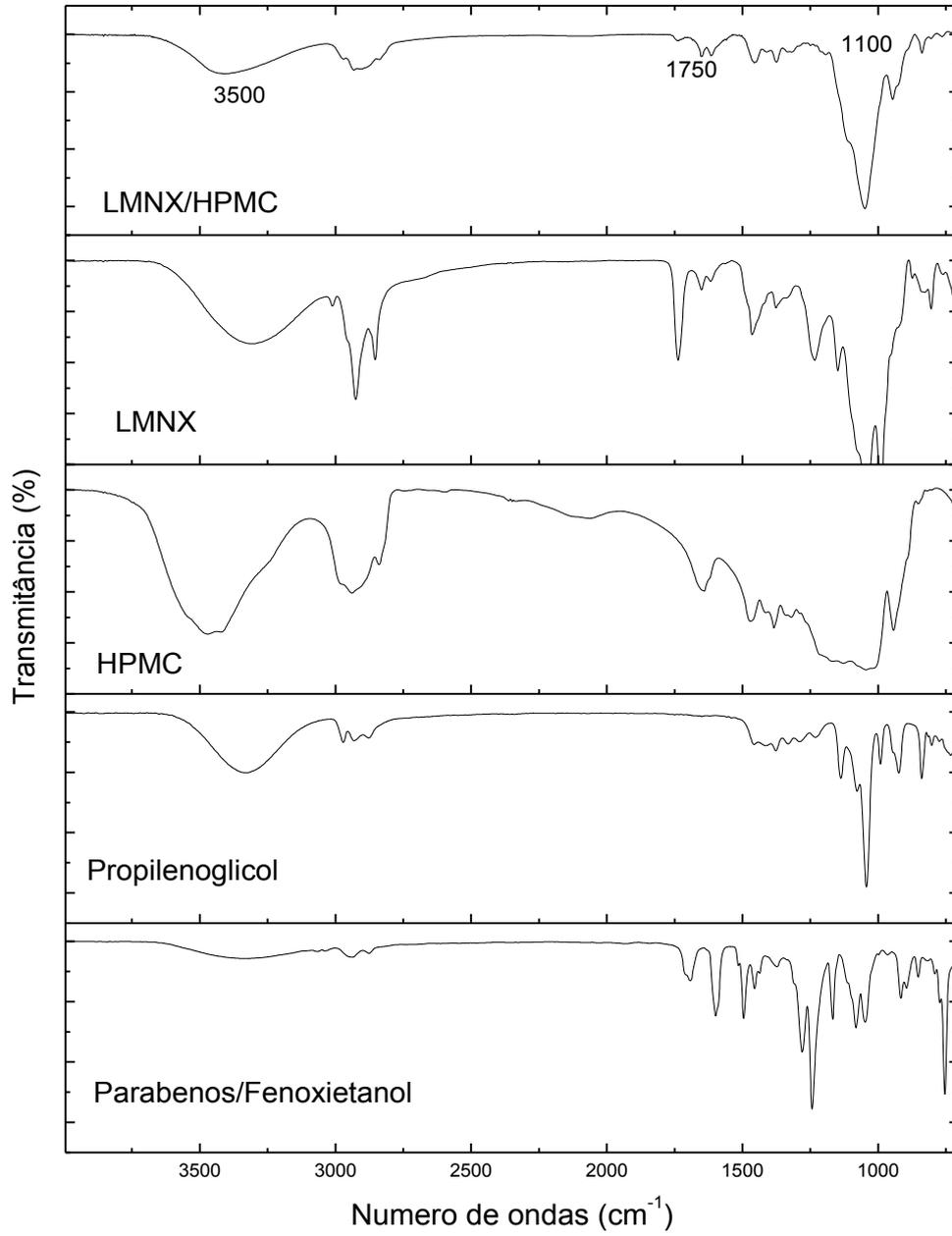
Figura 21 - Espectros de Infravermelho de minoxidil (MNX), lipossomas sem fármaco (LIPB) e lipossomas contendo o fármaco (LMNX).



Na figura 22, verifica-se no espectro de LMNX/HPMC, deformação OH em 3500 cm⁻¹; estiramento C-O de éter de celulose em 1100 cm⁻¹, e redução da deformação axial em 1750-1735 de C=O de ésteres do LMNX.

6. Resultados e Discussão

Figura 22 - Espectros de Infravermelho de parabenos/fenoxietanol, propilenoglicol, HPMC, lipossomas contendo MNX (LMNX) e de LMNX em HPMC.



6.5.3 - Calorimetria Diferencial Exploratória (DSC)

A Calorimetria Diferencial Exploratória (DSC) é uma técnica de análise térmica que se baseia na medida da diferença de energia fornecida a uma amostra e a um material referência, em função da temperatura, quando ambos são submetidos a uma programação controlada de temperatura (BROWN, 1988).

Os eventos térmicos que ocorrem com absorção de calor são ditos endotérmicos (sublimação, fusão, ebulição, vaporização, dessolvatação e transição sólido-sólido) e os que liberam calor, os exotérmicos, são característicos de fenômenos de cristalização e degradação química.

Quando há interação entre os compostos analisados, as curvas calorimétricas apresentam aparecimento ou desaparecimento de um ou mais picos (WADKE; SERAJUDDIN; JACOBSON, 1990)

Na Figura 23 se encontram as curvas calorimétricas de todos os materiais analisados neste estudo. Na curva calorimétrica do MNX o pico que se observa em 262°C é referente ao seu ponto de fusão. Sabe-se que quanto maior a concentração de impurezas na amostra, menor é o ponto de fusão e mais larga é a faixa de fusão em que este se apresenta (OLIVEIRA; YOSHIDA; GOMES, 2011), portanto, a análise visual da curva DSC do MNX, demonstra a pureza da amostra pela estreita faixa de fusão. Há na literatura, diversos registros de temperaturas correspondentes ao ponto de fusão de MNX, como: 225°C (MOFFAT, 1986), 248°C (THE MERCK INDEX, 1983) e 262 a 264°C (NETH, 1968).

O pico de fusão atribuído ao MNX é de 262°C e se encontra relatado na literatura como de decomposição do fármaco (NETH, 1968).

Analisando a curva calorimétrica de LIPB, vê-se que esta se apresenta com uma forma mais alargada, menos definida e uma inflexão da curva a aproximadamente 115°C, provavelmente por perda gradual de umidade.

Observando-se a curva calorimétrica de LMNX vê-se que a temperatura característica de fusão (235°C) de LIPB foi deslocada para uma maior temperatura (255°C) após sua associação com o fármaco. Este evento é indicativo de interação química MNX-LIPB já confirmado pelo espectro de infravermelho. Ainda, a

6. Resultados e Discussão

temperatura de transição de fase correspondente à fusão do MNX (262°C) é deslocada para um menor valor de temperatura (258°C) em LMNX.

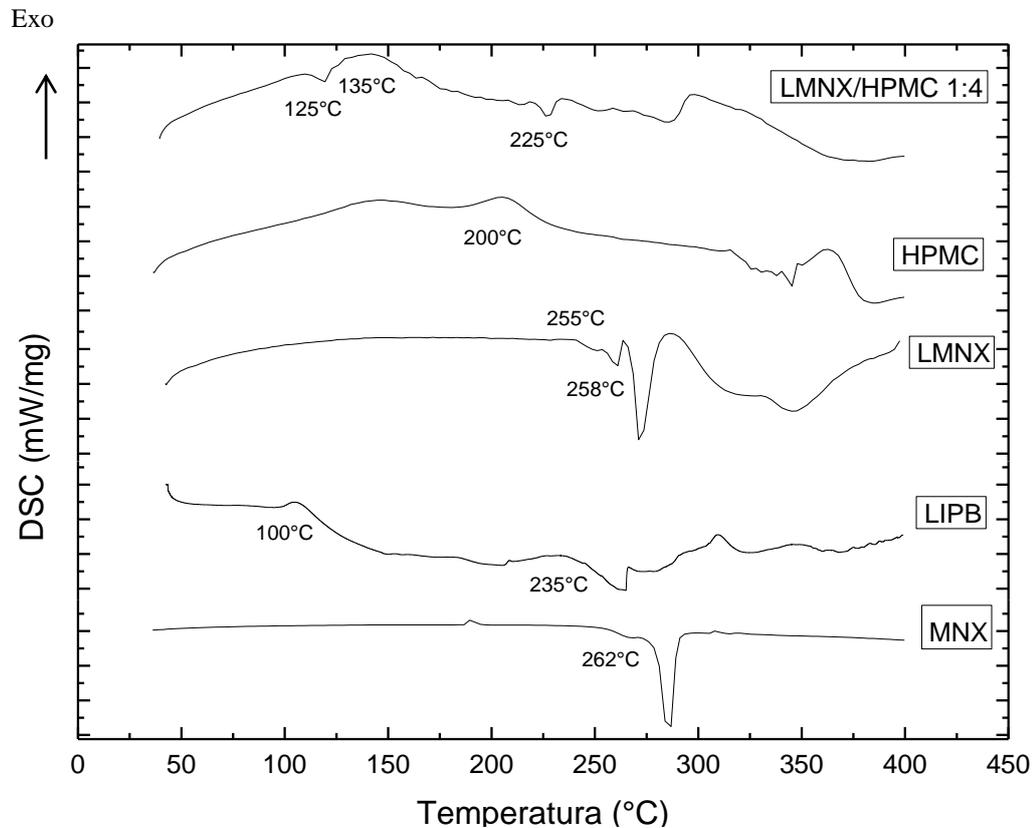
Em relação à possível interação lipossoma-hidrogel, esta é comprovada quando se analisa a curva de LMNX/HPMC. Na curva de LIPB, os lipossomas apresentam duas temperaturas de transição de fases, 115° e 235°C, estas foram deslocadas para valores inferiores (125 e 225°C) respectivamente, em LMNX/HPMC.

Por fim, a transição de fase da HPMC que ocorreu em 200°C, foi deslocada para uma temperatura inferior de 135°C em LMNX/HPMC.

Conclui-se, portanto, que as alterações verificadas nas curvas de DSC das amostras analisadas corroboram os resultados obtidos por espectroscopia de infravermelho, sugestivos de interações MNX-lipossoma (LMNX) e lipossoma-hidrogel (LMNX/HPMC).

6. Resultados e Discussão

Figura 23 - Curvas de Calorimetria Diferencial Exploratória de MNX, LIPB, LMNX, HPMC e LMNX/HPMC 1:4.



Rubalcava et al., (2000), estudaram os mecanismos de adsorção da HPMC a lipossomas (750 nm) com e sem colesterol em sua composição. Soluções contendo concentrações variadas do polímero (0,4 – 1,8 mg/mL) foram associadas aos lipossomas com concentração de lipídios de 0,2 mg/mL, através de agitação mecânica durante 24 horas e centrifugação a 100.000 g por 2 horas. Os autores concluíram que, nos estudos viscométricos, as propriedades moleculares do polímero em suas diversas concentrações, não foram afetadas pela presença de água ou tampão fosfato.

As isotermas de adsorção mostraram que a quantidade de polímero adsorvido depende da composição lipídica dos lipossomas. No caso de lipossomas sem colesterol, a interação hidrofóbica se dá por inserção do segmento hidrofóbico do polímero na bicamada lipídica e isso acontece devido ao estado fluido da membrana lipídica. Ainda, na presença do colesterol na composição das vesículas e baixas

6. Resultados e Discussão

concentrações do polímero, a interação se dá por inserção de segmentos deste na bicamada lipídica e, no caso de maiores concentrações do polímero, a interação se dá na superfície dos lipossomas. Por fim, os autores ressaltam que quantidades de HPMC não modificam significativamente a hidrofobicidade dos lipossomas.

Na composição de LMNX, a concentração total de lipídios foi de 234 mM (0,17 mg/mL), semelhante a dos lipossomas do estudo de Rubalcava et al., (2000) que foi de 0,2 mg/mL. Os autores utilizaram em seu estudo, três formulações lipossomais contendo apenas fosfatidilcolina de ovo em uma formulação e, nas outras duas, associada ao colesterol nas diferentes razões molares (1:0,5 e 1:1) respectivamente.

Diferentemente, em LMNX, a razão molar entre fosfatidilcolina (0,936 mM) e colesterol (0,234 mM) é menor (8:2), o que proporciona menor rigidez à vesícula e, portanto maior facilidade de sua interação com o polímero, por inserção deste à bicamada lipídica.

No entanto, o fato de a concentração da HPMC (25 mg/mL) ser muito superior à do estudo, baseando-se nos resultados de espectroscopia de infravermelho e DSC e nas conclusões dos autores, pode-se supor que a interação da HPMC/LMNX seja de natureza hidrofóbica e se dê na superfície de LMNX.

6.6 Estudo *in vitro*

6.6.1 Estudo *in vitro* do perfil de liberação

Veículos adequados à incorporação de lipossomas são livres de tensoativos e de altas concentrações de etanol, pois estas substâncias podem solubilizar o nanossistema (LAUTENSCHLAGER, 1990; CHORILLI, et al., 2004). Portanto, géis têm se mostrado como veículos mais adequados, podendo manter a estabilidade de lipossomas a eles incorporados, por um período de até dois anos (MAGDASSI, 1997).

As formulações LMNX e LMNX/HPMC foram avaliadas no estudo de liberação *in vitro* e os resultados se encontram descritos na Tabela 11 e na Figura 24.

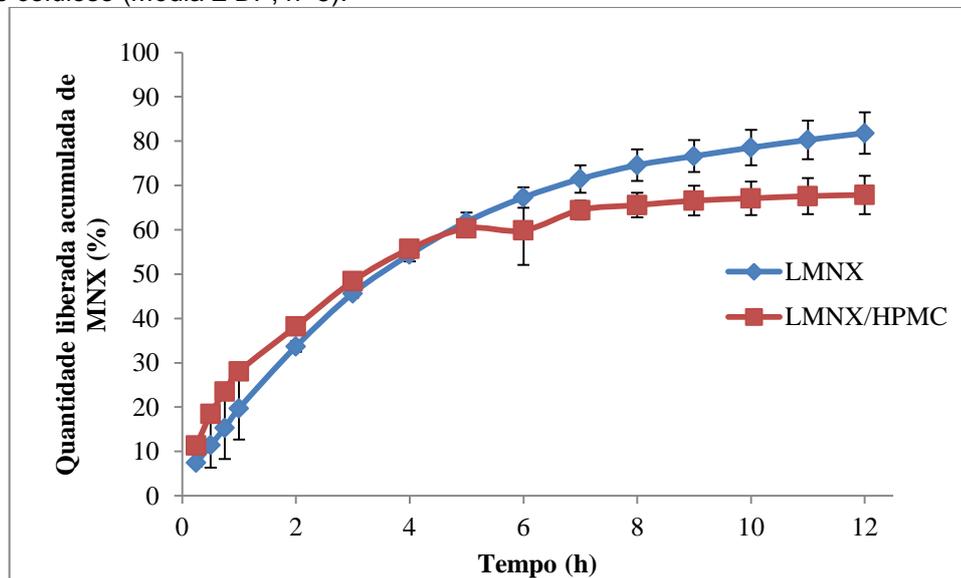
6. Resultados e Discussão

Tabela 11 - Quantidade liberada acumulada de MNX a partir de diferentes formulações ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$).

Tempo (h)	LMNX (DP*)	LMNX/HPMC (DP*)
0,15	80,57 \pm (8,81)	29,50 \pm (1,27)
0,30	122,76 \pm (54,65)	50,65 \pm (0,84)
0,45	164,83 \pm (76,02)	63,76 \pm (0,38)
1	211,96 \pm (75,86)	74,62 \pm (0,46)
2	362,17 \pm (13,13)	104,80 \pm (0,57)
3	490,94 \pm (10,90)	131,68 \pm (0,39)
4	585,13 \pm (16,58)	149,75 \pm (1,08)
5	664,65 \pm (22,35)	162,03 \pm (0,81)
6	723,56 \pm (24,68)	170,19 \pm (1,61)
7	768,33 \pm (33,15)	175,76 \pm (1,53)
8	801,95 \pm (38,48)	179,43 \pm (2,25)
9	823,81 \pm (38,70)	182,84 \pm (2,82)
10	844,36 \pm (43,00)	184,81 \pm (2,77)
11	863,09 \pm (46,63)	186,43 \pm (3,34)
12	879,63 \pm (50,22)	187,47 \pm (3,53) ^b

*DP: desvio padrão. Os valores entre parênteses indicam o desvio padrão da média de no mínimo 4 determinações.

Figura 24 -. Perfil de liberação *in vitro* do MNX de formulações lipossomais através de membrana de acetato de celulose (Média \pm DP, n=5).



Uma relação linear foi obtida para cada formulação em estudo quando a quantidade de MNX liberada foi relacionada com a raiz quadrada do tempo. O

6. Resultados e Discussão

coeficiente de difusão (D) (Tabela 12) foi então calculado pela Equação VI (item 4.6.2).

Tabela 12 - Coeficiente de difusão calculado para a liberação de MNX a partir de lipossomas em função do tempo.

Formulação	*Dx10 ⁻⁶ (cm ² /s)	** r ²
LMNX	4,82 (± 0,33) ^a	0,992
LMNX/HPMC	4,59 (± 0,45) ^a	0,996

*D = coeficiente de difusão calculado a partir da equação $Q = 2C_0\sqrt{Dt/\pi}$; ** r = coeficiente de determinação do gráfico que definiu a melhor cinética de liberação do ativo ($\mu\text{g}/\text{cm}^2/\sqrt{t}$).

DP: Desvio padrão. Valores entre parênteses indicam o desvio padrão da média de no mínimo 4 determinações. Médias seguidas de mesma letra na coluna não diferem entre si pelo Teste t de Student a 5% de probabilidade de erro.

As formulações avaliadas neste estudo, nanossistema contendo MNX na concentração de 4,0 mg/mL (LMNX) e contendo MNX (1,0 mg/mL) veiculados em hidrogel de HPMC (LMNX/HPMC) correspondem a lipossomas neutros, de diâmetro médio (~600 nm) cuja eficiência de encapsulação é de $50,30 \pm 0,10\%$; logo, metade do fármaco ofertado ao sistema encontra-se livre, sendo esperado assim, que a liberação deste fármaco contido nos lipossomas apresente perfil bifásico: um efeito *burst* devido ao MNX livre no meio aquoso do hidrogel e, uma liberação sustentada proporcionada pelo fármaco encapsulado em lipossoma, a exemplo do estudo de Nounou et al., (2005).

Neste estudo, a 5-fluoruracil foi encapsulada em lipossomas, preparados com fosfatidilcolina:colesterol:dicetilfosfato com razão molar (10:4:1) e incorporados em gel de HPMC a 2%. O perfil de liberação dos lipossomas sem o gel após 12 horas de estudo, apresentou efeitos *burst* (~ 2 horas) seguido de liberação lenta de aproximadamente 53,43% e 75% respectivamente. Quando veiculados em gel de HPMC a 2%, a mesma dispersão lipossomal apresentou o mesmo período de efeito *burst* seguido de liberação lenta, mas com percentuais de liberação reduzidos (~ 32,05% e 70%) respectivamente. Os autores atribuem a diminuição nos percentuais de liberação ao fato de, por ser uma estrutura aparentemente organizada, o gel reduz ou previne a fuga do fármaco do interior dos lipossomas.

6. Resultados e Discussão

Os perfis de liberação apresentados pelas duas formulações, LMNX e LMNX/HPMC, avaliadas por um período de 12 horas, demonstraram que o percentual de liberação de LMNX/HPMC ($67,87 \pm 4,33\%$) foi menor que o de LMNX ($81,81 \pm 4,67\%$), no entanto, o coeficiente de difusão do MNX nas duas formulações foi semelhante. Desse modo, a diferença entre os percentuais de liberação deve-se às diferentes concentrações de MNX em cada formulação e não à influência do veículo.

Sabe-se que um aumento na concentração do polímero leva à diminuição da velocidade de liberação de um fármaco encapsulado em lipossoma veiculado em hidrogel (DRAGICEVIC-CURIC et al., 2009; HURLER et al., 2013). Portanto, é esperado que lipossomas veiculados em hidrogel, apresentem um percentual de liberação significativamente menor que a dispersão lipossomal livre do veículo polimérico, pois, segundo Hurler et al., (2013), o fármaco precisa primeiramente ser liberado no hidrogel, difundir-se através deste, para então, ser liberado do veículo polimérico.

Sabe-se também que a cinética de liberação de fármacos anfifílicos e lipofílicos é determinada pela solubilidade do fármaco em água e sua lipofilicidade, pois estes fatores irão definir o coeficiente de partição do fármaco no meio aquoso do hidrogel (MOURTAS et al., 2007; HURLER et al., 2013).

O MNX possui coeficiente de partição octanol-água de 1,24 e uma solubilidade em meio aquoso de 2,2 mg/mL (GORECKI, 1988; THE MERCK INDEX, 1988), sendo portanto, mais lipofílico que hidrofílico.

No entanto, a difusão está relacionada ao transporte do fármaco na formulação de forma gradiente de concentração-dependente. Este gradiente de concentração varia na medida em que o fármaco vai sendo liberado. O modelo cinético de Higuchi se aplica quando a liberação do fármaco se mostra dependente da raiz quadrada do tempo. Esta cinética foi observada para a liberação do MNX a partir das formulações LMNX e LMNX/HPMC que apresentaram valores de coeficiente de difusão semelhantes ($4,82 \pm 0,33$ e $4,59 \pm 0,45$) respectivamente.

Portanto, a interação hidrofóbica entre LMNX e o gel de HPMC verificada por espectroscopia no infravermelho, foi menos relevante que o gradiente de concentração, na liberação de MNX contido na formulação.

6. Resultados e Discussão

6.6.2 Permeação e retenção cutânea *in vitro*

6.6.2.1 Estudo de recuperação do minoxidil extraído das amostras de pele

Os estudos de recuperação do MNX a partir da pele (EC e folículos) foram realizados com o intuito de padronizar uma metodologia adequada para a extração do fármaco a partir das camadas da pele.

A Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA – RE nº 899/2003) define que a recuperação é representada pela eficiência de extração de um método analítico, expressa como porcentagem da quantidade conhecida de um analito, obtida da comparação dos resultados analíticos de amostras ditas “branco”, adicionadas de padrão e submetidas ao processo de extração, com os resultados analíticos de soluções não extraídas.

A extração do MNX foi avaliada a partir de três (3) concentrações (0,5; 1,0 e 4,0 $\mu\text{g.mL}^{-1}$), de acordo com a linearidade do método, conforme apresentado na Tabela 13.

Tabela 13 - Recuperação (%) do MNX extraído da pele após técnica de tape stripping, empregando metanol/água/ácido acético para extração.

Teórica	Concentrações de MNX ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)			Dados estatísticos			
	Experimental			Média	D.P.*	DPR (%)*	R (%)*
0,5	0,52	0,52	0,48	0,51	0,02	3,97	101,4
1,0	1,09	1,01	0,98	1,02	0,05	4,90	102,65
4,0	3,76	3,66	3,59	3,67	0,08	2,32	91,84

* D.P.=desvio padrão; DPR=desvio padrão relativo; R = recuperação.

Recomenda-se que a recuperação não exceda 15%. Portanto, os dados de recuperação contidos na Tabela 8 estão de acordo com os limites estabelecidos (CAUSON, 1997; LIRA, 2007).

6. Resultados e Discussão

6.6.2.2 Estudo de recuperação do minoxidil extraído das amostras de conteúdo folicular

A extração do MNX foi avaliada a partir de três (3) concentrações (1,0, 4,0 e 8,0 $\mu\text{g.mL}^{-1}$), de acordo com a linearidade do método, conforme apresentado na Tabela 14.

Tabela 14 - Recuperação do MNX em folículos após técnica de *stripping diferencial*, empregando metanol/água/ácido acético para extração.

Concentrações de MNX ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)				Dados estatísticos			
Teórica	Experimental			Média	D.P.	DPR (%)	R (%)
1,0	0,94	1,05	1,05	1,01	0,07	6,61	101,30
4,0	3,74	3,69	3,71	3,71	0,03	7,70	93,11
8,0	8,34	7,77	8,02	8,04	0,29	3,58	100,51

* D.P.=desvio padrão; DPR=desvio padrão relativo; R = recuperação.

Os dados de recuperação do MNX contidos na Tabela 12 estão de acordo com os limites estabelecidos.

O emprego da fase móvel, constituída de metanol, água e ácido acético (70:30:10) como sistema extrator mostrou-se eficiente na recuperação do MNX da pele e do conteúdo folicular, e os resultados mostraram-se dentro dos limites de quantificação estabelecidos comprovando a ausência de interferentes relacionados à pele suína, fitas adesivas ou cola de cianoacrilato.

6.6.2.3 Determinação da penetração cutânea *in vitro*

Neste experimento foi selecionada como membrana, a pele de orelha de porco, devido à sua semelhança com pele humana (DICK; SCOTT, 1992; JACOBI et al., 2007).

Ao final do estudo foi detectado MNX oriundo apenas da formulação MNX solução no compartimento receptor (Tabela 15), o mesmo não ocorrendo a partir das formulações LMNX e LMNX/HPMC, levando-se em conta o limite de detecção do método do sistema HPLC (0,241 $\mu\text{g.mL}^{-1}$). Diversos autores (RUMSFIELD; WEST;

6. Resultados e Discussão

FIEDLER-WEISS, 1987; SENTJURC; VRHOVNIK; KRISTL, 1999; MURA et al., 2007; JAIN et al., 2010), associam as reações adversas do MNX em solução à sua capacidade de atravessar a pele em quantidades apreciáveis; portanto, a ausência de fármaco no meio receptor oriundo das formulações contendo nanocarreadores representa uma grande vantagem das formulações LMNX e LMNX/HPMC comparadas à MNX solução e atende aos objetivos deste estudo de desenvolver formulações com veículos que diminuam os efeitos sistêmicos relatados.

Tabela 15 - Quantidade de minoxidil permeado após 12 h.

MNX	Formulações		
	LMNX/HPMC	LMNX	MNX solução
Fase receptora ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$)	(*)	(*)	2,50 \pm 0,70

* Abaixo do limite de quantificação do método.

6.6.2.4 Estudo *in vitro* do perfil de retenção no EC e folículos a partir da formulação LMNX/HPMC

Os resultados do estudo do perfil de retenção no EC e nos folículos a partir da formulação LMNX/HPMC se encontram na Tabela 16.

Tabela 16 - Perfil de retenção do MNX no EC e folículos a partir da formulação LMNX/HPMC (Quantidade total de MNX no compartimento doador = 500 μg).

Tempo (h)	Retenção de MNX no EC	Retenção de MNX nos folículos
	($\mu\text{g}/\text{cm}^2$)	($\mu\text{g}/\text{cm}^2$)
2	2,58 (\pm 0,70)	1,83 \pm (0,52)
4	2,73 (\pm 0,27)	1,88 \pm (0,10)
6	3,27 (\pm 0,89)	1,82 \pm (0,55)
12	4,08 \pm (0,70)	2,56 \pm (0,64)**

(*) Dados são média (\pm DP); n \geq 3. (**) p < 0,05.

Os resultados da Tabela 16 mostram que não houve diferença significativa entre os valores das concentrações de MNX a partir de LMNX/HPMC retidas no EC longo do tempo.

6. Resultados e Discussão

Na análise das concentrações de MNX retidas nos folículos, os valores nos tempos de 2, 4 e 6 horas são estatisticamente semelhantes. No entanto, para o tempo de 12 horas, a quantidade de MNX retida nos folículos é significativamente maior, demonstrando necessidade de um maior tempo de contato da formulação LMNX/HPMC com a pele para que haja aumento de depósito folicular.

Dessa forma, baseados nestes resultados do perfil de retenção, os ensaios *in vitro* de determinação da retenção do MNX no EC e nos folículos a partir das formulações LMNX, LMNX/HPMC e MNX solução foram realizados com duração de 12 horas.

6.6.2.5 Determinação da retenção de MNX no estrato córneo *in vitro*

A determinação de perfil de retenção no EC das formulações LMNX, LMNX/HPMC e da solução de MNX a 2% composta por propilenoglicol/água/etanol (20/30/50 v/v/v) foi realizada, por um período de 12 horas, em célula de difusão de Franz, utilizando como membrana pele de orelha de porco, em condições oclusivas.

Os valores de retenção de MNX no EC (Tabela 17) foram obtidos através da quantificação do fármaco extraído da pele pela técnica de *tape stripping* e são expressos em $\mu\text{g}/\text{cm}^2$.

Tabela 17 - Retenção do MNX em e solução e em formulações lipossomais no EC através de membrana de orelha de porco.

EC	Formulações		
	LMNX/HPMC	LMNX	MNX solução
($\mu\text{g}/\text{cm}^2$) ⁽¹⁾	4,08 ^b ± 0,70	8,65 ^b ± 2,15	19,05 ^a ± 1,58

⁽¹⁾ Média ± dp (n=3). Médias seguidas de mesma letra não coluna não diferem entre si pelo Teste de Kuskall-Wallis a 5% de probabilidade de erro.

A retenção do MNX no EC promovida pela solução foi 4,7 vezes maior ($19,05 \pm 1,58 \mu\text{g}/\text{cm}^2$) que a observada para e LMNX/HPMC ($4,08 \pm 0,7 \mu\text{g}/\text{cm}^2$), 2,2 vezes maior que LMNX ($8,65 \pm 2,15 \mu\text{g}/\text{cm}^2$). No entanto, os valores das retenções de LMNX e LMNX/HPMC no EC foram estatisticamente semelhantes ($p > 0,05$).

6. Resultados e Discussão

6.6.2.6 Determinação da retenção folicular *in vitro*

Muitos estudos *in vitro* e *in vivo* têm atestado a importância dos folículos que, por serem cercados por uma rede de capilares sanguíneos e células dendríticas (VOGHT et al., 2006; PATZELT et al., 2008), servem muito bem como alvo para a penetração de fármacos, além disso, sabe-se hoje que os reservatórios foliculares variam bastante de acordo com a região do corpo e se comparam ao reservatório do EC em algumas partes do corpo (OTBERG et al., 2004; PATZELT et al., 2008).

Os dados de retenção intrafolicular do MNX, a partir das 3 formulações, foram obtidos através da quantificação do MNX extraído, juntamente com o conteúdo folicular, pela técnica de *stripping diferencial* (WEIGMANN et al., 1999) e são apresentados na Tabela 18.

Tabela 18 - Retenção intrafolicular do MNX em solução e formulações lipossomais através de membrana de orelha de porco. Quantidades de MNX no compartimento doador (LMNX/HPMC = 500 µg; LMNX = 2000 µg; MNX solução = 1000 µg)

MNX	Formulações		
	LMNX/HPMC	LMNX	MNX solução
Folículos (µg/cm²)⁽¹⁾	2,42 ^b ± 0,77	14,60 ^a ± 4,47	4,40 ^b ± 2,81

⁽¹⁾ Média ± dp (n=3). Médias seguidas de mesma letra não coluna não diferem entre si pelo Teste de Tukey a 5% de probabilidade de erro.

A retenção intrafolicular de LMNX foi 6 vezes maior que a de LMNX/HPMC e 3,3 vezes maior que a de MNX solução, comprovando a habilidade dos carreadores lipossomais no transporte de fármacos para alvos foliculares (VOGT et al., 2005). Estes resultados se encontram em consonância com os dados de literatura, pois nos resultados de retenção intrafolicular de MNX contido em lipossomas do estudo de Jain et al., (2010), a quantidade de MNX retido nos folículos foi 3,6 vezes maior que a quantidade retida a partir da formulação não lipossomal.

Embora a quantidade de MNX retida a partir da formulação LMNX/HPMC tenha sido menor que a de LMNX, quando comparada à obtida a partir de MNX solução, mostrou-se estatisticamente semelhante. LMNX/HPMC possibilita uma

6. Resultados e Discussão

utilização tópica mais adequada por se manter em contato com a pele por um maior período de tempo que a dispersão lipossomal; além disso, a concentração de MNX na formulação LMNX/HPMC (1 mg/mL) é quatro vezes menor que na dispersão lipossomal LMNX (4 mg/mL) e vinte vezes menor que em MNX solução.

Patzelt et al., (2008) compararam os reservatórios foliculares *in vitro* da pele excisada e *in vivo*. Os autores concluíram que o reservatório folicular *in vitro* representa apenas 9,5 % do reservatório folicular *in vivo* e, através de análises histológicas, concluíram que os folículos capilares estão envolvidos por uma rede de fibras elásticas que, quando excisadas, contraem as aberturas dos folículos, possivelmente reduzindo os níveis de penetração folicular. Estas afirmações confirmam as observações de Starcher, Aycock e Hill (2005). Deste modo, os autores relatam que há diferenças significativas entre os resultados de ensaio de retenção intrafolicular *in vitro* e *in vivo*, o que diminui as chances de se extrapolar com maior acerto os resultados do ensaio *in vitro* para os obtidos no ensaio *in vivo*. Ainda, recomendam o desenvolvimento de métodos *in vivo* não invasivos para estudo de retenção folicular.

6.7 Ensaio *in vivo*

A alopecia androgênica (AGA) é uma doença que, embora atinja um grande percentual de indivíduos, principalmente do sexo masculino, é muitas vezes banalizada, a despeito do mal estar psicossocial que envolve os acometidos.

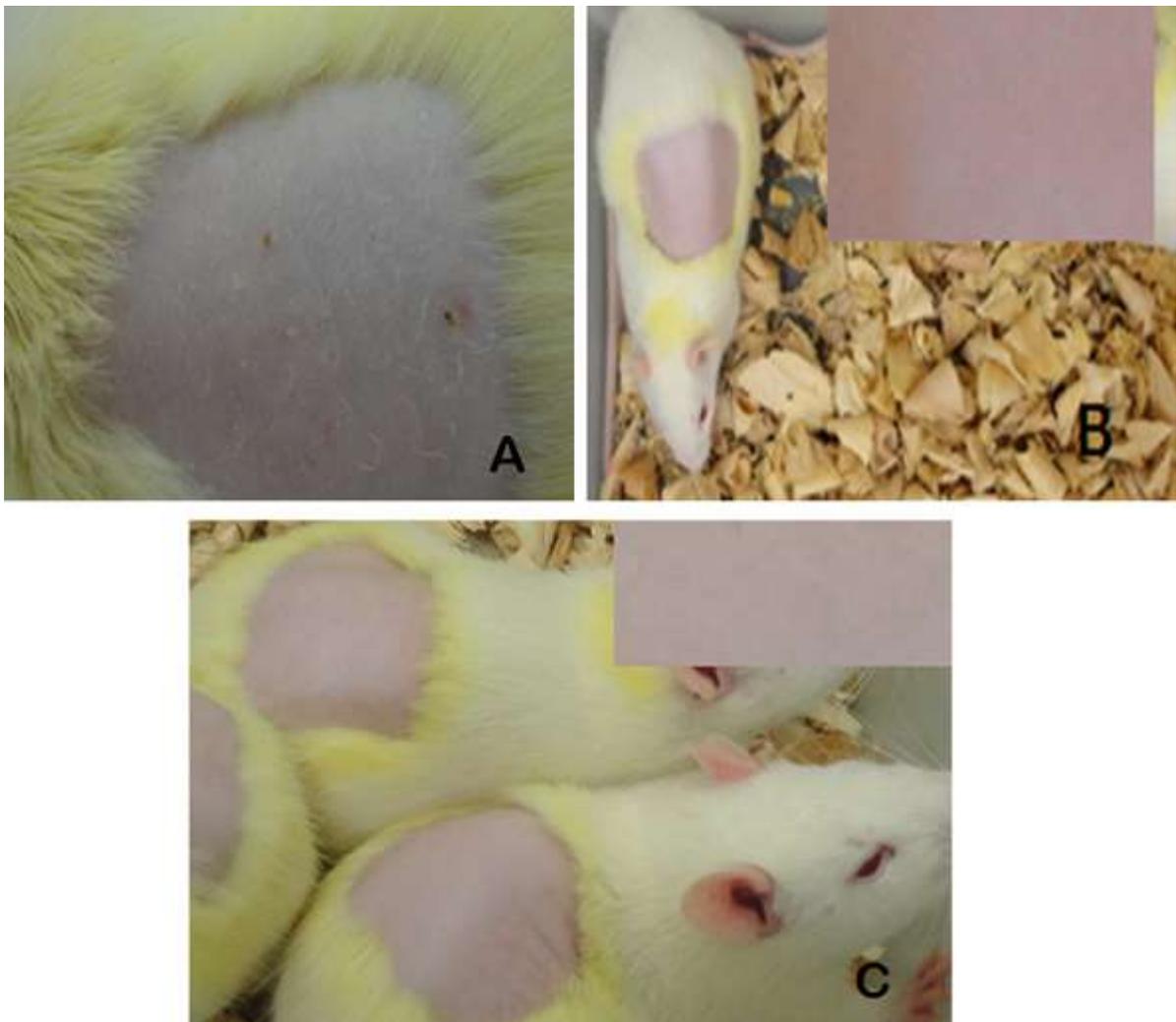
Neste estudo, a formulação lipossomal LMNX/HPMC (1:4) possui concentração do fármaco MNX correspondente a 1 mg/mL e foi avaliada qualitativa e histologicamente, quanto a seus efeitos promotores de crescimento capilar em ratos Wistar machos, com idade de sete semanas, utilizando como produto referência uma solução comercial contendo MNX 20 mg/mL (Regaine®).

6. Resultados e Discussão

6.7.1 Análise qualitativa

A avaliação qualitativa se deu através de registros fotográficos dos três grupos. A cada três dias de tratamento, os animais foram fotografados para avaliação do menor tempo de início de crescimento dos pelos e do tempo de crescimento completo dos pelos para cobrir totalmente a área depilada. A figura 25 apresenta as imagens a, b e c correspondentes aos três grupos: tratado, referência e controle, respectivamente, no 6º dia.

Figura 25 - Estudo *in vivo* de crescimento de pelos. Fotografias dos ratos tratados com LMNX/HPMC (A), referência (B) e controle (C) no dia do início do crescimento dos pelos (6º dia).



Fonte: Acervo pessoal.

6. Resultados e Discussão

Observou-se que o crescimento dos pelos para o grupo tratado iniciou-se no 6º dia de tratamento; para o grupo referência, o início se deu no entre o 9º e o 10º dia e para o grupo controle, só foi verificado no 12º dia de tratamento.

O tempo para o crescimento completo dos pelos foi menor no grupo tratado (19 dias) e, nos grupos referência e controle o tempo foi o mesmo (22 dias) (Tabela 19).

Tabela 19 - Efeito dos tratamentos com MNX nanoencapsulado em lipossomas sobre o tempo de crescimento capilar.

Grupos	Tempo de crescimento capilar (dias) ¹	
	Inicial ⁽²⁾	Completo ⁽³⁾
TRATADO	6,33 ^c ± 0,33 (n = 9)	19,00 ^b ± 0,63 (n = 6)
REFERÊNCIA	10,33 ^b ± 0,53 (n = 9)	22,33 ^a ± 0,67 (n = 3)
CONTROLE	13,00 ^a ± 0,50 (n = 9)	22,33 ^a ± 0,67 (n = 3)

⁽¹⁾: Os valores são média ± erro padrão da média.

⁽²⁾; ⁽³⁾: Médias seguidas de mesma letra não coluna não diferem entre si pelo Teste t de Student a e 5% de probabilidade de erro, respectivamente.

6.7.2 Análise quantitativa

a) Determinação de número de folículos por milímetro linear de pele de rato

Em análise histológica, os cortes podem ser elaborados em planos vertical (longitudinal) ou horizontal (transversal), optou-se por cortes longitudinais para a verificação do número de folículos por milímetro linear de pele de rato. Os resultados encontram-se na Tabela 20.

Tabela 20 - Número de folículos por milímetro linear de pele de rato.

Grupos	Número de folículos/mm ⁽¹⁾
Tratado ⁽²⁾ (n = 317)	20,97 ^a ± 0,46
Referência (n = 327)	25,82 ^b ± 1,04
Controle (N = 386)	11,79 ^c ± 0,25

⁽¹⁾ Os valores são média ± erro padrão da média (n=5).

⁽²⁾ Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo Teste t de Student em nível de 1% de probabilidade de erro.

Sabe-se que a AGA evolui com o encurtamento da fase anágena (KWACK et al., 2011) e que o MNX atua prolongando esta fase, revertendo assim a miniaturização dos folículos capilares (MURA et al., 2007). Desse modo, a indução da sincronização da fase anágena em murinos se dá experimentalmente, pela depilação antes do início do tratamento (CHASE, 1935; MULLER-ROVER; HANDJISKI; VAN DER VEEN, 2001) o que permite verificar *in vivo*, a atividade do MNX como agente capaz de prolongar esta fase.

Papa e Kligman (1965) relatam não haver evidências de neogênese de folículos pilosos após a idade fetal, sendo assim, é possível que o efeito estimulante do MNX se expresse na transição gradual de pelos *velus* (mais finos e com pouco ou nenhum pigmento) a pelos terminais, mais espessos e pigmentados (OLSEN et al., 1985) se contrapondo ao efeito da AGA sobre o ciclo de crescimento capilar, quando esta promove um prolongamento do tempo de repouso ou latência do ciclo de crescimento capilar, período entre a expulsão do folículo telógeno e o início de nova anágena (MESSENGER E RUNDEGREN, 2004).

Vários estudos *in vivo* têm sido feitos com intuito de avaliar a eficácia do MNX no tratamento da AGA a partir de diversas formas farmacêuticas, (OLSEN et al., 1987; ARCK et al., 2003; KWACK et al., 2011; ALDHALIMI; HADI; GHAFIL, 2014) e também, veiculado em nanocarreadores (SHIM et al., 2004). No entanto, não há relatos, nas bases de dados, de avaliação da atividade de MNX base através de estudos *in vitro* em modelo de célula de Franz associados ao estudo *in vivo*.

6. Resultados e Discussão

A superioridade de nanossistemas contendo MNX, comparados à sua forma livre em solução, na formação de depósito intrafolicular já foi comprovada por vários estudos (CIOTTI; WEINER, 2002; MURA et al., 2007; JAIN et al., 2010). Todavia, a forma como o nanossistema é veiculado para utilização sobre a pele pode modificar drasticamente a eficácia do tratamento, a exemplo da utilização de veículos contendo altas concentrações de etanol ou tensoativos que são capazes de desestruturar um nanossistema como lipossoma (CHORILLI, 2004). Desta forma, a utilização de veículos poliméricos, tem sido investigada e, segundo Magdassi (1997), lipossomas quando incorporados em veículos como géis hidrofílicos podem permanecer estáveis por até dois anos.

Os resultados apresentados na Tabela 20 mostram que o número de folículos/mm linear de pele foi significativamente maior no grupo referência que nos grupo tratado e controle. Os resultados do grupo tratado foram significativamente maiores que os do grupo controle, este último com o menor número de folículos após os 28 dias do estudo.

Desse modo, é possível que inicialmente, a atividade de LMNX/HPMC se deva ao MNX livre e se prolongue ao longo do tempo, proporcionada pelo MNX encapsulado incorporado ao hidrogel de HPMC, já que no estudo in vitro, se verifica a capacidade de grande penetração folicular de LMNX, mas que se encontra retardada quando a dispersão lipossomal é incorporada ao veículo polimérico (LMNX/HPMC), devido ao fato deste possuir uma concentração de fármaco (1 mg/mL) menor que a dispersão (4 mg/mL).

Analisando estes resultados, algumas considerações devem ser feitas: a primeira é que a formulação LMNX/HPMC possui uma concentração de MNX correspondente a 1 mg/mL e uma eficiência de encapsulação $50,30 \pm 0,10\%$; em segundo, sua atividade, avaliada pelo número de folículos por milímetro linear de pele de rato, foi apenas 19% menor que a de MNX solução e, por fim, a formulação MNX solução possui uma concentração de 20 mg/mL, o que representa 20 vezes mais fármaco livre que LMNX/HPMC.

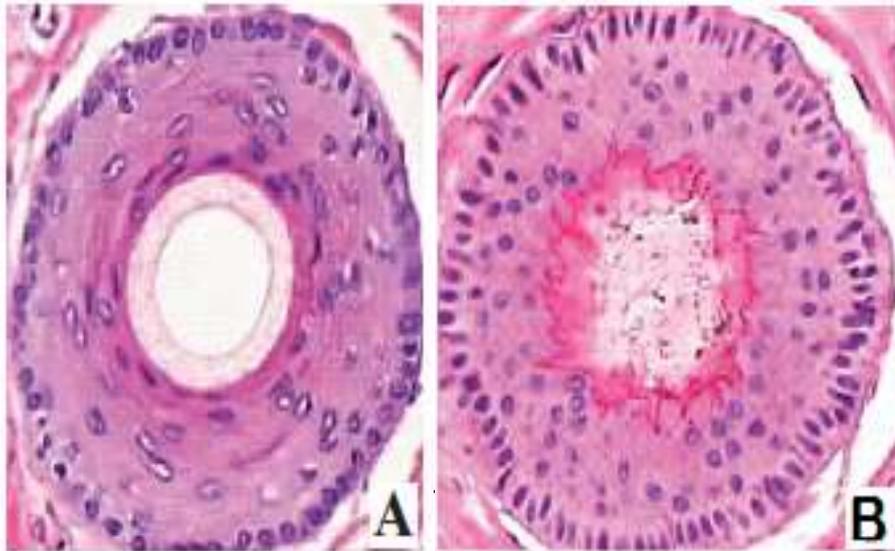
Dessa forma, conclui-se que estes resultados evidenciam uma grande eficiência da formulação LMNX/HPMC sobre o crescimento de pelos.

b) Determinação da proporção de folículos pilosos de acordo com as fases do ciclo capilar

Para a determinação da proporção de folículos nas fases anágena e telógena foram utilizados cortes transversais, com espessura de 4 μm , pois o mesmo permite a avaliação de maior número de folículos e por isso, são os mais utilizados atualmente (HEADINGTON, 1984; MULINARI-BRENNER, 2006).

A classificação das fases do ciclo capilar se deu conforme Mulinari-Brenner et al., (2006): caracterizou-se o folículo anágeno pela presença de bainhas radiculares interna e externa completamente desenvolvidas e como telógeno, o folículo que apresentou enrugamento central no canal do pelo (Figura 26).

Figura 26 - Aspecto histológico em corte transversal dos folículos capilares: Anágeno terminal com bainha interna e externa (A) e Telógeno terminal com enrugamento da bainha radicular interna (B).



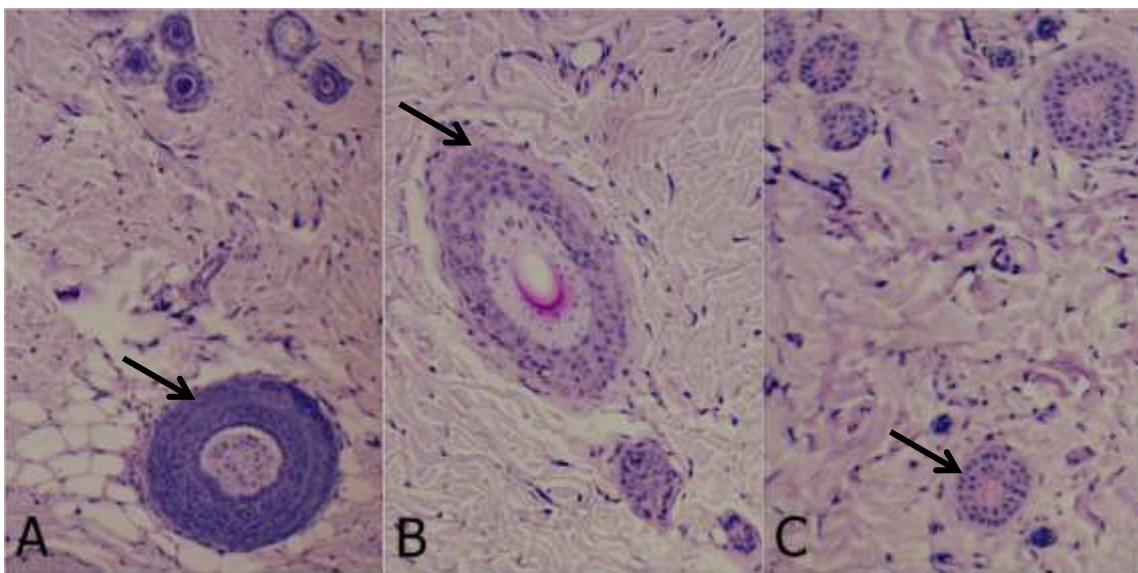
A Figura 27 mostra os animais dos três grupos (Fotografia 1 a,b,c) após os 28 dias de tratamento e as foto-micrografias A, B e C (pranchas de cortes transversais de pele dos ratos) representam os folículos anágenos nos grupos tratado e (foto-micrografias A e B) e no grupo controle (foto-micrografia C) com predomínio de folículos em fase telógena.

6. Resultados e Discussão

Figura 27 - Fotografia de ratos dos três grupos estudados apresentando crescimento de pelos no grupo tratado com LMNX/HPMC (a), grupo tratado com Regaine® a 2% (b) e controle negativo (c). Foto-micrografias de folículos capilares de ratos Wistar após 28 dias de tratamento: Foto-micrografia A grupo tratado com LMNX/HPMC, Foto-micrografia B grupo tratado com Regaine® a 2% e Foto-micrografia C controle negativo. As setas apontam folículos anágenos em A e B e, folículos telógenos em C.



Fotografia 1 a,b,c



Fonte: Acervo pessoal

Na Tabela 21 estão compilados os resultados do estudo para os três grupos durante as quatro semanas de tratamento. Os dados apontam para a ausência de folículos em fase de repouso (telógena) para o grupo tratado desde os primeiros sete dias de tratamento, enquanto o grupo referência apresenta folículos nesta fase até o 21º dia.

Observa-se que para o grupo controle, o número de folículos telógenos é crescente a partir do 14º dia. A depilação feita no dorso dos animais 24 horas antes do início do tratamento estimula a sincronização do início da fase anágena (de crescimento) do ciclo capilar, portanto o comportamento dos grupos em estudo mostra que LMNX/HPMC (1 mg/mL) foi capaz de manter os folículos em fase

6. Resultados e Discussão

anágena, enquanto o MNX a 2% em solução só exerceu completamente este efeito depois do 21º dia de tratamento quando não mais foram observados folículos em fase telógena.

Tabela 21 - Médias das percentagens de folículos anágenos e telógenos em cada grupo.

Tratamentos	Dias			
	7	14	21	28
Folículos anágenos (%)				
Tratado (n = 45)	100 ^a	100 ^a	100 ^a	100 ^a
Referência (n = 44)	99,88 ^a	99,57 ^a	98,69 ^a	100 ^a
Controle (n = 30)	100 ^a	99,08 ^a	98,72 ^a	84,51 ^b
Folículos telógenos (%)				
Tratado (n = 45)	0	0	0	0 ^a
Referência (n = 44)	0,12	0,43	1,31	0 ^a
Controle (n = 30)	0	0,92	1,30	15,49 ^b

(n = número de campos contados em cada grupo). Médias seguidas de mesma letra na coluna, para cada variável, não diferem entre si pelo Teste de Kruskal-Wallis em nível de 5% de probabilidade de erro.

Observa-se que LMNX/HPMC, a despeito de sua baixa retenção no EC e no interior dos folículos capilares no ensaio *in vitro*, foi eficaz no estudo *in vivo*, provavelmente devido à maior permeabilidade e densidade de folículos existente na pele de roedores (BRONAUGH; STEWARD, 1985).

Os resultados de ensaios *in vitro* quando extrapolados para a compreensão de experimentos *in vivo*, nem sempre apresentam uma correlação razoável. Isto talvez seja devido aos fatores como tamanho e densidade dos pelos, como também, a espessura da pele utilizada, diferença de permeabilidade entre espécies, pobre correlação entre pele de rato e pele humana (GODIN; TOUITOU, 2007; JACOBI et al., 2005; PATZELT et al., 2008; WESTER; MAIBACH, 1989).

Alguns aspectos podem ser considerados como justificativa para a discrepância entre os resultados dos ensaios *in vitro* e *in vivo*. O ensaio *in vitro* foi realizado em pele de orelha de porco e no ensaio *in vivo* foram utilizados ratos Wistar como modelo animal. Embora a pele de orelha de porco apresente

6. Resultados e Discussão

semelhança estrutural com a pele humana, é menos permeável e possui menor densidade de pelos que a pele de roedores (BRONAUGH; STEWARD, 1985).

Outro aspecto a ser considerado é que, no ensaio *in vivo*, as formulações foram aplicadas nos ratos, com massagens de um minuto de duração. Há vários estudos que enfatizam a massagem como um fator desencadeador de aumento da penetração folicular por mimetizar o movimento dos pelos (TOLL et al., 2004; LADEMANN et al., 2007, 2008; KNORR et al., 2009; WOSICKA; CAL, 2010) e também desobstruir os canais dos pelos.

A promoção do prolongamento da fase anágéna é atribuída ao fármaco MNX, nas diversas formas farmacêuticas em que se apresente. No entanto, seu uso na forma de soluções etanólicas associadas ao propilenoglicol traz extenso relato de reações adversas (RUMSFIELD; WEST; FIEDLER-WEISS, 1987; SINCLAIR, 2005; JAIN et al., 2010) além de retorno dos sintomas após breve interrupção do tratamento e pouca capacidade de formação de depósito intrafolicular, como comprovado em nossa estudo.

A possibilidade de sua apresentação associado a nanossistemas e veículos que contribuam para a estabilidade e liberação controlada, além de serem bem tolerados pelos usuários destas formulações, motivou a execução deste trabalho.

O principal objetivo do uso de nanocarreadores, contendo MNX para o tratamento da AGA, é a formação de depósito intrafolicular que garanta liberação controlada do fármaco prolongando assim, sua eficácia. Os resultados do estudo *in vivo*, embora discrepantes dos encontrados na avaliação *in vitro*, são sugestivos de que LMNX/HPMC é uma formulação promissora no tratamento da AGA, sendo necessários estudos *in vivo* de permeação e penetração intrafolicular para melhor compreensão destes fenômenos.

7. CONCLUSÃO

7. Conclusão

- Os lipossomas contendo MNX, obtidos pelo método de hidratação do filme lipídico, apresentaram características adequadas, propostas neste estudo, à sua utilização para uso tópico sendo multilamelares de tamanho médio;
- Os estudos de espectroscopia no infravermelho e de calorimetria diferencial exploratória indicaram interações fármaco-lipossomas e lipossomas/hidrogel, provavelmente de caráter hidrofóbico, mas sem influência no perfil de liberação e de retenção do fármaco no extrato córneo e nos folículos;
- As formulações lipossomais LMNX e LMNX/HPMC apresentaram perfis de liberação gradiente de concentração-dependentes com coeficientes de difusão estatisticamente semelhantes, indicando que o gel polimérico utilizado como veículo não interferiu na liberação do fármaco.
- A retenção de MNX no EC foi menor na pele tratada com LMNX/HPMC comparada ao tratamento com MNX solução.
- A retenção de MNX nos folículos na pele tratada com LMNX/HPMC apresentou valores de semelhantes ao tratamento com MNX solução e inferior àquela resultante do tratamento com LMNX.
- O número de folículos por milímetro linear de pele em ratos tratados com MNX/HPMC foi 1,2 vezes menor que aquele resultante do tratamento com o produto referência e 1,8 vezes maior que o controle.
- O tempo inicial e total para crescimento dos pelos foi significativamente menor para os animais tratados com LMNX/HPMC com relação ao tratamento referência e ao controle.

7. Conclusão

- O tratamento dos animais com LMNX/HPMC foi capaz de prolongar a fase anágena mais precocemente que o tratamento referência, comprovado pela ausência de folículos em fase de repouso (telógena) desde o 7º dia de tratamento.
- Finalmente, conclui-se, diante dos resultados obtidos neste estudo, que a formulação lipossomal contendo minoxidil incorporada em gel (LMNX/HPMC) é uma formulação promissora no tratamento da alopecia androgênica.

PERSPECTIVAS

- A associação de fator de crescimento ao minoxidil encapsulado em lipossomas pode ser uma nova estratégia para aumentar a eficácia do fármaco.
- Estudos *in vivo* de permeação e penetração intrafolicular de lipossomas contendo minoxidil incorporados em gel (LMNX/HPMC) são ainda necessários para melhor compreensão destes fenômenos.

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS

ALDHALIMI, M.A.; HADI, N.R.; GHAFIL, F.A. Promotive effect of topical ketoconazole, minoxidil, and minoxidil with tretinoin on hair growth in male mice. **Hindawi Publishing Corporation**, v. 2014, p. 1 – 5, 2014.

ANDRADE, C.A.S. **Atividade antitumoral de lectina de *Cratylia mollis* encapsulada em lipossomas**. 2003. 110 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) - Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2003.

ANSEL, H. C; POPOVICH, N. G; ALLEN JÚNIOR, L. V. **Farmacotécnica: Formas Farmacêuticas e Sistemas de Liberação de Fármacos**. 6.ed. São Paulo: Premier, 2000.

ANSEL, H. C; POPOVICH, N. G; ALLEN JÚNIOR, L. V. **Farmacotécnica: Formas Farmacêuticas e Sistemas de Liberação de Fármacos**. 8.ed. São Paulo: Premier, 2007.

ANTONIO, M. E. C. O. **Permeação cutânea in vitro como ferramenta auxiliar para o estudo de formulações semi-sólidas de cetoconazol para aplicações tópicas**. 147 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2007. Disponível em: dspace.c3sl.ufpr.br/dspace/bitstream/handle/1884/.../dissetação.pdf?. Acesso em: 10 dez. 2014.

ARCK, P. C.;HANDIJISKI, B.; PETERS, E. M. J.; HAGEN, E.; KLAPP, B. F.; PAUS, R. Topical minoxidil counteracts stress-induced hair growth inhibition in mice. **Experimental Dermatology**, v. 12, p. 580 – 590, 2003.

AULTON, M. E. **Delineamento de Formas Farmacêuticas**. 2ª ed., Porto Alegre: Artemed, p. 677, 2005.

BANGHAM, A. D.; STANDISH, M. M.; WATKINS, J. C. Diffusion of univalent ions across the lamellae of swollen phospholipids. **Journal of Molecular Biology**, v. 13, p. 238 – 252, 1965.

BABY, A.R. **Avaliação in vitro da permeabilidade cutânea da rutina em emulsões cosméticas**. 2007. 143 f. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas). Universidade de São Paulo, São Paulo, 2007. Disponível em:

Referências

www.teses.usp.br/teses/.../9/.../tde.../Andre_Rolim_Baby_Doutorado.pdf. Acesso em: 12 out 2012.

BARRY, B.W. **Dermatological Formulations: Percutaneous Absorption**. New York: Marcel Dekker, 1983.

BATISTA, C. M.; CARVALHO, C. M. B.; SANTOS-MAGALHÃES, N. S. Lipossomas e suas aplicações terapêuticas: Estado da arte. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas - Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, vol. 43, n. 2, abr./jun., 2007

BENECH-KIEFFER, F.; WEGRICH, P.; SCHWARZENBACH, R.; KLECAK, G.; WEBER, T.; LECLAIR, J.; SCHAEFER, H. Percutaneous absorption of sunscreens in vitro: interspecies comparison, skin models and reproducibility aspects. **Skin Pharmacology and Applied Skin Physiology**, v. 13, p. 324 – 325, 2000.

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

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

BLUMEYER, A.; TOSTI, A.; MESSENGER, A.; REYGAGNE, P.; MARMOL, V.; SPULS, P.I.; TRAKATELLI, M.; FINNER, A.; KIESEWETTER, F.; TRÜEB, R.; RZANY, B.; BLUME-PEYTAVI, U. Evidence based (S3) guidelines for the treatment of androgenetic alopecia in women and in men. **Journal of German Society of Dermatology**, v. 9, p.51-57, 2011.

BRASIL. Resolução nº 899, de 29 de maio de 2003. Determina a publicação do “Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos”. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Brasília, DF, de 02 de junho de 2003. Disponível em: http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/4983b0004745975da005f43fbc4c6735/RE_899_2003_Determina+a+publica%C3%A7%C3%A3o+do+Guia+para+valida%C3%A7%C3%A3o+de+m%C3%A9todos+anal%C3%ADticos+e+bioanal%C3%ADticos.pdf?MOD=AJPERES. Acesso em 18 de fevereiro de 2015.

Referências

BRONAUGH, R. L.; STEWART, R. F. Methods for in vitro percutaneous absorption studies IV. The flow-through diffusion cell. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 74, p. 64 – 67, 1985.

BROWN, M.E. (Ed.). **Introduction to thermal analysis**. 1st. ed. London: Chapman and Hall, 1988.

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

BUHL, A.E.; WALDON, D.J.; CONRAD, S.J.; MULHOLLAND, M.J.; SHULL, K.L.; KUBICEK, M.F.; JOHNSON, G.A.; BRUNDEN, M.N.; STEFANSKI, K.J.; STEHLE, R.G. Potassium channel conductance: a mechanism affecting hair growth both in vitro and in vivo. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 98, p. 315 - 319, 1992.

BURTON, J. L., MARSHALL, A. Hypertrichosis due to minoxidil. **British Journal of Dermatology**, v. 101, p. 593–595, 1979.

CALDERINI, A. **Encapsulação e caracterização físico-química do fármaco vasodilatador minoxidil em ciclodextrinas**. 2006. 176 f. Dissertação (Mestrado em Química) - Universidade Estadual de Campinas, São Paulo – São Paulo, 2006. Disponível em: biq.iqm.unicamp.br/arquivos/teses/vtIs000395683.pdf. Acesso em: 20 out. 2014

CAMPOS, P. M. B. G. **Bases dermocosméticas: Cosmiatria e Medicina Estética**, v. 2, n. 2, p. 32 – 35, 1994.

CAUSON, R. Validation of chromatographic methods in biomedical analysis; viewpoint and discution. **J. Chromatogr. B Biomed. Sci. Appl.** Amsterdam, v. 689, p. 175 -180, 1997.

CAVALCANTI, I. M. F.; MENDONÇA, E. A. M.; LIRA, M. C. B.; HONRATO, S. B.; CAMARA, C. A.; AMORIM, R. V. S.; MENDES-FILHO, J.; RABELLO, M. M.; HERNANDES, M. Z.; AYALA, A. P.; SANTOS-MAGALHÃES, N. S. The encapsulation of β -lapachone in 2-hydroxypropyl- β -cyclodextrin inclusion complex into liposomes: A physicochemical evaluation and molecular modeling approach. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 44, p. 332 - 340– 2011.

Referências

CEVC, G. Lipid vesicles and other colloids as drug carriers on the skin. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 56, p. 675–711, 2004.

CHASE, H. B. Physical factors which influence the growth of hair. In: Montagna W. Ellis R. A., eds. **The Biology of hair growth**. New York: Academic Press; p. 435 – 440, 1953.

CHIEN, Y. W. **Novel Drug Delivery Systems**, 2. ed. New York: Marcel Dekker, Inc, p. 300 - 375, 2001.

CHOI, M. J.; MAIBACH, H. I. Liposomes and niosomes as topical drug delivery systems skin. **Pharmacology and Physiology**, v. 18, p. 209 – 219, 2005.

CHONN, A.; CULLIS, P. R. Recent advances in liposomes technologies and their applications for systemic gene delivery. **Advanced Drug Delivery Review**, Amsterdam, v. 30, p. 73-83, 1998.

CHORILLI, M.; LEONARDI, G.R.; OLIVEIRA, A.G.; SCARPA, M. V. Lipossomas em Formulações Dermocosméticas. **Infarma**, v.16, nº 7-8, 2004.

CIOTTI, S. N.; WEINER, N. Follicular liposomal delivery systems. **Journal of Liposome Research**, v. 12 (1 & 2), p. 143 = 148, 2002.

COSTA, P; LOBO, J. M. S. Modeling and comparison of dissolution profiles. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 13, p. 123 – 133, 2001.

CRISTOPHER, E.; KLIGMAN, A. M. Visualization of the cell layers of the stratum corneum. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 42, p. 406 – 407, 1964.

DICK, I. P., SCOTT, R. C. Pig ear skin as an in vitro model for human skin permeability. **Journal of Pharmaceutical Pharmacology**, v. 44, p. 640 – 645, 1992.

DRAGICEVIC-CURIC, N.; GRAFE, S.; GITTER, B.; WINTER, S.; FAHR, H. Surface charged temoporfin-loaded flexible vesicles: in vitro skin penetration studies and stability. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 384, p. 100 – 108, 2010.

Referências

DU PLESSIS J, RAMACHANDRAN C, WEINER N, MULLER D. The Influence of Lipid Composition and Lamellarity of Liposomes on the Physical Stability of Liposomes upon Storage. **International Journal of Pharmaceutics**; v. 127, p. 273-278, 1996.

ESSA, S.; RABANEL, J. M.; HILDGEN, P. Effect of polyethylene glycol (PEG) chain organization on the physicochemical properties of poly (D, L – Lactide) (PLA) based nanoparticles. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 75, p. 96 -106, 2010.

FELTKAMP, H.; FUCKS, P.; SUCKER, H. **Pharmazeutische qualitaetskontrolle**. Stuttgart: Georg Thieme, p. 714 – 735, 1983.

FORSSEN, E.; WILLIS, M. Ligand-targeted liposomes. **Advanced Drug Delivery Review**, v. 29, p. 249 – 271.

FORSLIND, B. A domain mosaic model of the skin barrier. **Acta Dermatologica**, v. 74, n. 1, p. 1 – 6.

GALEY, W. R.; LONSDALE, H. K.; NACHT, S. The in vitro permeability of skin and bucal mucosa to seleted drugs and tritiated water. **The Journal of Investigative Dermatology**, v. 67, p. 713 – 717, 1976.

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

GENINA, E. A.; BASHKATOV, A. N.; SINICHKIN, Y. P.; KOCHUBEY, V. I.; LAKODINA, N. A.; ALTSHULER, G. B.; TUCHIN, W. In vitro and in vivo study of dye diffusion into the human skin and hair follicles. **Journal of Biomedical Optics**, v. 7, p. 471 – 477, 2002.

GILLET, A.; COMPÈRE, P.; LECOMTE, F.; HUBERT, P.; DUCAT, E.; EVRARD, B.; PIEL, G. Liposome surface charge influence on skin penetration behavior. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 411, p. 223 – 231, 2011.

GODIN, B.; TOITOU, E. Transdermal skin delivery: Predictions for humans from *in vivo*, *ex vivo* and animal models. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 20, p. xxx-xxx, 2007.

Referências

GOECKI, D. K. J. **Analytical Profiles of Drug Substances**, Academic Press, INC. v. 17, p. 187 – 219, New Jersey, USA, 1988.

GREGORIADIS G. **Liposome Technology**. Taylor & Francis/Informa, New York, NY, USA, 2006.

GRICE, J.E.; CIOTTI, S.N.; LOCKWOOD, W.P.; CROSS, S.E.; ROBERTS, M.S. Relative uptake of minoxidil into appendages and stratum corneum and permeation through human skin in vitro. **Journal of Pharmaceutical Science**, v. 99, 712–718, 2010.

GUPTA, V. K.; ZATZ, J. L.; REREK, M. Percutaneous absorption of sunscreens through Micro-Yucatan pig skin in vitro. **Pharmaceutical Research**, v. 16, n. 10, p. 1602 – 1607, 1999.

HAIGH, J. M.; SMITH, E. W. The selection and use of natural and synthetic membranes for in vitro diffusion experiments. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 2, p. 311 – 330, 1994.

HAN, J.H.; KWON, O.S.; CHUNG, J.H.; CHO, K.H.; EUN, H.C.; KIM, K.H. Effect of minoxidil on proliferation and apoptosis in dermal papilla cells of human hair follicle. **Journal of Dermatological Science**, v. 34, 91-98, 2004.

HARMON, C.S.; LUTZ, D.; DUCOTE, J. Potassium channel openers stimulate DNA synthesis in mouse epidermal keratinocyte and whole hair follicle cultures. **Skin Pharmacology**; 6:170-8, 1993.

HAYWARD, J.A., SMITH, W.P. Potential of liposomes in cosmetic science. **Cosmetics & Toiletries**, v.105, n.7, p.47-54, 1990.

HEADINGTON, J.T. Hair follicle biology and topical minoxidil possible mechanisms of action. **Dermatologica**, 175 (Suppl 2):19 - 22, 1987.

HERNANDEZ, B.A.C.S. Is androgenic alopecia a result of endocrine effects on the vasculature? **Medical Hypotheses**, v. 62, p. 438-441, 2004.
HURLER, J.; ZAKELJ, S.; MRAVLJAK, J.; PAJK, S.; KRISTL, A.; SCHUBERT, R.; SKALKO-BASNET, N. The effect of lipid composition and liposome size on the

release properties of liposomes-in-hydrogel. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 456, p. 49 – 57, 2013.

ILLEL, B. Formulation for transfollicular drug administration: some recent advances. **Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems**, v. 14, p. 207 – 219, 1997.

JACOBI, H., TAUBE, U. F.; SCHAFFER, W.; LADEMANN, J. Comparison of four different in vitro systems to study the reservoir capacity of the stratum corneum. **Journal of Controlled Release**, v. 103, p. 61 – 71, 2005.

JACOBI, U.; KAISER, M.; TOLL, R.; MANGELSDORF, S.; AUDRING, H.; OTBERG, H.; STERRY, N.; LADEMANN, W. Porcine ear skin: an in vitro model for human skin. **Skin Research and Technology**. v. 13, p. 19 – 24, 2007.

JATO, J. L. V. **Tecnologia Farmacêutica: Formas Farmacêuticas**, Madrid: Editorial Síntesis, v. II, p. 304 -3046, 1997.

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, 2010.

JAWORSKY, C., KLIGMAN, A.M., MURPHY, G.F. Characterisation of inflammatory infiltrates in male pattern alopecia: implication for pathogenesis. **British Journal of Dermatology**, v.127, p. 239–246, 1992.

JULIANO, R. L. **Pharmacokinetics of Liposomeencapsulated drugs**. In: KNIGHT (Ed.) *Liposomes: from physical structure to therapeutic applications*. Amsterdam: Elsevier/North Holland Biomedical Press, 1981. p. 391-406.

JUNGINGER, H. E.; HOFLAND, H. E.; BOUWSTRA, J. A. Liposomes and niosomes interactions with human skin. **Cosmetics & Toiletries**, v. 106, p. 45 -50, 1991.

KATSUOKA, K.; SCHELL, H.; WESSEL, B.; HORNSTEIN, O.P. Effects of epidermal growth factor, fibroblast growth factor, minoxidil and hydrocortisone on growth kinetics in human hair bulb papilla cells and root sheath fibroblasts cultured in vitro. **Archive of Dermatology Research**, v.; 279, p. 247 – 250, 1987.

Referências

KIRBY, C.; GREGORIADIS, G. Dehydration-rehydration vesicles (DRV): A new method for high yield drug entrapment in liposomes. **Biotechnology**, v. 11, p. 979 – 984, 1984.

KNORR, F.; LADEMANN, J.; PATZELT, A.; STERRY, W.; BLUME-PEYTAVI, U.; VOGT, A. Follicular transport route – research progress and future perspectives. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 71, p. 173 – 180, 2009.

KNORST, M. T. **Desenvolvimento tecnológico de forma farmacêutica plástica contendo extrato *Deachyrocline satureioides* (Lom) DC. Compositae (Marcela)**. 1991. 228 p. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas,) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 1991. Disponível em: <https://www.lume.ufrgs.br>. Acesso em: 29 abr. 2015.

KWACK, M.H.; KANG, B.M.; KIM, M.K.; KIM, J.C.; SUNG, Y.K. Minoxidil activates b-catenin pathway in human dermal papilla cells: A possible explanation for its anagen prolongation effect. **Journal of Dermatological Science**, v. 62, p. 154–159, 2011.

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

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

LADEMANN, J.; RICHTER, H.; TEICHMANN, A.; OTBERG, N.; BLUME-PEYTAVI, U.; LUENGO, J. et al. Nanoparticles – an efficient carrier for drug delivery into the hair follicles. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 66, p. 159 -164, 2007.

Referências

LADEMANN, J.; KNORR, F.; RICHTER, H.; BLUME-PEYTAVI, U.; VOGT, A.; ANTONIOU, C. et al. Hair follicles – an efficient storage and penetration pathway for topically applied substances. **Skin Pharmacology and Physiology**, v. 21, p. 150 – 155, 2008.

LASIC, D. D. Novel application of liposomes. **Trends in Biotechnology**, Amsterdam, v. 16, p. 307 – 321, 1998.

LAUER, A. C.; LIEB, L. M. RAMACHANDRAN, C.; GLINN, G. L.; WEINER, L. D. Transfollicular drug delivery. **Pharmaceutical Research**, v. 12, n. 2, p. 179 – 186, 1995.

LAUTENSCHLAGER, H. Liposomes in dermatological preparations. Part II. **Cosmetics & Toiletries**, v. 105, n. 7, p. 63 -72, 1990.

LEITE, H. M. E. **Formulação e caracterização de matrizes de polihidroxitirato para liberação controlada de fármacos**. 2004. 63 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia e Ciências dos Materiais) - Universidade Estadual do Norte Fluminense, Campos dos Goytacazes - Rio de Janeiro, 2004. Disponível em: uenf.br/Uenf/Downloads/PosMateriais_4042_1184361993.doc. Acesso em: 23 abr. 2015.

LICHTENBERG, D.; BARENHOLZ, Y. **Methods of Biochemical Analysis**, v.33, p. 337, 1988.

LI, X., HUANG, M., BAI, H. Thermal decomposition of cellulose ethers. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 73, p. 2927-2936, 1999.

LIRA, A. A. M. **Desenvolvimento, caracterização e avaliação de sistemas microestruturados para veiculação de ácido retinóico na pele**. 163 f. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, USP. São Paulo, 2007. Disponível em: www.teses.usp.br/teses/disponiveis/60/60137/tde-01122010.../Tese.pdf. Acesso em: 23 abr. 2015.

LOURENÇO, V. A. **Desenvolvimento e avaliação de micropartículas de quitosana para veiculação de dimetilaminoetanol (DMAE) na pele**. 118 f.

Referências

Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, USP. São Paulo, 2006. Disponível em: www.teses.usp.br/.../2006_dissertacao_vilma_antonio_lourenco.pdf. Acesso em: 23 abr. 2015

MAGDASSI, S. Delivery systems in cosmetics. **Colloids and Surfaces**, v. 23-124, p.671-679, 1997.

MAGHRABY, G.M. E.; BARRY, B.W.; WILLIAMS, A.C. Liposomes and skin: From drug delivery to model membranes. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 34, p. 203–222, 2008.

MALI, N.; DARANDALE, S.; PRADEEP, V. Niosomes as a vesicular carrier for topical administration of minoxidil: formulation and in vitro assessment. **Drug Delivery and Translational Research**, v. 3, p. 587 – 592, 2013.

MCELNAY, J. C.; BENSON, H. A.; HARLAND, R.; HADGRAFT, J. Phonophoresis of methyl nicotinate: A preliminary study to elucidate the mechanism of action. **Pharmaceutical Research**, v. 10, p. 1726 – 1731, 1993.

MANCONI, M.; SINICO, C.; VALENTI, D.; LAI, F.; FADDA, A.M. Niosomes as carriers for tretinoin: III. A study into the in vitro cutaneous delivery of vesicle-incorporated tretinoin. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 311, p.11–19, 2006.

MARKS, R.; DAWBER, R. P. R. Skin surface biopsy: an improved technique for the examination of the horny layer. **Brazilian Journal of Dermatology**, v. 84, p. 117 – 123, 1971.

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

MERCLIN, N.; BRAMER, T.; EDSMAN, K. Iontophoretic delivery of 5-aminolevulinic acid and its methyl ester using a carbopol gel as a vehicle. **Journal of Controlled Release**, v. 98, p 57 – 65, 2004.

Referências

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

MEYENBURG, S.; LILIE, H.; PANZNER, S. AND RUDOLPH, R. Fibrin encapsulated liposomes as protein delivery system studies on the in vitro release behavior. **Journal of Controlled Release**., 69, 159-168, 2000.

MEZEI, M.; GULASEKHARAM, V. Liposomes – a selective drug delivery system for topical route of administration. 1. Lotion dosage form. **Life Science**, v. 26, p. 1473 – 1477, 1980.

MEZEI, M.; GULASEKHARAM, V. Liposomes – selective drug delivery system for topical route of administration: gel dosage form. **Journal of Pharmaceutical Pharmacology**. v. 34, p. 473 – 474, 1982.

MOFFAT, A.C. Ed. **Clarke's Isolation and Identification of Drugs**. The Pharmaceutical Press, London, P. 786-787, 1986.

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

MORI, O.; UNO, H. The effect of topical minoxidil on hair follicular cycles of rats. **Journal of Dermatology**; 17:276—81, 1990.

MOURTAS, S.; FOTOPOULOU, S.; DURAJ, S.; SFIKA, V.; TSAKIROGLOU, C.; ANTIMISIARIS, S. G. Liposomal drugs dispersed in hydrogels. Effect of liposome, drug and gel properties on drug release kinetics. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 55, p. 212 – 221, 2007.

MOURTAS, S.; HAIKOU, M.; THEODOROPOULOS, M.; TSAKIROGLOU, C.; ANTIMISIARIS, S. G. The effect of added liposomes on the rheological properties of a hydrogel: a systematic study. **Journal of Colloid Interface Science**. v. 317, p. 611 - 619, 2008.

Referências

- MULINARI-BRENNER, F.; NETO, J. F.; SOUZA, F. H. M.; TORRES, L. F. B. Avaliação quantitativa em cortes histológicos transversais do couro cabeludo. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 81, p. 227 -232, 2006.
- MULLER-ROVER, S.; HANDJISKI, B.; VAN DER VEEN, C. A comprehensive guide for the accurate classification of murine hair follicles in distinct hair cycle stages. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 117, p. 3 – 15, 2001.
- 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, v. 2, p. 101–108, 2007.
- MURA, S.; MANCONI, M.; VALENTI, D.; SINICO, C.; VILA, A. O.; FADDA, A. M. Transcutol containing vesicles for topical delivery of minoxidil. **Journal of Drug Targeting**, p. 1 – 8, 2010.
- NACHT, S. Encapsulation and other topical delivery systems: a review of the state-of-the-art for controlled topical delivery. **Cosmetics & Toiletries**, v. 110, p. 25-30, 1995. NETH. APPL. 6, 615, 385. Upjohn Co., 1967. CA: 68, 21947h, 1968.
- NEUBERT, R.H.H. Potentials of new nanocarriers for dermal and transdermal drug delivery. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 77, p. 1–2, 2011.
- NEW, R. R. C. **Liposomes: a practical approach**. Oxford: IRL Press, 1990.
- NISHIMURA, E.K.; JORDAN, S.A.; OSHIMA, H.; YOSHIDA, H.; OSAWA, M.; MORIYAMA, M.; JACKSON, I.J.; BARRANDON, Y.; MIYACHI, Y.; NISHIKAWAS, S. Dominant role of the niche in melanocyte stem-cell fate determination. **Nature**, London, v. 416, p. 854-860, 2002.
- NOUNOU, M.M.; EL-KHORDAGUI, L. K.; KHALAFALLAH, N. Release stability of 5-fluorouracil liposomal concentrates, gels and lyophilized powder. **Acta Poloniae Pharmaceutics – Drug Research**, v. 62, n. 5, p. 381 – 391, 2005.

Referências

OLIVEIRA, M. A.; YOSHIDA, M. I.; GOMES, E. C. L. Análise térmica aplicada a fármacos e formulações farmacêuticas na indústria farmacêutica. **Química Nova**, v. 34, p. 1224 – 1230, 2011.

OLSEN, E. A.; WEINER, M. S.; DELONG, E. R.; PINNELL, S. R. Topical minoxidil in early pattern baldness. **Clinical and Laboratory Studies**, 1987.

OTBERG, N.; RICHTER, H.; SCHAEFER, H.; BLUME-PEYTAVI, U.; STERRY, W.; LADEMANN, J. Variations of hair follicle size and distribution in different body sites. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 122, p. 14-19, 2004.

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, p. 300 – 304, 2011.

PAPA, C. M.; KLIGMAN, A. M. Stimulation of hair growth by topical application of androgens. **Journal of the American Medical Association**, v. 191, p. 81 – 85, 1965.

PATZELT, A.; RICHTER, H.; KNORR, F.; SCHÄFER, U.; LEHR, CM.; DÄHNE, L.; STERRY, W.; LADEMANN, J. Selective follicular targeting by modification of the particle sizes. **Journal of Controlled Release**, v.150, p. 45–48, 2011.

PAVLOVITCH, J.H.; HUBERT, H.; LEIBOVITCH, J. Angiogenesis and minoxidil. **Lancet**, v.336, p. 889, 1990.

PEPPAS, N. A.; SAHLIN, J. J. Hydrogels as mucoadhesive and bioadhesive materials: a review. **Biomaterials**, v. 17, n. 16, p.1553 – 1561, 1996.

PIMENTEL, L. F.; JÁCOME-JÚNIOR, A. T.; MOSQUEIRA, V. C. F.; SANTOS-MAGALHÃES, N. S. Nanotecnologia farmacêutica aplicada ao tratamento da malária. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 43, n. 4, 2007.

PRISTA, L. V. N.; ALVES, A. C., MORGADO, R. M. R. **Tecnologia Farmacêutica**. Fundação Calouste Gulbenkian, 663 p, 1995.

Referências

RAMACHANDRAN, C.; FLEISHER, D. Transdermal delivery of drugs for the treatment of bone diseases. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 42, n.3, p. 197-223, 2000.

REDDY, M.S.; MUTALIK, S.; RAO, G.V. Preparation and evaluation of minoxidil hidrogels for topical application in alopecia. **Indian Journal of Pharmaceutical Sciences.**; v. 68, p.432-436, 2006.

RICCI, M.; GIOVAGNOLI, S.; BLASI, P.; SCHOUBBEN, A.; PERIOLI, L.; ROSSI, C. Development of liposomal capreomycin sulfate formulations: effects of formulation variables on peptide encapsulation. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 311, n. 1–2, p.172-81, 2006.

ROGERS, K. Controlled release technology and delivery systems. **Cosmetics & Toiletries**, v. 114, n. 5, p. 53-60, 1999.

ROLLAND, A.; WAGNER, N.; CHATELUS, A.; SHROOT, B.; SCHAEFER, H. Site-specific drug delivery to pilosebaceous structures using polymeric microspheres. **Pharmaceutical Research**, New York, v. 10, n. 12, p. 1738 – 1744, 1993.

ROY, R. K.; MAYANK, T.; · DIXIT, V. K. Hair growth promoting activity of Eclipta alba in male albino rats. **Archives of Dermatological Research**, v. 300, p. 357–364, 2008.

RUBALCAVA, C. G.; RODRIGUEZ, J. L.; DURO, R.; ALVAREZ-LORENZO, C.; CONCHEIRO, A.; SEIJO, B. Interactions between liposomes and hydroxypropylmethylcellulose. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 203, p. 99 – 108, 2000.

RUMSFIELD, J.A.; WEST, D. P.; FIEDLER-WEISS, V. C. Topical minoxidil therapy for hair regrowth. **Clinical Pharmacology**, v. 6, p.386–392, 1987.

SAKITA, S.; KAGOURA, M.; TOYODA, M.; MOROHASHI, M. The induction by topical minoxidil of increased fenestration in the perifollicular capillary wall. **British Journal of Dermatology**; v. 140, p. 294–296, 1999.

Referências

SANTOS, N.C. & CASTANHO, M.A.R.B. Lipossomas: a bala mágica acertou? **Química Nova**, v. 25, n. 6B, p. 1181-1185, 2002.

SCHULTHEISS, N.; LORIMER, K.; WOLFE, S.; DESPER, J. Attempted construction of minoxidil: carboxylic acid cocrystals; 7 salts and 1 cocrystal resulted. **CrystEngComm**, v. 12, p. 742 – 749, 2010

SHAH, V. P.; ELKINS, J.; WILLIAMS, R. L. Evaluation of the test system used for in vitro release of drugs for topical dermatological drug products. **Pharmaceutical Development Technology**, v. 4, n. 3, p. 377 – 385, 1999.

SHAROV, A.A.; LI, G.Z.; PALKINA, T.N.; SHAROVA, T.Y.; GILCHREST, B.A.; BOTCHKAREV, V.A. Fas and c-kit are involved in the control of hair follicle melanocyte apoptosis and migration in chemotherapy-induced hair loss. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 120, p. 27-35, 2003.

SENTJURC, M.; VRHOVNIK, K.; KRISTL, J. Liposomes as a topical delivery system: The role of size on transport studied by the EPR imaging method. **Journal of Controlled Release**, v. 59, p. 87 – 97, 1999.

SHIM, J.; SEOK KANG, H.; PARK, W.S.; HAN, S.H.; KIM, J.; CHANG, I.S. Transdermal delivery of minoxidil with block copolymer nanoparticles. **Journal of Controlled Release**, v. 97, n. 3, p. 477-484, 2004.

SHOJAEI, A. H. **Buccal mucosa as a route for systemic drug delivery: a review.** Journal of Pharmacy & Pharmaceutical Sciences, v. 1, p. 15 – 30, 1998.

SILVA, L. M. **Nanopartículas lipídicas sólidas contendo genisteína para uso tópico.** 73 f. 2012. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2012. Disponível em: [https://repositorio.bc.ufg.br/.../Dissertacao Lorena Maione Silva Cienci](https://repositorio.bc.ufg.br/.../Dissertacao_Lorena_Maione_Silva_Cienci). Acesso em: 12 dez. 2014.

SILVER, A. F.; CHASE, H. B.; ARSENAULT, C. T. Early anagen initiated by plucking compared with early spontaneous anagen. In: MONTAGNA, W.; DOBSON, R. L. **Biology of skin**. 1. Ed. Oxford: Pergamon Press, v. 19, p. 265-286. 1975.

Referências

SIMONETTI, L. D.; GELFUSO, G. M.; BARBOSA, J. C.; LOPEZ, R. F. Assessmente of the percutaneous penetration of cisplatin: the effect of monoolein and the drug skin penetration pathway. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 73, n. 1, p. 90-94, 2009.

SINCLAIR, R.D. Male androgenetic alopecia (Part II). **Journal of Men's Health & Gender**, v. 2, p. 38–44, 2005.

SINICO, C.; MANCONI, M.; PEPPI, M.; LAI, F.; VALENTI, D.; FADDA, A.M. Liposomes as carriers for dermal delivery of tretinoin: In vitro evaluation of drug permeation and vesicle-skin interaction. **Journal of Controlled Release**, v. 103, p.123–136, 2005.

SKOOG, D. A.; HOOLER, F. J.; NIEMAN, T. A. **Princípios de Análise Instrumental**, Ed. Bookman, Porto Alegre, 5ª ed., 2002.

STARCHER, B.; AYCOCK, R. L.; HILL, C. H. Multiple roles for elastic fibers in the skin. **Journal of Histochemistry & Cytochemistry**, . v.53, p. 431 -443, 2005.

STENN KS, PAUS R. Controls of hair follicle cycling. **Physiology Review**, v. 81, p. 449–494, 2001.

SUZUKI, K, SAKON, K. The application of liposomes to cosmetics. **Cosmetics & Toiletries**. v. 105, n. 5, p. 65-78, 1990.

SZOKA, F.; PAPAHADJOPOULOS, D. Comparative properties and methods of preparation of lipid vesicles (Liposomes). **Annual Review Biophysics and Bioengineers**, Palo Alto, v.9, p.467-508, 1980.

SZEJTLI, J. **Cyclodextrin Technology**, Kluwer, Dordrecht, 1988.

THE MERCK INDEX. Editora: Widholz, M., 10. ed. Merck and Co., Inc. Rahway, N.J., EUA, 1983, p. 889.

Referências

TEICHMANN, A.; JACOBI, U.; OSSADNIK, M., RICHTER, H., KOCH, S.; STERRY, J.; LADEMANN, J. Differential stripping: determination of the amount of topically applied substances penetrated into the hair follicles. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 125, p. 264-269, 2005.

UNITED STATES OF AMERICA PHARMACOPEIA 30, USP Convention Inc.; Rockville, MD, USA, 2007.

THIELITZ, A.; HELMDACH, M.; ROPKE, E. M.; GOLLNICK, H. Lipid analysis of follicular casts from cyanoacrylate strips as a new method for studying therapeutic effects of antiacne agents. **British Journal of Dermatology**, v. 145, p. 19 – 27, 2001.

TOLL, R.; JACOBI, U.; RICHTER, H.; LADERMANN, J.; SCHAEFER, H.; BLUME-PEYTAVI, U. Penetration profile of microspheres in follicular targeting of terminal hair follicles. **Journal of Investigative Dermatology**, Malden, v. 123, p. 168-176, 2004.

TORCHILIN, V.P. Recent advances with liposomes as pharmaceutical carrier. **Nature Reviews Drug Discovery**, London, v. 4, p. 145-160, 2005.

TOUITOU, E.; DAYAN, N.; BERGELSON, L.; GODIN, B.; ELIAZ, M. Ethosomes – novel vesicular carrier for enhanced delivery: characterization and skin penetration properties. **Journal of Controlled Release**, v. 65, p. 403 – 418, 2000.

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

U.S. FDA/CDER. Nonsterile Semisolid Dosage Forms – Scale-up and Postapproval Changes: Chemistry, Manufacturing, and Controls: **In vitro Release Testing and in vivo Bioequivalence Documentation**, 1997.

VOGT, A.; MANDT, N.; LADERMANN, J.; SCHAEFER, H.; BLUME-PEYTAVI, U. Follicular targeting-a promising tool in selective dermatotherapy. **Journal of Investigative Dermatology Symposium Proceedings**, v. 10, p. 252-255, 2005.

Referências

WADKE, D. A.; SERAJUDDIN, A. T. M.; JACOBSON, H. Preformulation testing. In: LIEBERMAN, H. A.; LACHMAN, L.; SCHWARTZ, J. B. (ed.) **Pharmaceutical Dosage Forms: Tablets**. 2nd ed. New York: Marcel Dekker, v. 1, p. 1- 73, 1990.

WEIGMANN, J.; LADEMANN, H.; MEFFERT, H.; SCHAEFER, H.; STERRY, W. Determination of the horny layer profile by tape stripping in combination with optical spectroscopy in the visible range as a prerequisite to quantify percutaneous absorption. **Skin Pharmacology and Applied Skin Physiology**. v. 12, p. 34 – 45, 1999.

WESTER, R.C.; MAIBACH, H.I.; GUY, R.H.; NOVAK, E. Minoxidil stimulates cutaneous blood flow in human balding scalps: pharmacodynamics measured by laser Doppler velocimetry and photopulse plethysmography. **Journal of Investigative Dermatology**; v. 82, p. 515–517, 1984.

WONG, W. M., SCIFECT, L. Minoxidil use in female alopecia. **Annals of Pharmacotherapy**, v. 28, p. 890, 1994.

WOSICKA, H.; CAL, K. Targeting to the hair follicles: Current status and potential. **Journal of Dermatology Science**, v. 57, p. 83 – 89, 2010.

XAVIER, C.R. **Associação da isoflavona genisteína com β -ciclodextrina: avaliação da penetração cutânea**. 2006. 126 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2006. Disponível em: www.lume.ufrgs.br > ... > Ciências da Saúde > Ciências Farmacêuticas. Acesso em: 20 dez. 2014.

YU, H. Y.; LIAO, H. M. Triamcinolone permeation from different liposome formulations through rat skin in vitro. **International Journal of Pharmacy**, v. 127, p. 1 – 7, 1996.

ZATZ, J. L. **Skin Permeation** - Fundamentals and Application, 1993. Wheaton: Allured Publishing Corporation.

ANEXO A

Universidade Federal de Pernambuco
Centro de Ciências Biológicas

Av. Prof. Nelson Chaves, s/n
50870-420 / Recife - PE - Brasil
Fones: (55-81) 2126 8840 / 2126 8351
Fax: (55-81) 2126 8250
www.ccb.ufpe.br



Recife, 02 de agosto de 2013.

Ofício nº 607/13

Da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UFPE
Para: Profª Noemía Pereira da Silva Santos
Centro Acadêmico de Vitória
Universidade Federal de Pernambuco
Processo nº 23076.028641/2013-73

Os membros da Comissão de Ética no Uso de Animais do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco (CEUA-UFPE) avaliaram seu projeto de pesquisa intitulado, "Lipossomas de minoxidil e bFGF veiculados em bienda de biopolímero para tratamento tópico da alopecia androgênica: desenvolvimento, caracterização e avaliação da permeação cutânea *in vitro* e *in vivo*."

Concluímos que os procedimentos descritos para a utilização experimental dos animais encontram-se de acordo com as normas sugeridas pelo Colégio Brasileiro para Experimentação Animal e com as normas internacionais estabelecidas pelo National Institute of Health Guide for Care and Use of Laboratory Animals as quais são adotadas como critérios de avaliação e julgamento pela CEUA-UFPE.

Encontra-se de acordo com as normas vigentes no Brasil, especialmente a Lei 11.794 de 08 de outubro de 2008, que trata da questão do uso de animais para fins científicos e didáticos.

Diante do exposto, emitimos parecer favorável aos protocolos experimentais a serem realizados.

Origem dos animais: Biotério de Criação do Departamento de Nutrição, UFPE/ Biotério da Universidade de São Paulo, USP; Animais: camundongos e ratos; Idade: 45-50 dias (camundongos) e 35-40 dias (ratos); Peso: 20-25g (camundongos) e 120-150g (ratos); Sexo: machos; Nº total de animais: 60.

Atenciosamente,

Profª Tânia Rieger
Presidente do CEUACCB-UFPE
SAPE 200824

CCB: Integrar para desenvolver