

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA
FACULDADE DE FARMÁCIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

Miguel Gontijo Siqueira Palmieri

**Desenvolvimento e aplicação de carreadores lipídicos nanoestruturados contendo
finasterida para o tratamento de alopecia androgenética**

**Juiz de Fora
2024**

Miguel Gontijo Siqueira Palmieri

Desenvolvimento e aplicação de carreadores lipídicos nanoestruturados contendo finasterida para o tratamento de alopecia androgenética

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Juiz de Fora como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor em Ciências Farmacêuticas.

Orientador: Prof. Dr. José Otávio do Amaral Corrêa

Coorientador: Prof. Dr. Frederico Pittella Silva

Juiz de Fora

2024

Ficha catalográfica elaborada através do programa de geração automática da Biblioteca Universitária da UFJF, com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

PALMIERI, MIGUEL GONTIJO SIQUEIRA.

Desenvolvimento e aplicação de carreadores lipídicos nanoestruturados contendo finasterida para o tratamento de alopecia androgênica / MIGUEL GONTIJO SIQUEIRA PALMIERI. -- 2024. 82 p. : il.

Orientador: José Otávio do Amaral Corrêa

Coorientador: Frederico Pittella Silva

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Juiz de Fora, Faculdade de Farmácia e Bioquímica. Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, 2024.

1. nanocarreadores. 2. finasterida. 3. alopecia androgênica. I. Corrêa, José Otávio do Amaral, orient. II. Silva, Frederico Pittella, coorient. III. Título.

Miguel Gontijo Siqueira Palmieri

Desenvolvimento e aplicação de carreadores lipídicos nanoestruturados contendo finasterida para o tratamento de alopecia androgenética

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Juiz de Fora como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Ciências Farmacêuticas. Área de concentração: Produtos Naturais e Sintéticos Ativos.

Aprovada em 18 de novembro de 2024.

BANCA EXAMINADORA

Dr. José Otávio do Amaral Corrêa - Orientador

Universidade Federal de Juiz de Fora

Dr. Frederico Pittella Silva - Coorientador

Universidade Federal de Juiz de Fora

Dra. Mirian Pereira Rodarte

Universidade Federal de Juiz de Fora

Dr. Maurílio de Souza Cazarim

Universidade Federal de Juiz de Fora

Dra. Tânia Beatriz Creczynski Pasa

Dr. Rômulo Augusto de Abreu Franchini

Universidade Federal Fluminense

Juiz de Fora, 16/10/2024.



Documento assinado eletronicamente por **Jose Otavio do Amaral Correa, Gerente**, em 19/11/2024, às 10:50, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Frederico Pittella Silva, Professor(a)**, em 19/11/2024, às 14:17, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Tania Beatriz Creczynski-Pasa, Usuário Externo**, em 19/11/2024, às 14:22, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Romulo Augusto de Abreu Franchini, Usuário Externo**, em 19/11/2024, às 18:11, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Maurílio de Souza Cazarim, Professor(a)**, em 21/11/2024, às 13:15, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Mirian Pereira Rodarte, Professor(a)**, em 25/11/2024, às 08:18, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no Portal do SEI-Ufjf (www2.ufjf.br/SEI) através do ícone Conferência de Documentos, informando o código verificador **2045049** e o código CRC **67857246**.

RESUMO

Além da importância estética, o cabelo distingue e pode influenciar aceitação social dos indivíduos. Sob certas circunstâncias, o processo normal de crescimento do cabelo é prejudicado por uma alteração fisiológica muito comum chamada alopecia androgenética (AGA). A queda de cabelo é consequência do aumento da expressão da enzima 5 α -redutase, que converte a testosterona em di-hidrotestosterona. Para tratar a AGA, a finasterida, esteroide antiandrogênico, pode ser usado de duas formas: oral ou tópica. Porém, para ambas as formas, efeitos colaterais como irritação, diminuição da libido, dermatite de contato e alterações no humor tem sido reportados. O uso de nanocarreadores como veículo para fármacos pode reduzir tais efeitos indesejados através da diminuição da necessidade do uso de doses ou concentrações altas e reaplicações frequentes. O objetivo deste trabalho é desenvolver nanocarreadores lipídicos nanoestruturados contendo finastrida (CLN-FNS⁰⁷) para o tratamento da alopecia androgenética. Como resultado, apresenta-se aqui a construção das nanopartículas com lipídeos de origem natural ajustados para liberação em temperatura definida e estabilizados com copolímeros em bloco. Após o preparo utilizando irradiação ultrassônica, os nanocarreadores lipídicos produzidos apresentaram diâmetro hidrodinâmico médio de 119,56 \pm 1,07 nm com índice polidispersividade em 0,186. Devido à característica hidrofóbica do fármaco, a eficiência de encapsulação atingiu valores próximos a 100%, conforme quantificação por HPLC. A dispersão manteve suas características durante 30 dias, demonstrando boa estabilidade. Adicionalmente, as nanoestruturas produzidas reduziram a citotoxicidade da finasterida em ensaio com células de fibroblastos e queratinócitos. Posteriormente, ensaios de permeação, liberação controlada e eficiência *in vivo*, foram realizados. CLN-FNS⁰⁷ melhorou a estabilidade do medicamento e a permeação cutânea, ao mesmo tempo que reduziu a irritação e inflamação cutânea, sem absorção sistêmica. Por fim, apresentou restauração capilar eficiente *in vivo*, permanecendo na epiderme, inclusive nos bulbos, sugerindo segurança para administração tópica. A eficácia promissora do novo CLN-FNS⁰⁷ no tratamento de AGA o designa como um candidato para aplicações terapêuticas.

Palavras chave: nanocarreadores, finasterida, alopecia androgenética.

ABSTRACT

Beyond its aesthetic importance, hair distinguishes the individual and can influence social acceptance. Under certain circumstances, the normal hair growth process is impaired by a very common physiological disorder called androgenetic alopecia (AGA). The hair loss is the consequence of an increased expression of 5 α -reductase enzyme that converts testosterone into dihydrotestosterone. To treat AGA, finasteride, an antiandrogenic steroid, can be used in two forms: oral or topical. However, for both forms, side effects such as irritation, decreased libido, contact dermatitis and mood changes have been reported. The use of nanocarriers as a vehicle for drugs can reduce such side effects by reducing the need for high doses or concentrations and frequent reapplications. The objective of this study is to develop nanostructured lipid nanoparticles containing finasteride (NLC-FNS⁰⁷) for androgenetic alopecia treatment. As a preview result, it's showed here the construction of the nanoparticles with natural origin lipids adjusted to release on defined temperature and stabilized with copolymers in block. Such nanoparticles were built with natural origin lipids adjusted to release the drug in specific temperature and stabilized with block copolymers. After preparation using ultrasonic irradiation, the lipid nanocarriers produced exhibited hydrodynamic diameter with average size of 119.56 ± 1.07 nm and polydispersity index of 0.186. Due to the hydrophobic characteristics of the drug, the encapsulation efficiency reached values close to 100% after HPLC quantification. The suspension kept its characteristics through 30 days, showing good stability. In addition, the nanostructures reduced the finasteride cytotoxicity for fibroblasts and keratinocytes cells. Subsequently, permeation, controlled release and *in vivo* efficiency tests were carried out. NLC-FNS⁰⁷ improved the drug stability and skin permeation, while reducing skin irritation and inflammation, without systemic absorption. Finally, it showed efficient hair restoration *in vivo*, and remained in the epidermis, including the bulbs, suggesting safety for topical administration. The promising efficacy of our novel NLC-FNS⁰⁷ in AGA treatment designates it as a good candidate for therapeutic applications.

Keywords: nanocarriers, finasteride, androgenetic alopecia.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 -	Ciclo normal de crescimento e queda do folículo capilar	18
Figura 2 -	Estrutura esquemática da pele humana	19
Figura 3 -	Tipos de alopecia	20
Figura 4 -	Classificação qualitativa da AGA segundo a escala Hamilton-Norwood	22
Figura 5 -	Classificação quantitativa da AGA para implante capilar	23
Figura 6 -	Estrutura química da molécula de finasterida	26
Figura 7 -	Mecanismo de ação da finasterida	26
Figura 8 -	Mecanismos de permeação dérmica	28
Figura 9 -	Tipos de nanopartículas	30
Figura 10 -	Ilustração esquemática da câmara fechada para evitar a evaporação e manter a temperatura durante as medições do ângulo de contato.....	42
Figura 11 -	Ilustração esquemática dos grupos de animais utilizados no modelo de indução e tratamento da AGA	47
Figura 12 -	Estrutura esquemática do CLN carregado com finasterida	49
Figura 13 -	Cromatograma da manteiga de semente de <i>Passiflora eludis</i>	51
Figura 14 -	Distribuição de tamanho dos CLN carregados com finasterida por intensidade	51
Figura 15 -	Variação temporal dos valores do ângulo de contato das dispersões (A) e formulações CLN-NFS (B) em diferentes concentrações de P-127.....	55
Figura 16 -	Cromatogramas do padrão de finasterida (A) e CLN em 15 dias (B) e 45 dias (C) de armazenamento a 4°C	57
Figura 17 -	Distribuição de tamanho das CLN carregadas com finasterida por intensidade após 180 dias	58
Figura 18 -	Imagens MET de CLN. (A) representa CLN-FNS ⁰⁷ (B) CLN-FNS ¹⁴ e (C) CLN-FNS ²⁸	58
Figura 19 -	Perfis de liberação da FNS a partir de formulações CLN-FNS.....	59

Figura 20 - Viabilidade celular dos fibroblastos (A) e queratinócitos (B), após tratamento com CLN e controles	60
Figura 21 Comparação do perfil cromatográfico da amostra CLN-FNS ⁰⁷ com o perfil da solução padrão de $9,0 \times 10^{-5}$ mg/mL (cor rosa) .	61
Figura 22 - Registros fotográficos do experimento	64
Figura 23 - Imagens capturadas aplicando 400x de ampliação	65
Figura 24 - Número médio de bulbos ativos encontrados na análise histológica em cada grupo de tratamento após 28 dias de tratamento	65

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Composição do suor artificial segundo Villegas et al., 2019, e do sebo artificial segundo SATYANARAYANA e GUANG 2007 e SPANGLER et al., 1967.....	41
Tabela 2 - Perfil de ácidos graxos (porcentagem)	52
Tabela 3 - Parâmetros de caracterização das formulações CLN-FNS ^{07,14,28}	53
Tabela 4 - Quantidade de finasterida detectada em diferentes camadas da pele, de cada grupo de fitas e biópsia de cianoacrilato, e na pele residual após 24 horas da aplicação das formulações CLN-FNS.	62

LISTA DE ABREVIATURAS

AGA	Alopecia androgenética
AA	Alopecia areata
AC	Alopecias cicatriciais
ACB	Alopecias cicatriciais bifásicas
ACP	Alopecia cicatricial primária
ACS	Alopecia cicatricial secundária
ANC	Alopecia não cicatricial
MTT	Brometo tiazolil azul de tetrazolio
CEUA	Comitê de ética no uso de animais
CEP	Comitê de ética em pesquisa com seres humanos
CG-FID	Cromatografia gasosa com detector por ionização de chama
CLN	Carreadores lipídicos nanoestruturados
D	Derme
DHT	Di-hidrotestosterona
EE	Eficiência de encapsulação
EP	Epiderme
ET	Eflúvio telógeno
EV	Epiderme viável
EC	Estrato córneo
FDA	<i>Food and Drug administration</i>
FHA	Filme hidrolipídico artificial
FNS	Finasterida
HPB	Hiperplasia prostática benigna
HU	Hospital universitário
PdI	Índice de polidispersão

NP	Nanopartículas
PEG	Polietilenoglicol
TCLE	Termo de consentimento livre e esclarecido
TEM	Microscopia eletrônica de transmissão

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	15
2	REVISÃO DA LITERATURA	17
2.1	PELE, PÉLO E CAMADAS.....	17
2.2	TIPOS DE ALOPECIA	18
2.3	TRATAMENTOS DISPONÍVEIS	24
2.4	MECANISMOS DE PERMEAÇÃO DÉRMICA	24
2.5	NANOCARREADORES	29
3	JUSTIFICATIVA	34
4	OBJETIVOS	35
4.1	OBJETIVO GERAL	35
4.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	35
5	MATERIAL E MÉTODOS	36
5.1	MATERIAL	36
5.2	CARACTERIZAÇÃO DOS LIPÍDEOS PRESENTES NOS CLN	36
5.2.1	Cromatografia gasosa com detector por ionização de chamas (CG-FID)	36
5.3	PREPARAÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS	37
5.4	CARACTERIZAÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS	37
5.4.1	Espalhamento Dinâmico de Luz (<i>Dynamic Light Scattering -DLS</i>) e Mobilidade eletroforética	37
5.4.2	Microscopia de Transmissão Eletrônica (MET)	38
5.4.3	Eficiência de encapsulação	38
5.4.3.1	CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA (HPLC)	38
5.4.4	Estabilidade da suspensão	39
5.5	CINÉTICA DE LIBERAÇÃO CONTROLADA	40
5.6	MOLHABILIDADE E ÂNGULO DE CONTATO	40
5.6.1	Preparação do filme hidrolipídico artificial	40
5.6.2	Mensuração do ângulo de contato	41
5.7	CITOTOXICIDADE	42
5.8	PERMEAÇÃO CUTÂNEA <i>EX-VIVO</i>	43

5.8.1	Pele humana	43
5.8.2	Estudo de penetração cutânea <i>ex vivo</i> em pele humana e de orelha de porco	43
5.9	TESTES <i>IN VIVO</i>	45
5.10	ANÁLISE ESTATÍSTICA	48
6	RESULTADOS	49
6.1	PREPARAÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS	49
6.2	CARACTERIZAÇÃO DOS ÁCIDOS GRAXOS	49
6.3	CARACTERIZAÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS	52
6.4	AVALIAÇÃO DA MOLHABILIDADE	54
6.5	EFICIÊNCIA DE ENCAPSULAÇÃO E ESTABILIDADE.....	56
6.6	MICROSCOPIA DE TRANSMISSÃO ELETRÔNICA (MET)	58
6.7	CINÉTICA DE LIBERAÇÃO CONTROLADA	59
6.8	CITOTOXICIDADE	60
6.9	PERMEAÇÃO CUTÂNEA <i>EX-VIVO</i> EM PELE HUMANA E EM PELE DE ORELHA DE PORCO	61
6.10	ESTUDOS <i>IN VIVO</i>	63
7	DISCUSSÃO	66
8	CONCLUSÃO	72
	REFERÊNCIAS	73
	ANEXOS	79

1 INTRODUÇÃO

A queda patológica de cabelo é um problema que acomete tanto homens quanto mulheres. Esta condição não deve ser considerada apenas como questão estética, uma vez que tem impactos claros na saúde, pois a mesma diminui a autoestima, causa ansiedade e pode levar à depressão. Uma das causas mais comuns da queda de cabelo é a alopecia androgenética (AGA), alteração fisiológica que acomete metade da população caucasiana do sexo masculino de meia idade e praticamente 100% dessa mesma população para os que estão acima de 80 anos. Além dos homens, de 40 a 50% das mulheres em idade avançada podem apresentar queda de cabelo (MADHESWARAN et al., 2013; GOMES et al., 2014; HAMISHEHKAR et al., 2016; KELLY; BLANCO; TOSTI, 2016; PEREIRA et al., 2018; HERZ-RUELAS et al., 2020;).

Na AGA os folículos presentes no couro cabeludo apresentam níveis elevados da enzima 5 α -redutase. Esta enzima faz a conversão, de forma irreversível, da testosterona em di-hidrotestosterona (DHT) que se liga ao receptor androgênico, estimulando a produção dos genes responsáveis pelo desenvolvimento da AGA, que por sua vez diminui o tamanho dos folículos capilares. Existem três tipos de isoenzimas do tipo 5 alfa redutase: a do tipo I (localizada principalmente nos folículos capilares e glândulas sebáceas), a do tipo 2 (próstata, epiderme, nos músculos, fígado e rins) e a do tipo 3 (cérebro, glândulas mamárias, córtex frontal, pele total, epiderme, pâncreas, baço, rins, coração, testículo, estômago, derme, intestino delgado e fígado). Além disso, existem inúmeros genes relacionados com a AGA, como por exemplo, o gene EDA2R no cromossomo X do receptor androgênico, o gene HDAC9 no cromossomo 7p21.1, o genes PAX1 e FOXA2 no cromossomo 20p11 (MADHESWARAN et al., 2013; CHIRIACÒ et al., 2016; HAMISHEHKAR et al., 2016; LOLLI et al., 2017; MARTINEZ-JACOBO et al., 2018; HERZ-RUELAS et al., 2020; DEVJANI et al., 2023).

Hormônios andrógenos, especialmente a DHT que é o mais ativo dessa classe, estão relacionados com várias doenças (hiperplasia prostática benigna, câncer prostático, acne) e condições como a AGA e o hirsutismo. As drogas antiandrogênicas mais estudadas são representadas pela classe dos inibidores da 5 α -redutase as quais interferem em diferentes níveis no metabolismo da testosterona em DHT (MOTOFEI et al., 2020).

Alguns dos tratamentos disponíveis apresentam formulações de uso externo com grandes quantidades de álcool etílico e/ou propilenoglicol, o que pode causar efeitos

adversos como: irritação, caspas, dermatite de contato e alergias. Aumento da frequência cardíaca, hipertricrose e retenção de sódio também já foram reportados pelo uso de minoxidil tópico, um dos tratamentos mais utilizados. Outra desvantagem das soluções reside no fato da necessidade de múltiplas aplicações e da baixa estabilidade da forma farmacêutica (KAUL et al., 2018; MATOS et al., 2015; PEREIRA et al., 2018; RAMEZANI et al., 2018). Além dos tratamentos tópicos, existem terapias sistêmicas com finasterida e flutamida que também possuem efeitos colaterais consideráveis como, por exemplo, alterações de humor, ginecomastia, diminuição da libido e impotência sexual (MADHESWARAN et al., 2013; HERZ-RUELAS et al., 2020; XIANG et al., 2023).

Como alternativa, objetivando contornar esses problemas relatados, vários tipos de sistemas em nível nanométrico tais como, nanopartículas poliméricas, lipídicas e nanopartículas baseadas em surfactantes, tem sido vastamente investigados com o intuito de carrear substâncias para e através da pele. Nanocarreadores também tem o potencial de diminuir a dose necessária para atingir-se a terapêutica adequada, o que pode resultar em minimização de possíveis efeitos adversos. O potencial de melhoramento da permeação de substâncias através da pele promovido por nanocarreadores está principalmente relacionado com o tipo de nanocarreador incluindo a composição. Os vários tipos de nanocarreadores podem interagir com a barreira da pele de diferentes formas, através de mecanismos de ação diversos (GÜNGÖR; KAHRAMAN, 2020; WU et al., 2024).

Neste estudo, visamos desenvolver uma formulação nanotecnológica com alto teor de encapsulação capaz de liberar a finasterida de forma gradual no local de ação adequado, de forma segura, sem causar toxicidade às células ou causar irritação no tecido, que não apresente absorção sistêmica e que finalmente restaure e recupere os folículos capilares revertendo de forma eficaz o quadro da AGA.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 PELE, PÊLO E CAMADAS

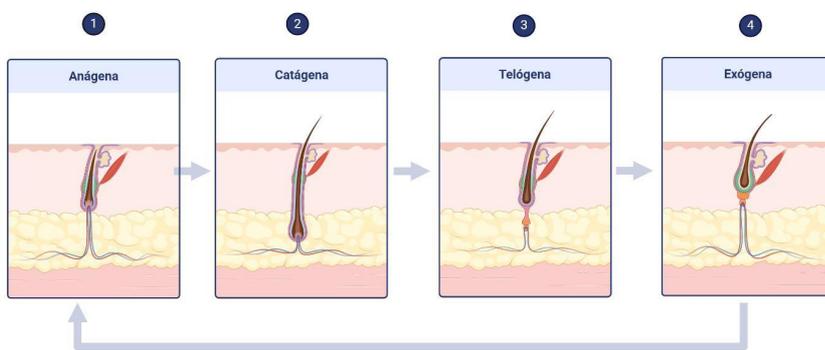
A pele é considerada o maior órgão do corpo humano e um adulto tem em média dois metros quadrados de superfície. Histologicamente pode ser dividida em epiderme, derme e hipoderme que coletivamente forma uma proteção contra agentes externos e previne perda de hidratação do organismo. A epiderme (EP) é composta de epiderme viável (EV) e não viável sendo esta última, que é a parte mais externa, também é conhecida como estrato córneo (EC). A camada mais profunda da EV é o estrato basal onde são produzidos os queratinócitos. Logo acima temos o estrato espinhoso, seguido pelo estrato granuloso e por último o EC. Essas subcamadas da EV possuem espessuras diversas variando entre 50 a 100 μm . Esta estrutura é sustentada por estruturas proteicas chamadas de tonofibrilas. Vasos capilares e fibras nervosas alcançam a epiderme atravessando a derme e a camada subcutânea de gordura. O principal tipo de célula encontrado na epiderme são os queratinócitos, compondo aproximadamente 95% das células (ALI; SHABBIR; SHAHID, 2015).

A derme, camada logo abaixo da epiderme, é composta de tecido conectivo que inclui colágeno e fibras elásticas que dão suporte mecânico e flexibilidade. Além de altamente vascularizada, a derme possui redes de vasos linfáticos. Nessa camada ficam abrigados as glândulas sudoríparas, as glândulas sebáceas assim como os folículos capilares. Na derme existem vários tipos de células, incluindo os fibroblastos e os macrófagos. Os fibroblastos são responsáveis pela síntese e renovação da matriz extracelular, enquanto os macrófagos eliminam possíveis microrganismos e tecidos danificados. A região mais profunda da pele é a hipoderme, cujas funções são oferecer proteção contra impactos mecânicos, isolamento térmico e participação do metabolismo geral através de geração e armazenamento de energia (BARONI et al., 2012).

O cabelo possui grande importância social e estética. O ciclo de crescimento do cabelo normal consiste em quatro fases: anágena ou de crescimento; catágena, também conhecida como fase de transição ou regressiva; telógena também denominada como fase de repouso e finalmente a quarta fase, chamada de fase exógena ou fase de queda (Figura 1). Sua formação começa nos folículos capilares que são essencialmente miniórgãos

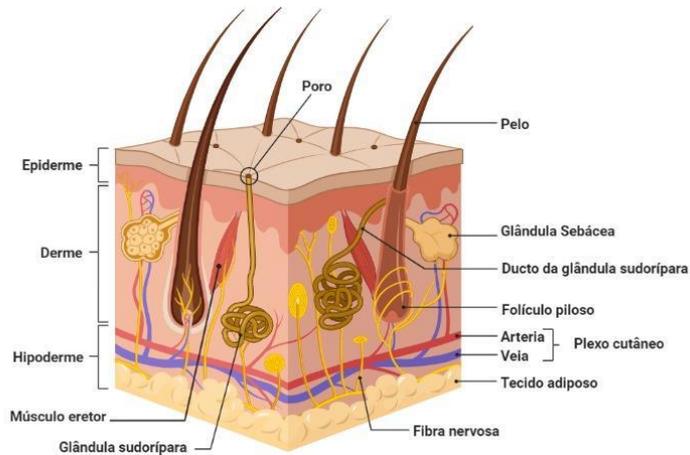
(Figura 2) compostos de múltiplas camadas encapsulando e produzindo a haste do fio que se projeta através da epiderme. A haste do fio está envolta pela bainha reticular interna e externa, enquanto na base do folículo, a papila dérmica está cercada por células da matriz que se proliferam e se diferenciam para formar o fio de cabelo. O bojo do folículo capilar está localizado na parte mediana, onde também se encontram a glândula sebácea e o músculo eretor. Os orifícios dos folículos capilares presentes no couro cabeludo chegam a ocupar até 10% da área total na superfície da pele, enquanto que em outras regiões ocupam em média apenas 0,1% (OGISO et al., 2002; NILFOROUSHZADEH et al., 2019; DEVJANI et al., 2023).

Figura 1 - Ciclo normal de crescimento e queda do folículo capilar.



Fonte: Autor, 2024 (Criada com BioRender.com)

Figura 2 - Estrutura esquemática da pele humana.

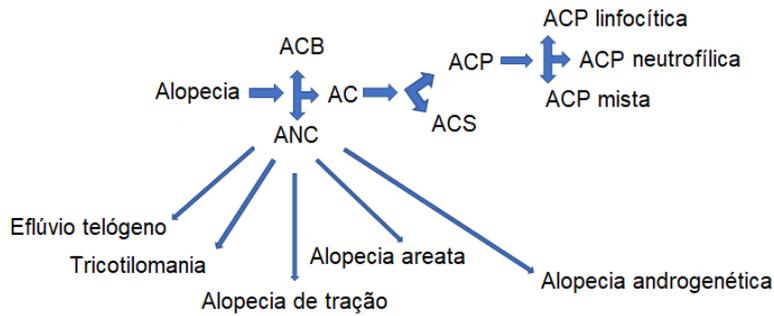


Fonte: Autor, 2021 (Criada com BioRender.com)

2.2 TIPOS DE ALOPECIA

Normalmente a alopecia do couro cabeludo é dividida em três grupos, as alopecias cicatriciais (AC), as alopecias não cicatriciais (ANC) e as alopecias cicatriciais bifásicas (ACB). Dentro do grupo das ANC estão: o eflúvio telógeno, alopecia de tração, alopecia aerata, tricotilomania e a AGA. As AC, subdivididas em alopecias cicatriciais primárias (ACP) e alopecias cicatriciais secundárias (ACS), representam um complexo grupo de desordens do cabelo, todos caracterizados pela destruição do folículo capilar como sua etapa final. As ACS possuem etiologias diversas, enquanto as ACP possuem causas e patogêneses na maioria das vezes desconhecidas. Uma terceira classificação, subdivide as ACP em linfocíticas, neutrofílicas ou mistas. As alopecias cicatriciais bifásicas ocorrem após um longo período de alopecia não cicatricial seguido por alopecia cicatricial (Figura 3) (STEFANATO, 2010).

Figura 3 - Tipos de alopecia



Fonte: Autor, 2021 (Criada com Paint)

O eflúvio telógeno (ET) é uma desordem do couro cabeludo caracterizada por uma queda difusa do cabelo. A patogênese do ET está relacionada por alguma anormalidade no ciclo normal do cabelo. Vários fatores podem alterar o ciclo normal do cabelo e causar ET, como por exemplo, substâncias químicas (anticoncepcionais, retinóides, beta bloqueadores, inibidores da enzima conversora da angiotensina), estresse (trauma cirúrgico, febre alta, gravidez, estresse emocional), patologias (hiper e hipotireoidismo, infecções crônicas, psoríase, dermatite seborreica), deficiências alimentares (restrição calórica, proteica de zinco e vitamina D) e excesso de radiação solar (ASGHAR et al., 2020).

A alopecia de tração é causada por persistentes forças tracionando os folículos capilares. Rabos de cavalo muito apertados, vestimentas de bailarinas e turbantes são alguns exemplos de causas. A alopecia de tração pode ser revertida facilmente, porém após um longo período pode evoluir para algum tipo de alopecia cicatricial irreversível (AKINGBOLA; VYAS, 2017).

A alopecia areata (AA) é um tipo de queda de cabelo não cicatricial que pode ser classificada segundo a severidade dos sintomas. Ela pode ser parcial, quando apenas algumas partes do cabelo caem, pode ser total quando a totalidade dos cabelos do couro cabeludo caem ou universal, quando todos os cabelos do corpo inteiro caem. A etiologia da AA pode estar relacionada com transições prematuras das fases do ciclo capilar e também com fatores ambientais, imunológicos e/ou genéticos (JUÁREZ-RENDÓN et al., 2017).

A tricotilomania é um distúrbio mental que geralmente afeta adolescentes em que a pessoa literalmente arranca os fios de cabelo um a um. Normalmente está associada com depressão. Terapia comportamental geralmente reverte mais da metade dos casos quando comparado com terapia farmacológica (ESKELAND; MOEN; HUMMELEN, 2018).

A AGA é a forma mais comum de perda de cabelo dentre todos os tipos de alopecia. Tipicamente a perda é iniciada na parte frontal, seguida por um afinamento difuso dos fios no vértex do crânio, o que permite classificá-la qualitativamente através da escala de Hamilton-Norwood (Figura 4) onde o tipo I é o menos severo, evoluindo até o tipo VII onde apenas uma pequena linha de cabelo na parte de trás da cabeça permece no couro cabeludo. Também é possível classificar a AGA quantitativamente em uma escala que vai de 1 a 10 sendo 10 a classificação onde houve a maior perda capilar e 1 a menor. Através de fotos e juntamente com um software, quantifica-se quantas unidades de fios de cabelo seriam necessários para cobrir a área descoberta a ser utilizada num procedimento cirúrgico de implante (Figura 5). A AGA está claramente associada à presença de hormônios andrógenos e predisposição genética. Pessoas geneticamente predispostas expressam mais receptores androgênicos e em consequência possuem uma sensibilidade maior aos efeitos destes. A DHT altera as interações das células mesenquimais do epitélio com o folículo, afetando o crescimento do cabelo, o tamanho papila dérmica e causando miniaturização dos folículos, que é a característica principal da AGA. Isso ocorre devido à micro inflamação causada por infiltrado perifolicular de macrófagos, consequentemente causando fibrose progressiva. Desta forma, provoca a perda de contato entre o músculo eretor e o bulbo, fazendo com que as células tronco presentes no bulbo percam a função. Isso ocorre entre o final da fase catágena e o início da fase anágena, afetando a papila e a bainha dérmica (MARTINEZ-JACOBO et al., 2018; PS, B. et al, 2023; PITTELLA, F., et al, 2024).

Figura 4 - Classificação qualitativa da AGA segundo a escala Hamilton-Norwood



Tipo I: cabelo normal sem afinamento ou recessão



Tipo II: o contorno começa a retroceder nas têmporas "M"



Tipo III: aprofundamento do formato "M" e afinamento no vertex.



Tipo IV: formato "M" + pronunciado e aparecimento da coroa no vertex



Tipo V: a coroa e o contorno ficam próximos de se conectarem



Tipo VI: sem distinção do contorno e da coroa, havendo cabelo somente na parte de trás da cabeça

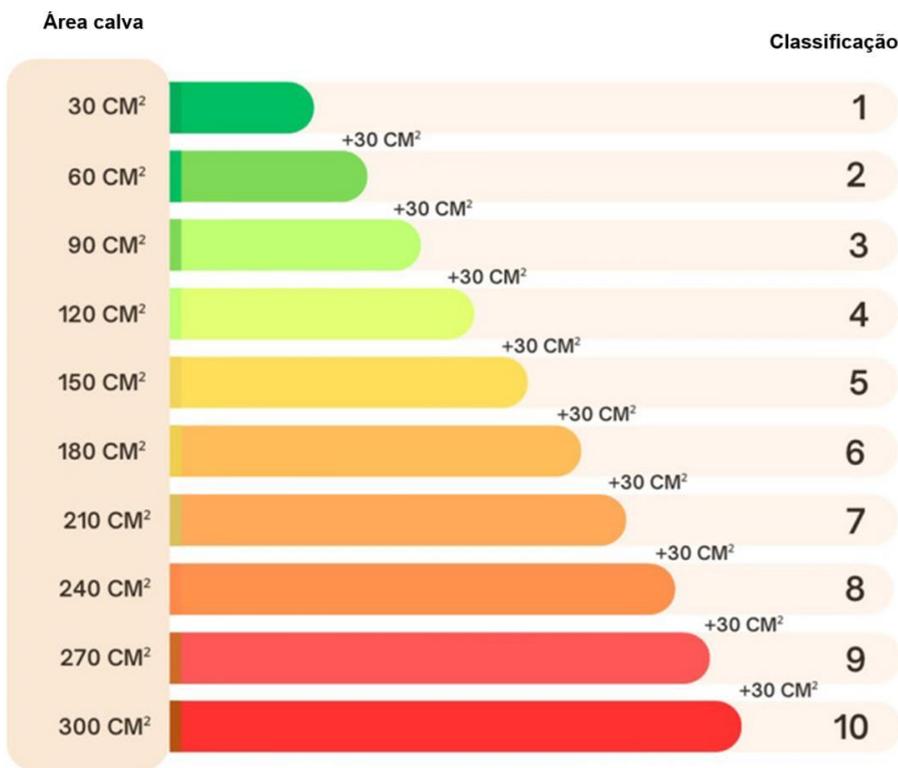


Tipo VII: estágio + avançado onde permanece somente uma pequena linha na parte de trás da cabeça.

Fonte: (PS, B. et al, 2023)

Figura 5 - Classificação quantitativa da AGA para implante capilar

"PRECISE" Scale



Fonte: (Pittella, F., et al., 2024)

Na AGA, além da redução da densidade de fios por centímetro quadrado, os fios de cabelos normais são progressivamente substituídos por fios *vellus* que possuem diâmetro e comprimento menores que 30 μm . Os próprios folículos se tornam *vellus* o que pode ser visto histologicamente, junto com a degeneração do músculo eretor e a substituição por glândulas sebáceas. Em ambos os sexos, as manifestações físicas podem resultar em redução da autoestima, impactando na qualidade de vida e afetando negativamente a percepção de outros com relação a pessoa que possui AGA. Além disto, ocorre a perda da proteção do cabelo contra os efeitos da luz ultravioleta, baixas temperaturas e traumas físicos. Consequentemente, ocorre maior risco de desenvolvimento de câncer de pele no couro cabeludo como resultado dessas mudanças. (MARTINEZ-JACOBO et al., 2018; TAI; KOCHHAR, 2020).

2.3 TRATAMENTOS DISPONÍVEIS

A AGA afeta a qualidade de vida e a autoestima dos pacientes e suas expectativas com os resultados das terapias geralmente são maiores do que a realidade. Na maioria das vezes, os objetivos dos tratamentos medicamentosos disponíveis são impedir a progressão e prevenir quedas e/ou afinamento futuro dos fios. O objetivo de fazer com que novos fios cresçam novamente nem sempre pode ser alcançado. São muitas terapias atualmente disponíveis para o tratamento da AGA, porém as mais bem estabelecidas e com resultados consistentes incluem a aplicação tópica e oral de minoxidil e a administração oral da finasterida. O minoxidil tópico é uma substância hidrofílica tradicionalmente usada para minimizar a alopecia (SCOW; NOLTE; SHAUGHNESSY, 1999; PRICE, 1999; VAÑÓ-GALVÁN, S. et al, 2021).

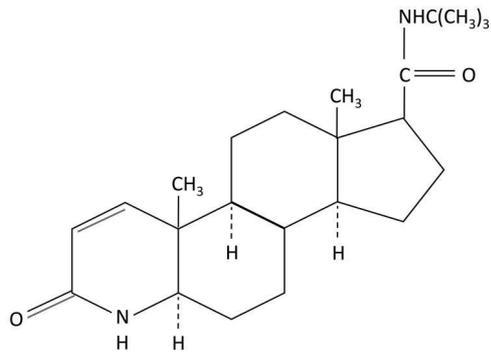
Inicialmente o minoxidil foi aprovado em 1979 para o tratamento de hipertensão refratária devido a propriedade vasodilatadora do fármaco, especificamente pela abertura dos canais de potássio. Acredita-se que o minoxidil tanto de uso tópico quanto de uso oral aja principalmente sobre o aumento do fluxo sanguíneo, através do relaxamento da musculatura vascular lisa devido a vasodilatação arteriolar, promove proliferação celular e aumento da expressão do fator de crescimento endotelial vascular. A dosagem para o tratamento oral da AGA com Minoxidil varia de 0,625 miligramas a 10 miligramas diários e os efeitos indesejados importantes de serem citados são tontura, náuseas, pericardite, hipotensão postural, hipertricose e inchaço nas pernas devido a retenção líquida. Já a

concentração do uso tópico de Minoxidil pode variar entre 2 a 10% com efeitos adversos comuns como dores de cabeça, hipertricose, irritação cutânea e dermatite de contato. (GOMES et al., 2014; KELLY; BLANCO; TOSTI, 2016; LOLLI et al., 2017; VAÑÓ-GALVÁN, S. et al, 2021) .

A finasterida (Figura 3) é uma molécula sintética usada no tratamento da AGA que possui propriedades anti-androgênicas inibindo de forma competitiva a isoenzima 5 α -redutase do tipo II, impedindo a conversão da testosterona em DHT (Figura 3). Esta substância foi desenvolvida pela Merk® e os primeiros testes clínicos em humanos ocorreram em 1986, sendo aprovada em 1992 pela agência americana *Food and Drug Administration* (FDA) para o tratamento da hiperplasia prostática benigna (HPB) na dose de 5 miligramas diárias, porém desde a década de 1940 já sabia-se que os índices de testosterona estavam associados ao desenvolvimento da AGA. Para o tratamento oral da AGA a dose recomendada é de 1 miligrama diário. Este composto é classificado quimicamente como 4-aza-3-oxoesteroide, com massa molecular de 372,549 daltons, baixa solubilidade em água (11,7 mg/L), ponto de fusão de 250 °C, lipofílica e tempo de meia vida curto (seis horas). A finasterida, quando em contato com o couro cabeludo é capaz de reduzir em mais de 60% os níveis locais de di-hidrotestosterona (PRICE, 1999; SOLEYMANI; SALIMI, 2019; GUPTA et al., 2022).

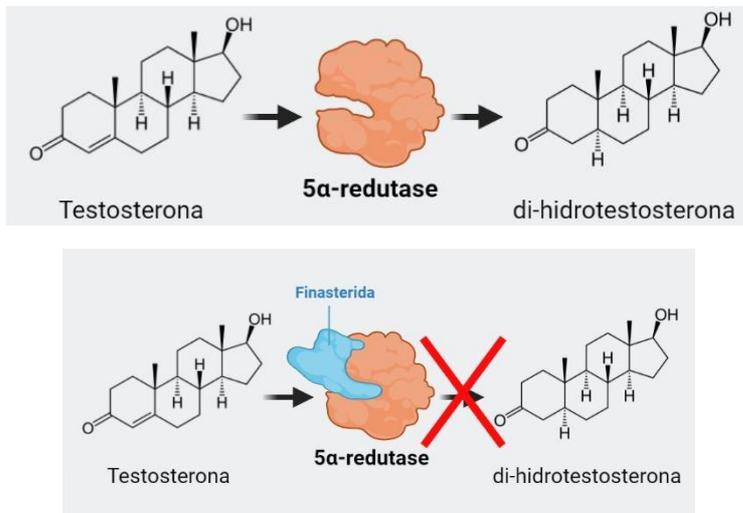
A administração oral de finasterida deve ser feita de uso contínuo e a interrupção do tratamento pode fazer com que o paciente retorne ao ponto inicial em aproximadamente um ano. Apesar de ser segura, a finasterida pode gerar efeitos adversos como diminuição da libido, disfunção erétil, decréscimo do volume ejaculatório, ginecomastia e pode prejudicar a mobilidade dos espermatozoides. Outra preocupação com o uso da finasterida oral está no mascaramento dos parâmetros para diagnóstico precoce do câncer de próstata. Nas mulheres, o excesso de estrogênios provocado pelo tratamento está associado com aumento do risco de câncer de mama. A utilização da finasterida de forma tópica, possibilita a redução local dos níveis de DHT com menor absorção e menos efeitos sistêmicos, possibilitando diminuição dos efeitos adversos (CAON et al., 2014; HAMISHEHKAR et al., 2016; MOTOFEI et al., 2020).

Figura 6 - Estrutura química da molécula de finasterida



Fonte: (IAMSUMANG; LEERUNYAKUL; SUCHONWANIT, 2020)

Figura 7 - Mecanismo de ação da finasterida



Fonte: Autor, 2024 (Criada com BioRender.com)

A dustasterida é outro exemplo de inibidor da 5 α -redutase. Trata-se de derivado da finasterida com mecanismo de ação semelhante, no entanto bloqueia apenas as isoenzimas do tipo um e dois. Consiste em um fármaco aprovado para o tratamento da AGA apenas em poucos países. Os efeitos colaterais também são similares aos da finasterida

(disfunção sexual, alteração da libido, ginecomastia e alterações do humor) (DEVJANI et al., 2023).

Já, os antagonistas dos receptores androgênicos consistem em uma classe de fármacos utilizados de forma *off label* para o tratamento da AGA em mulheres. Incluídos nesta classe estão a flutamida, bicalutamida, o acetato de ciproterona, clascoterona e a espironolactona. Todas essas substâncias possuem efeitos adversos importantes e resultados contra AGA questionáveis quando comparados com os tratamentos tradicionais. As substâncias análogas à prostaglandina como a latanoprosta e a bimatoprosta, ambas aprovadas pela FDA para o tratamento do glaucoma, são também utilizadas para o tratamento da hipotricose nos cílios e sobrancelha e são utilizadas na AGA com resultados satisfatórios. Acredita-se que essas substâncias prolonguem a fase anágena do ciclo capilar. Pacientes que utilizam essas substâncias podem apresentar reações eritematosas na pele. Outras substâncias, terapias que ainda estão sendo avaliadas ou tratamentos coadjuvantes incluem: o cetoconazol, substância que apresenta propriedades antiandrogênicas utilizada concomitantemente com a finasterida, laser de baixa potência, injeção de toxina botulínica A, injeção de dutasterida, suplementação de vitaminas e minerais, cafeína, óleo de alecrim, óleo de semente de abóbora, saw palmetto, implante de cabelo, camuflagem, injeção de plasma enriquecido com plaquetas, microagulhamento, ativadores dos genes Wnt e células tronco (KELLY; BLANCO; TOSTI, 2016).

O tempo de tratamento relacionado às terapias mencionadas geralmente é um fator negativo, pois pode variar entre 6 a 12 meses, sendo que os resultados podem desaparecer logo após o término da terapia. Portanto, é necessário desenvolver formulações que minimizem tais problemas no tratamento da AGA. Neste sentido, o controle na manipulação de materiais, possibilitando e estruturação em escala nanométrica permite a produção de nanopartículas que incorporam e liberam o ativo em condições fisiológicas específicas. Com esta estratégia baseia-se o uso de nanopartículas como carreadores de fármacos. Existe um interesse crescente no desenvolvimento de carreadores que possam entregar de forma específica substâncias capazes de atravessar o estrato córneo para que exerçam a ação no local adequado, evitando que a formulação fique concentrada nas camadas mais altas da pele (PRICE, 1999; MADHESWARAN et al., 2014; AHMED; RIZQ, 2018; PERVAIZ et al., 2020;).

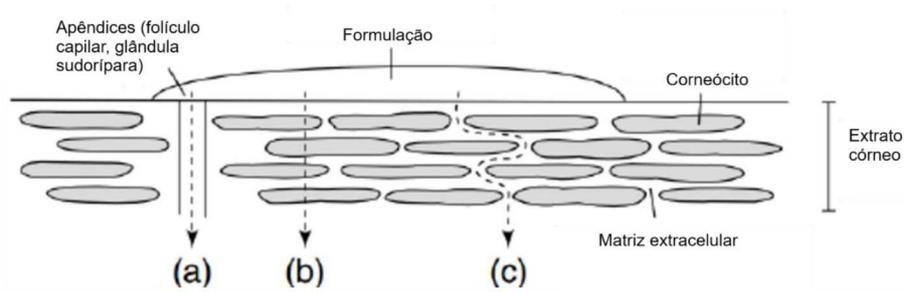
2.4 MECANISMOS DE PERMEAÇÃO DÉRMICA

As formulações de uso tópico, quando utilizadas para tratamento das diversas situações que envolvem a pele, podem ter objetivos diferentes. Tratamentos hormonais por exemplo, frequentemente exigem que a formulação atravesse todas as camadas da pele e atinja a corrente sanguínea, pois neste caso, o efeito sistêmico é desejável. Por outro lado, quando o objetivo é apenas tratamento local e ou quando é de conhecimento geral os efeitos danosos da absorção sistêmica do fármaco que está sendo veiculado, espera-se que a formulação fique apenas nas camadas da pele, exercendo o efeito sem permitir que a substância em questão atinja a corrente sanguínea. Neste sentido, existem três rotas pelas quais uma nanopartícula ou fármaco seria capaz de atravessar a primeira barreira da pele, a saber, o extrato córneo, e entregar o respectivo conteúdo: a primeira delas seria se difundindo entre a bicamada lipídica celular envolta pelos corneócitos, caracterizando a via intercelular; a segunda seria atravessando diretamente os corneócitos, caracterizando a via intracelular; e a terceira seria atravessando indiretamente o extrato córneo através de apêndices existentes no local, como por exemplo, as glândulas sudoríparas ou o próprio folículo piloso, caracterizando a via paracelular (KHAN et al., 2018; CHEN, Q. et al., 2024).

Com relação à permeação dos ativos e nanocarreadores visando o tratamento tópico, existem três caminhos a serem considerados: paracelular, onde a absorção ocorre através dos apêndices da pele, como por exemplo, os folículos capilares; intracelular, atravessando diretamente as células e intercelular, quando a permeação até as camadas mais profundas se dá contornando os corneócitos (Figura 8). O acúmulo de substâncias nos folículos capilares pode levar a uma absorção mais eficiente. Os folículos, por tratarem-se de invaginações da pele propicia que a finasterida presente nas nanopartículas alcance camadas mais profundas, atingindo áreas maiores, podendo potencializar a permeação do fármaco. Além disso o *clerance* nos folículos é mais lento, devido a inexistência de descamação ou contato imediato, fazendo com que a finasterida possa atuar por mais tempo. O movimento natural dos fios, apesar de estar na direção oposta, atua como uma bomba de sucção, transportando a finasterida até as primeiras camadas da EV. Através do EC, a característica lipofílica e polar da finasterida terá um papel crucial pois será biocompatível com o EC. A formulação será absorvida através dos corneócitos ou através dos espaços intracelulares. Vale ressaltar que o tamanho ideal das nanopartículas para maior permeação deva estar entre 20 a 700nm (OGISO et al., 2002; FAROKHZAD;

LANGER, 2009; SCHNEIDER et al., 2009; NG, K.W., LAU, W.M., 2015; HAMISHEHKAR et al., 2016).

Figura 8 - Mecanismos de permeação dérmica

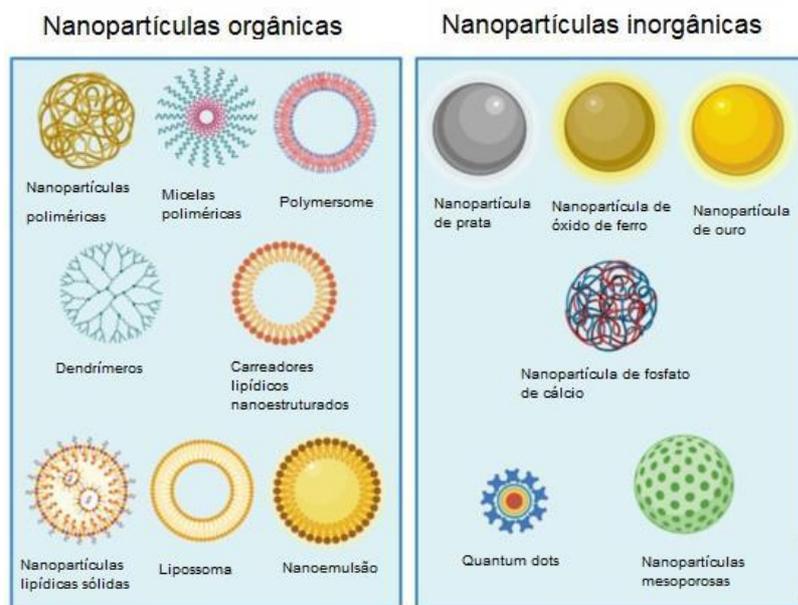


Fonte: (NG, K.W., LAU, W.M., 2015)

2.5 NANOCARREADORES

A nanotecnologia pode ser definida como a manufatura e/ou engenharia de materiais em nível molecular ou atômico. Refere-se a estruturas com tamanho variando entre um a centenas de nanômetros e são obtidas a partir dos respectivos componentes individuais. Os produtos nanotecnológicos adicionam novas opções terapêuticas ao arsenal das companhias farmacêuticas. Os materiais utilizados no desenvolvimento de estruturas nanotecnológicas são frequentemente classificados como orgânicos e inorgânicos. As nanopartículas mais utilizadas e descritas na literatura são quatorze, sendo oito do tipo orgânica e seis do tipo inorgânica (Figura 9) (FERREIRA et al., 2021).

Figura 9 - Tipos de nanopartículas



Fonte: (FERREIRA et al., 2021)

Nanocarreadores de estrutura lipídica tem sido estudados para aplicações diversas e utilizam como constituinte principal lipídeos sintéticos ou naturais. Entre os tipos de nanocarreadores lipídicos relacionados, os carreadores lipídicos nanoestruturados (CLN) são preparados através da utilização de uma mistura de lipídeos (sólidos e líquidos) que se apresenta sólida em temperatura ambiente, suspensos em meio aquoso e estabilizados por um tensoativo. Devido à possibilidade de modular o tamanho em escala nanométrica e a carga superficial, este sistema é capaz de realizar entrega direcionada a tecidos ou células específicas. Além disso, a engenharia de partículas com carga superficial negativa pode facilitar a travessia de barreiras epiteliais, o que é crucial para a administração tópica (SOUTO; NAYAK; MURTHY, 2011; BERTI et al., 2022; SHAIKH et al., 2023).

As CLN são capazes de encapsular ativos hidrofóbicos e podem apresentar vantagens quando comparadas com outros sistemas coloidais, a saber: i) maior estabilidade físico-química do insumo ativo incorporado; ii) biocompatibilidade; iii) liberação

controlada do insumo ativo; iv) métodos de produção sem uso de solvente orgânico; v) fácil produção em escala industrial; e vi) esterilização. As desvantagens dos CLN podem ser descritas como limitações de alguns métodos de preparo em que se utiliza altas temperaturas, o que pode limitar o espectro de substâncias a serem utilizadas. Nestes casos deve-se levar em consideração os respectivos pontos de fusão. Além disso, pela própria característica deste nanocarreador, seu uso abrange somente a incorporação de fármacos com caráter lipofílico (FAROKHZAD; LANGER, 2009; DETONI et al., 2012).

O objetivo do uso dessas partículas em terapias é transportar os ativos até o local específico de ação e entregá-lo com uma dose terapêutica efetiva. Os nanocarreadores demonstram grandes vantagens quando comparadas às tecnologias clássicas, pois permitem dissolução de insumos ativos em soluções aquosas acima dos respectivos limites de solubilidade. Além disso, promovem a estabilidade dos insumos ativos e, quando em nível sistêmico, evitam a flutuação dos teores plasmáticos o que resulta em uma menor toxicidade. Dessa forma, proporcionam uma maior eficácia terapêutica através da liberação prolongada do insumo ativo (BARUA; MITRAGOTRI, 2014). Os CLN combinam as vantagens das nanopartículas com as características de não toxicidade e biodegradação de lipídeos, tornando-se dessa forma uma opção mais segura quando comparado com outros sistemas nanoestruturados. Além disso, os CLN formam uma matriz sólida que permite a liberação controlada de substâncias e, portanto, mais estáveis. Os óleos presentes nos CLN agem reduzindo o grau de cristalização do núcleo lipídico, evitando a expulsão da substância presente na matriz e consequentemente com capacidade de carregamento mais alta (SCIOLI MONTOTO; MURACA; RUIZ, 2020).

O polímero (surfactante) utilizado para o preparo dos CLN possui grande importância. A escolha adequada deste material irá proporcionar liberação da substância ativa no momento e no local adequado. Alguns polímeros possuem a propriedade de liberar a substância incorporada nas nanopartículas após atingir determinada temperatura. Os CLN que respondem à determinada temperatura, podem fazê-lo de maneira rápida e reversível tanto através de estímulo externo, quando o aquecimento é aplicado por fora, quanto pelo estímulo interno, quando por exemplo inflamações elevam naturalmente a temperatura interna local. Como consequência dessa resposta a temperatura, até mesmo pequenas variações são capazes de desencadear uma mudança de fases nos CLN e permitir que a carga seja liberada. Esse sistema pode ser equalizado para que haja menor citotoxicidade, menor toxicidade sistêmica e prevenir excesso de dosagem (KARIMI et al., 2016).

Os sistemas poliméricos termo-reversíveis, comercialmente conhecidos como Pluronic®, Poloxamer® ou Synperonic®, são blocos triplos de copolímeros formados por duas moléculas óxido de polietileno (PEO), porção hidrofílica, e uma de óxido de propileno (PPO), porção hidrofóbica, compondo a fórmula molecular $PEO_n-PPO_n-PEO_n$. Tais polímeros conseguem formar CLN anfífilicos por auto-associação formando um núcleo interno capaz de conter a substância hidrofóbica desejada e uma camada exterior hidrofílica. Como a temperatura da solução crítica mais baixa das nanopartículas formadas com Pluronic® F-127 é próxima a temperatura corporal, uma simples fricção mecânica é capaz de fazer com que os CLN sejam capazes de liberar seu conteúdo (KARIMI et al., 2016; DAS; SINGH; KUNWAR, 2020).

Atualmente no Brasil existem apenas duas patentes registradas em que se utilizam nanopartículas carreadoras de finasterida e/ou minoxidil. Porém nessas duas patentes, que pertencem a um mesmo grupo, as nanopartículas utilizadas são nanopartículas poliméricas que podem apresentar algumas limitações, como por exemplo, dificuldade para produção em larga escala e toxicidade (POHLMANN et al., 2019; POHLMANN; JORNADA; GUTERRES, 2014). Desta forma, neste trabalho o objetivo geral foi desenvolver nanopartículas lipídicas sólidas contendo finasterida para maior penetração do insumo ativo através da pele, e consequente aumento do potencial terapêutico (CAON et al., 2014; HAMISHEHKAR et al., 2016; KAUL et al., 2018).

Como alternativa ao uso de lipídeos sintéticos, lipídeos vegetais extraídos de sementes de plantas brasileiras foram utilizados por apresentarem composição balanceada de ácidos graxos, sendo capazes de produzir núcleos com a estrutura cristalina imperfeita, que auxiliam numa maior encapsulação e liberação do insumo ativo (BATTAGLIA; GALLARATE, 2012). Nos testes de permeação, a nanopartícula permeou até as camadas da derme para então liberar o ativo próximo ao folículo capilar, conforme estratégia planejada pelos pesquisadores, sem haver absorção sistêmica (TAMPUCCI et al., 2014). No estudo publicado em 2020, demonstramos a composição do material lipídico das nanopartículas através de cromatografia gasosa, caracterizamos os CLN, obtivemos alto índice de eficiência de encapsulação e estabilidade e demonstramos alta viabilidade celular após o tratamento com as amostras (PALMIERI et al., 2020).

As formulações tópicas enfrentam desafios relacionados às propriedades físico-químicas, como solubilidade e instabilidade no ambiente extracelular, resultando em baixa biodisponibilidade. Além disso, essas formulações contêm altos níveis de álcool e/ou

propilenoglicol, o que pode causar efeitos colaterais como irritação da pele, caspa, dermatite e alergias. Para superar essas limitações, pesquisas recentes têm concentrado-se na avaliação de novas tecnologias que possibilitem o encapsulamento e entrega de fármacos através de nanossistemas, especialmente nanopartículas, melhorando assim o desempenho e a distribuição para o tecido alvo (MADHESWARAN et al., 2013; GOMES et al., 2014; MATOS et al., 2015; MADHESWARAN et al., 2017; RAMEZANI et al., 2018; KAUL et al., 2018; PALMIERI et al., 2020; SOHAIB et al., 2022; MOHAMAD et al., 2023; XIANG et al., 2023).

3 JUSTIFICATIVA

Pelo exposto anteriormente e tendo em vista os fatores negativos relacionados às terapias atualmente disponíveis, o uso de nanocarreadores contendo finasterida podem contribuir para a eficiência e eficácia no tratamento da queda de cabelo. A AGA é um problema para milhões de homens e mulheres entre jovens e idosos. Portanto, o desenvolvimento de formulações capazes de minorar tais problemas torna-se de grande interesse para a população e para a saúde.

4 OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GERAL

Desenvolver e testar nanocarreadores lipídicos nanoestruturados (CLN), capazes de carrear moléculas de finasterida, permeando a pele de forma segura e eficaz, para restaurar os danos causados pela AGA.

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Caracterizar os lipídeos a serem usados na preparação dos CLN;
- Preparar e desenvolver os CLN contendo finasterida;
- Caracterizar os CLN quanto ao tamanho de partícula, índice de polidispersão, potencial Zeta, morfologia e eficiência de encapsulação;
- Avaliar a estabilidade da suspensão dos CLN produzida;
- Avaliar a molhabilidade da suspensão dos CLN produzida;
- Avaliar o ângulo de contato com a pele da suspensão de CLN produzida;
- Determinar a cinética de liberação da finasterida a partir dos CLN;
- Avaliar a viabilidade celular dos CLN em linhagem celular de fibroblastos e queratinócitos humanos;
- Determinar a penetração cutânea *ex vivo* dos CLN em pele humana e de orelha de porco;
- Quantificar a finasterida liberada em diferentes camadas da pele de porco.
- Avaliar ações histológicas do nanocarreador com finasterida em modelo animal murino.

5 MATERIAL E MÉTODOS

5.1 MATERIAL

Os materiais utilizados foram: Polímero Pluronic® F-127 (P-127) adquirido da Sigma-Aldrich São Paulo, Brasil. A manteiga da semente de *Passiflora edulis* foi obtida da Ebpm Comercial Ltda, Brasil. A Finasterida (FNS) adquirida do distribuidor Infinity Pharma e gentilmente cedida pela Farmácia de Manipulação Arcanjo Miguel, Juiz de Fora, Brasil. Cloreto de sódio, ácido láctico, óleo de coco e óleo de abacate foram adquiridos da ACEF, Itália. Ureia, colesterol, ácido palmítico e glicina foram adquiridos da Sigma-Aldrich, Itália. O ácido acético glacial foi adquirido da Avantor VWR, Itália, enquanto o esqualeno, o azeite e a vaselina foram adquiridos da Farmalabor, Itália. Por fim, o cloreto de amônio e o ácido oleico foram adquiridos de Carlo Erba, Itália.

5.2 CARACTERIZAÇÃO DOS LIPÍDEOS PRESENTES NOS CLN

5.2.1 Cromatografia gasosa com detector por ionização de chamas (CG-FID)

Lípídeos naturais extraídos das sementes de *Passiflora eludis* foram caracterizados por cromatografia gasosa de alta resolução com detector por ionização de chama (HP7820A, Agilent, USA) com uma coluna SUPELCOWAX-10 15mm x 0,2mm x 0,2µm e temperatura em gradiente (A) 120°C, (0 min), 10°C/min até 1240°C (B) 60°C, (0 min), 10°C/min até 240°C; injetor split em 250°C e detector em 260°C. O gás de arraste usado foi o hidrogênio (4 mL/min) e o volume injetado foi de 1 µL. A identificação dos picos foi feita por comparação com padrões de ácidos graxos Supelco37 Fame mix (Supelco cat no 47885-U).

5.3 PREPARAÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS

As nanopartículas foram preparadas usando a técnica de homogeneização por irradiação ultrassônica, de forma modificada (SOLDATI et al., 2018). Primeiramente, uma mistura de lipídeos de origem vegetal (1% p/v) e finasterida (0,09% p/v) foi usada como fase orgânica. Esta fase foi misturada e aquecida até a temperatura de 5°C graus acima do ponto de fusão dos lipídeos. Posteriormente, a fase aquosa, que foi previamente preparada em três concentrações de Pluronic diferentes a saber 7mg/mL, 14 mg/mL e 28 mg/mL dando origem as três nanopartículas distintas (CLN-FNS⁰⁷, CLN-FNS¹⁴ e CLN-FNS²⁸), foi vertida na fase orgânica ou oleosa. Após esta etapa, a dispersão foi submetida à irradiação ultrassônica (100W), auxiliado por uma ponta de ultrassom (6 mm de diâmetro). A suspensão recebeu irradiação ultrassônica por 5 minutos. Após esse processo a formulação ficou em repouso até alcançar temperatura ambiente para a solidificação do núcleo lipídico.

5.4 CARACTERIZAÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS

5.4.1. Espalhamento Dinâmico de Luz (*Dynamic Light Scattering -DLS*) e Mobilidade eletroforética

Amostras de CLN foram caracterizadas pelo diâmetro hidrodinâmico, índice de polidispersão (Pdl) e potencial Zeta, utilizando o equipamento Zetasizer Nano ZS90 (Malvern Instruments, UK). O diâmetro hidrodinâmico e o Pdl foram determinados através da técnica de DLS, com laser He-Ne (633 nm) em ângulo de detecção de 90° utilizando cubeta de quartzo (ZEN2112) a 25°C. Os valores de potencial Zeta foram determinados através da avaliação da mobilidade eletroforética, através da equação de Smoluchowski. Antes da caracterização, as amostras foram diluídas (1:400, v/v) em água ultrapura para obtenção de condição adequada para o espalhamento de luz. Os valores foram obtidos através do cálculo da média de 5 leituras. As medidas foram realizadas em triplicata, à temperatura ambiente.

5.4.2 Microscopia de Transmissão Eletrônica (MET)

Observações das nanopartículas através de microscopia de transmissão eletrônica foram realizadas em equipamento JEM-1011 TEM (Jeol Ltd., Tokyo, Japan) operado a 200kV. As amostras foram depositadas sobre um suporte metálico de cobre (grade 200 mesh) com revestimento de carbono, seguido de secagem a temperatura ambiente. As grades foram mergulhadas em suspensão de CLN e foram misturada com uma solução de acetato de uranila (2% (p/v)) por 30 segundos. O excesso de solução foi removido com filtro de papel e secas em temperatura ambiente, seguindo imediatamente para a observação por MET.

5.4.3 Eficiência de encapsulação

A eficiência de encapsulação (EE) foi determinada diretamente através da quantificação de finasterida livre (não encapsulada) presente na fase aquosa. O CLN será diluído (1:200, v/v) em água ultrapura, seguida de ultrafiltração/centrifugação. Alíquotas de 2 mL da suspensão de CLN (n=3) diluídas foram transferidas para unidades de ultrafiltração Amicon (MWCO 10,000, Millipore, Alemanha) e centrifugadas a 3.500 rpm por 30 min. Após a separação, 50 µL do filtrado foi retirado e diluído em 50 µL de fase móvel para determinação da EE. As amostras foram analisadas por HPLC, conforme item 5.4.3.1. A EE foi avaliada como sendo a presença ou não de finasterida, comparando-se o cromatograma do padrão de finasterida com o cromatograma do filtrado (PALMIERI et al., 2020).

5.4.3.1 CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA (HPLC)

Para o tópico 5.4.3 e 5.8.1 empregou-se um cromatógrafo da marca Shimadzu constituído por sistema de eluição binário modelo LC-20AT e detector UV-Vis modelo SPD-20A. Duas soluções foram empregadas para viabilizar a separação cromatográfica. A fase denominada de "A" foi composta por acetonitrila e a fase denominada de "B" consistiu de água. Todos os solventes empregados são de grau espectroscópico. As fases foram

previamente desgaseificadas em ultrassom da marca Branson modelo 1510 com o auxílio de um micro aspirador modelo 5005 da marca Nevani. Utilizou-se uma coluna Supelco ODS (250 mm x4,6 mm, 5 µm). Empregou-se um gradiente linear no qual a concentração de B variou de 10% em 0,01 min para 80% em 15 min. Posteriormente, a concentração de B variou de 80% em 15 min para 100% em 20 min. Finalmente, a concentração de B foi mantida em 100% por 7 min. O fluxo empregado foi de 1,0 mL/min e os comprimentos de onda avaliados foram 245 nm e 254 nm respectivamente. O padrão de finasterida foi solubilizado em metanol.

Para os tópicos 5.5 e 5.8.2 a determinação quantitativa de finasterida foi realizada utilizando um HPLC da marca Shimadzu LC-20AT, equipado com um detector UV SPD-10A, com um sistema de software integrado por uma interface CBM-20A e um loop de amostra do injetor Rheodyne de 20 µL (Shimadzu Italia s.r.l., Milão, Itália). Foi empregada uma coluna C8 de fase reversa com porosidade de 100 Å e tamanho de partícula de 5 µm (Luna 250x4,6 mm, Phenomenex, Torrance, CA, EUA). Fluxo de 1,0 mL/min com pressão de aproximadamente 83 kgf, sistema isocrático de CH₃CN:CH₃OH:H₂O na proporção de 20:40:40. A finasterida foi detectada em 210 nm, e seu tempo de retenção foi de 10,7 minutos nestas condições. A quantidade de fármaco nas amostras foi determinada comparando com curvas padrões externas apropriadas geradas pela adição de quantidades crescentes de finasterida a solução tampão fosfato (PBS) isoladamente, ou em combinação com conjuntos de matrizes em branco (fita adesiva ou pele), para verificar potenciais interferências nos cromatogramas.

Para o tópico 5.9 a mesma metodologia foi empregada com uma pequena diferença. Em vez de utilizar uma coluna C8, foi utilizada uma coluna C18, enquanto as demais condições permaneceram inalteradas. As curvas de calibração foram obtidas aplicando análise de regressão linear de mínimos quadrados aos dados experimentais usando o software Prism 8 (GraphPad Software Inc., CA)

5.4.4 Estabilidade da suspensão

As amostras de CLN (n=3) foram armazenadas sob refrigeração (4 °C) e em temperatura ambiente (25 °C) por 180 dias e avaliadas físico-quimicamente quanto ao tamanho, Pdl e potencial Zeta nos tempos 0 (preparo) e 180 dias de armazenamento.

5.5 CINÉTICA DE LIBERAÇÃO CONTROLADA

O teste para avaliação da liberação da finasterida pelas nanopartículas foi realizado com sacos de diálise usando membrana de celulose de 3,5 kiloDaltons (MWCO:3500; Spectra/Por 3 Membrane, Spectrum Medical Industries Inc., Houston, EUA) selados em ambos os lados, preenchidos com 1 mL de formulação. Os sacos foram colocados em 20,0 mL de fase receptora simulando condições fisiológicas, solução tampão fosfato (PBS) pH 7,4 mantida a 37°C e agitada a 20 rpm. Em intervalos de tempo predeterminados (15, 30, 45 minutos e 1, 1,5, 2, 2,5, 3, 4, 5, 6, 7, 23 e 24 horas) 1,0 mL de solução tampão foi retirado e substituído por PBS fresco para manter as condições *sink* (condições de dissolução). A quantidade de finasterida presente na fase receptora foi determinada por HPLC (GOMES et al., 2014).

5.6 MOLHABILIDADE E ÂNGULO DE CONTATO

A molhabilidade das dispersões de Pluronic® e formulações de CLN na superfície cutânea foi expressa em função do ângulo de contato entre um filme hidrolipídico artificial e a tangente na interface líquido-ar no ponto de contato de uma gota da formulação. Neste estudo, as diferenças de afinidade entre as formulações de CLN e o filme hidrolipídico artificial (FHA) ao longo do tempo após a aplicação também foram investigadas medindo a variação do ângulo de contato em intervalos de tempo predeterminados.

5.6.1 Preparação do filme hidrolipídico artificial

O filme hidrolipídico artificial (FHA) foi obtido pela mistura de sebo artificial e suor artificial na proporção 1:1 a 60°C (STEFANIAK, A., HARVEY, C., 2006) até que as duas fases estejam emulsionadas. A composição do suor artificial é mostrada na Tabela 1 e foi preparada conforme relatado por Villegas et al., 2019 de acordo com o padrão do Instituto Nacional de Ciências da Saúde (NIHS 96-10), adicionando 0,1% de glicina para imitar a composição natural do suor, que inclui também aminoácidos. Após completa solubilização dos componentes em água purificada, o pH foi ajustado para 4,7 por adição de hidróxido

de sódio 1M. Os sebos artificial e humano foram formulados com base nas composições descritas por SATYANARAYANA e GUANG 2007 e SPANGLER et al., 1967. As respectivas composições estão resumidas na Tabela 1. Para o preparo, os componentes do sebo artificial foram aquecidos a 60°C em banho-maria até a fusão completa. Após a preparação, quantidades apropriadas de FAH foram colocadas em poços modificados adequados para que a superfície ficasse plana e uniforme. A espessura obtida foi de 0,57±0,02 mm.

Tabela 1- Composição do suor artificial segundo Villegas et al., 2019, e do sebo artificial segundo SATYANARAYANA e GUANG 2007 e SPANGLER et al., 1967.

Composição do suor artificial		Composição do sebo artificial	
Excipientes	% (w/w)	Excipientes	% (w/w)
Água Deionizada	93,90	Esqualeno	15,00
Cloridrato de Sódio	2,00	Óleo de oliva	10,00
Ácido láctico	1,50	Óleo de Coco	1,4
Ureia	0,50	Ácido oleico	7,4
Ácido acético	0,25	Ácido Palmítico	5,0
Cloridrato de Amônio	1,75	Colesterol	23,5
Glicina	0,10	Vaselina	7,5
		Óleo de Abacate	37,5

Fonte: o autor 2023

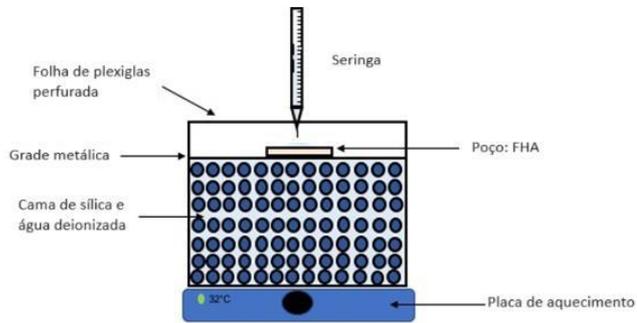
5.6.2 Mensuração do ângulo de contato

As medições do ângulo de contato estático (θ) foram realizadas usando um sistema de medição de ângulo de contato óptico OCA 15 (DataPhysics Instrument, Filderstadt, Alemanha), composto por uma câmera de vídeo CCD de alta resolução e uma lente com zoom de seis vezes com foco integrado. As imagens foram gravadas e analisadas pelo software SCA 20. O método da gota séssil, que consiste em colocar um volume conhecido de formulação sobre a superfície sólida, foi aplicado utilizando uma agulha com diâmetro externo de 0,52 mm e diâmetro interno de 0,26 mm.

Para evitar a evaporação das gotas ao longo do tempo, foi projetado o sistema ilustrado na Figura 10. Consiste em uma caixa de vidro preenchida pela metade com esferas de sílica imersas em água deionizada e fechada com uma folha de plexiglas perfurada para permitir a entrada da agulha da seringa utilizada pelo instrumento. O sistema foi mantido a temperatura controlada de 32°C e então foi adicionada água para saturar a

câmara com umidade. Para realizar as medições, os poços com FHA preparados foram colocados sobre uma grade metálica dentro do sistema fechado.

Figura 10 – Ilustração esquemática da câmara fechada para evitar a evaporação e manter a temperatura durante as medições do ângulo de contato.



Fonte: o autor 2023

5.7 CITOTOXICIDADE

A viabilidade celular foi avaliada através do método de MTT (brometo tiazolil azul de tetrazólio). O MTT é um sal tetrazólio de cor amarela, que é reduzido a formazan, de coloração azulada, pela atividade oxidativa das células, funcionando como um indicador da função mitocondrial e, por conseguinte, da viabilidade celular. Linhagens de células de fibroblastos e queratinócitos humanos foram cultivadas em placas de 96 poços com densidade celular de 5×10^4 células/mL, com volume de 100 μ L por poço. Poços em sextuplicata foram tratados com os CLN e os controles em concentrações que variaram entre 6,25 a 100 μ M de finasterida. As placas foram incubadas a 37 °C com 5% de CO₂. Após 24 h, o meio foi removido, e uma alíquota de 90 μ L de meio de cultura DMEM com 10 μ L de solução de MTT (5 mg/mL) foi adicionada seguida de um período de incubação de 3 h a 37 °C. O precipitado de formazan formado foi dissolvido em 100 μ L de dimetilsulfóxido (DMSO) e a absorbância foi lida a 570 nm utilizando um leitor de microplacas. Os controles

contendo apenas meio de cultura foram considerados como 100% de viabilidade celular (MOSMANN, 1983).

5.8 PERMEAÇÃO CUTÂNEA EX-VIVO

5.8.1 Pele humana

Amostras de pele humana excisadas da região abdominal de paciente que realizou cirurgia de abdominoplastia foram obtidas para a realização do estudo. A pele foi coletada imediatamente após a cirurgia e checada visualmente para a garantia de que estava íntegra a olho nu e inalterada pelas condições de remoção cirúrgica. Imediatamente ao chegar no laboratório, a gordura subcutânea e o tecido conectivo foram removidos com o auxílio de bisturi cirúrgico. A pele foi então lavada com água corrente, embrulhadas em Parafilm® (Pechiney Plastic Packaging Company, EUA) e papel alumínio e armazenada a -80 °C até sua utilização (período de armazenamento inferior a 1 mês). Para os experimentos, a pele foi utilizada íntegra em sua espessura (*full thickness*). Este protocolo segue o Código de Ética da Associação Médica Mundial (Declaração de Helsinki) e foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos (CEP) da Universidade Federal de Juiz de Fora (ANEXO 1).

5.8.2 Estudo de permeação cutânea ex vivo em pele humana e de orelha de porco

O estudo de penetração cutânea em pele humana foi realizado no equipamento de difusão vertical (célula de Franz). Os discos de pele serão posicionados entre os compartimentos doador e receptor com o EC superiormente. O compartimento receptor foi preenchido completamente com o meio receptor, o qual permanecerá em temperatura constante de 32 ± 2 °C e agitação constante a 600 rpm, exceto no período de coleta. Os discos de pele ficaram 30 min em contato com o meio receptor para equilíbrio da temperatura, e após este período uma alíquota de 200 µL de CLN contendo finasterida ou não, foi aplicada na superfície da pele. Após 24 horas, a solução receptora foi coletada e enviada para análise em HPLC (TEERANACHAIDEKUL et al., 2008).

A pele da orelha suína, utilizada como modelo, foi tratada conforme descrito em Tampucci et al., 2022. O pêlo do porco foi removido e a pele (área de permeação disponível: 1,23 cm²) foi colocada nas células de Franz[®] com o estrato córneo voltado para o compartimento doador. A fase doadora consistiu em CLN-FNS⁰⁷, CLN-FNS¹⁴ ou CLN-FNS²⁸. A fase receptora composta por PBS contendo azida de sódio 0,003% (p/v) para prevenir o crescimento bacteriano. A solução nas células foi mantida a 37°C e agitada a 600 rpm, e retiradas automáticas de 5 mL do compartimento receptor foram realizadas às 4, 8, 12, 16, 20 e 24 horas de ensaio e substituídas pelo mesmo volume de fluido fresco, a fim de manter as condições durante todo o estudo.

Ao final dos experimentos de permeação, a pele foi coletada e tratada conforme procedimento relatado e validado em estudo anterior (TAMPUCCI et al., 2014). Resumidamente, a pele foi removida das células de difusão, enxaguada com água destilada para remover qualquer excesso de formulação da superfície e suavemente limpa com toalhetes de algodão. Posteriormente, os espécimes de pele foram colocados em um aparelho customizado delimitando a superfície exposta ao medicamento e o estrato córneo foi removido pela técnica de *tape stripping* (TAMPUCCI et al., 2014, 2022).

Fitas adesivas (Tesa N. 5529; Kristall-Klar, Hamburgo, Alemanha) de comprimento uniforme foram aplicadas sequencialmente na pele, garantindo pressão uniforme para obter contato íntimo entre a fita e a pele. A primeira fita foi descartada, pois representa apenas material não absorvido, enquanto as 25 fitas subsequentes foram cuidadosamente colocadas em frascos de acordo com a seguinte sequência: 2; 3-5; 6-9; 10-13; 14-16; 17-21; 22-26. Todos os frascos foram pesados antes e depois da extração.

Após a remoção das 25 tiras de fita, uma gota de cola de cianoacrilato foi aplicada na área da pele e sobre ela foi colocada uma fita adesiva, com leve pressão. Após 10 min, o cianoacrilato polimerizou e a tira foi rapidamente removida em um único movimento, prendendo os moldes dos folículos capilares. A amostra derivada da biópsia de pele com cianoacrilato também foi colocada em um frasco. Em seguida, foram adicionados 5 mL de etanol a cada frasco, que foi então submetido à sonicação por 10 minutos e centrifugação (15 min a 4000 rpm). Aliquotas do sobrenadante de todos os frascos foram então retiradas para quantificação da FNS por HPLC, conforme descrito na seção 5.4.3.1

A terceira etapa deste processo envolveu a recuperação do SNF da pele residual (epiderme e derme viáveis). Para isso, a pele suína foi cortada em pequenos pedaços, colocada em um frasco, adicionada de 4 mL de solução aquosa contendo dodecilsulfato de

sódio a 2% e agitada por 24 horas. Posteriormente, foram adicionados 2 mL de metanol e deixados em agitação por mais uma hora. Em seguida, 200 µL de cada frasco contendo as digestões cutâneas foram coletados em tubos Eppendorf para serem submetidos a um processo de secagem a vácuo por 12 horas. As amostras secas resultantes foram ressuspensas em 200 µL adicionais de metanol, sonicadas por 10 minutos, centrifugadas (15 min a 4000 rpm) e finalmente analisadas por HPLC (MONTI et al., 2014).

5.9 TESTES *IN VIVO*

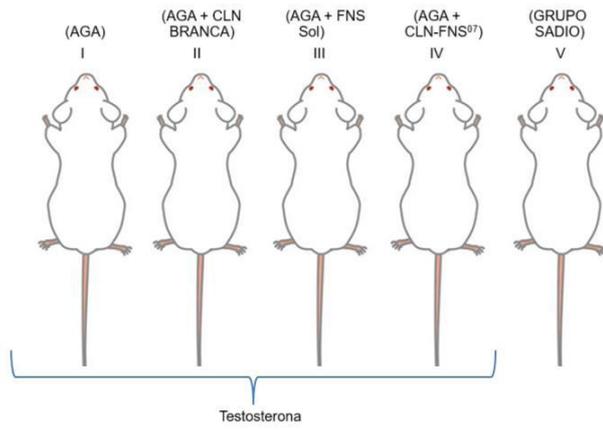
Para os estudos *in vivo*, 25 ratos albinos machos da linhagem Wistar (*Rattus norvegicus*) com idades entre oito e doze semanas, pesando entre 120 e 150 gramas, foram divididos em cinco grupos. A AGA foi induzida nos animais seguindo o relato de UPADHYAY, GUPTA, DIXIT, 2012, com pequenas modificações. Os animais foram alimentados *ad libitum* e submetidos a ciclos de 12 horas de escuridão e luz. Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA/UFJF) sob protocolo número 22/2022 (ANEXO 2). Resumidamente, a AGA foi induzida nos animais pela administração subcutânea de testosterona (4 mg/kg/dia) na área dorsal do primeiro ao 28º dia (PANDIT; CHAUHAN; DIXIT, 2008; NOUBARANI et al., 2014; DHANOTIA et al., 2011; MAITRA; GOYAL; RATH, 2017).

Os animais do primeiro grupo (Grupo I) serviram como controle positivo para AGA, recebendo apenas testosterona, enquanto o Grupo V foi o controle negativo (animais saudáveis) e não receberam nenhuma administração de testosterona. No 6º dia, foram retirados os pêlos de uma área de 3 cm² do dorso com auxílio de máquina de cortar pêlos. Os demais grupos a serem descritos receberam testosterona e foram tratados conforme a seguir descrito e ilustrado na Figura 11. O tratamento foi realizado através da administração tópica de 0,5 mL das formulações duas vezes ao dia: Grupo I e Grupo V receberam solução salina; O Grupo II recebeu nanopartículas brancas; o Grupo III recebeu finasterida em solução hidroalcoólica (FNS Sol), 10:1 p/p solução hidroalcoólica e finasterida, respectivamente; O Grupo IV recebeu CLN-FNS⁰⁷, na proporção de 10:1 m/m de manteiga de semente de *Passiflora edulis* e finasterida, respectivamente (MATIAS, MALLOY, ORENTREICH, 1989; UPADHYAY et al., 2012; FU et al., 2021).

Uma vez por semana, todos os animais foram pesados individualmente para monitorar qualquer variação de peso durante o tratamento. Fotografias foram tiradas para documentar o progresso da restauração capilar. No 29º dia, foi realizada a eutanásia com solução injetável composta por cetamina 10% e xilazina 2%, administrada com base no peso dos animais e seguindo as orientações do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal. Amostras de sangue foram retiradas, centrifugadas a 1000 rpm e o sobrenadante foi coletado e imediatamente submetido ao HPLC para avaliar possível presença de finasterida sistêmica, conforme descrito na seção 5.4.3.1

Após a eutanásia, a área de pele tratada foi removida e cortes transversais de 4 µm foram corados com eosina e hematoxilina para avaliar inflamação e crescimento de pelos. As seções não seriadas foram analisadas digitalmente em toda as suas extensões. Os critérios histomorfológicos descritivos avaliados incluíram: presença de fibrose no tecido conjuntivo ao redor da bainha epitelial externa; a presença, localização e caracterização celular do infiltrado inflamatório; pseudohiperplasia das glândulas sebáceas e a degeneração basofílica focal da membrana vítrea em folículos anágenos ativos. A profundidade do folículo para análise de possível ascensão foi avaliada quantitativamente, com foco na região do bulbo e na área germinativa ativa (fase anágena) na derme profunda e no tecido adiposo hipodérmico. Os dados obtidos foram reportados como médias aritméticas.

Figura 11 - Ilustração esquemática dos grupos de animais utilizados no modelo de indução e tratamento da AGA



Fonte: o autor 2023

5.10 ANÁLISE ESTATÍSTICA

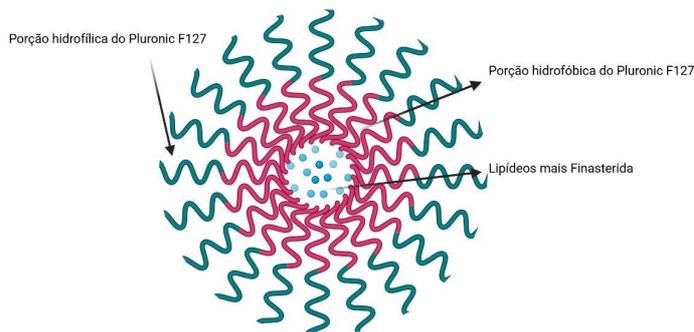
Todos os experimentos serão analisados através da Análise de Variância (ANOVA), seguido do pós-teste de Tukey para comparações grupos, usando o *software* PRISM 8.0 (GraphPad, EUA). A significância estatística será representada como * para $p < 0,05$.

6 RESULTADOS

6.1 PREPARAÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS

Carreadores de lipídios nanoestruturados contendo finasterida (Figura 12) foram desenvolvidos para facilitar a entrega do ativo após administração tópica, visando a melhora da eficácia e redução dos efeitos adversos. Para este fim, optamos por usar composição lipídica naturalmente equilibrada de manteiga de sementes de *Passiflora eludis* como núcleo sólido, estabilizado por copolímero.

Figura 12 - Estrutura esquemática do CLN carregado com finasterida.

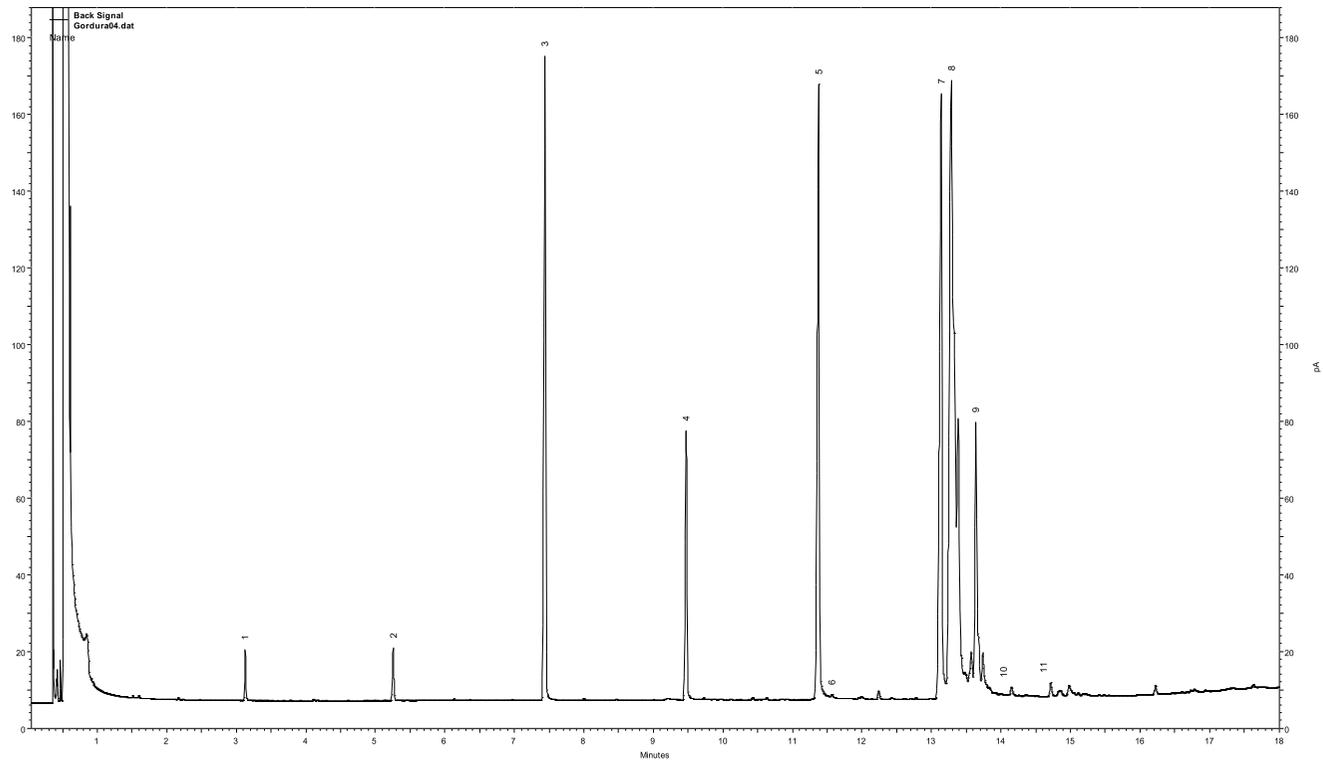


Fonte: Autor, 2021 (Criada com BioRender.com)

6.2 CARACTERIZAÇÃO DOS ÁCIDOS GRAXOS

Em primeiro lugar, a análise CG-FID foi realizada usando lipídios extraídos das sementes de *Passiflora eludis* para caracterizar sua composição em ácidos graxos. A Figura 13 mostra o cromatograma obtido após a análise. Tempo de retenção e concentração de cada compostos são mostrados na Tabela 2. É importante notar que os ácidos graxos presentes em maior concentração são aqueles de estrutura C18:1 (38,7%).

A composição da manteiga da semente de *Passiflora edulis* tem impacto direto no seu ponto de fusão (42,5 °C), conforme o número de insaturações e comprimento da cadeia de carbono dos ácidos graxos que compõem o material (SANTOS et al., 2018). Assim, quanto menos insaturação e mais longa a cadeia, maior será o ponto de fusão (RUSTAN; DREVN, 2005). Em nosso material, a composição dos ácidos graxos o torna com alto ponto de fusão e é apresentado na fase sólida na temperatura ambiente (Tabela 2).

Figura 13 - Cromatograma da manteiga de semente de *Passiflora eludis*

Fonte: o autor 2021

Tabela 2: Perfil de ácidos graxos (porcentagem)

Pico	Acido Graxo	RT min	Manteiga Área
1	C8:0	3.13	0.7
2	C10:0	5.26	0.9
3	C12:0	7.44	12.2
4	C14:0	9.47	4.9
5	C16:0	11.38	13.6
6	C16:1	11.57	0.3
7	C18:0	13.14	15.8
8	C18:1	13.28	38.7
9	C18:2	13.64	10.6
10	C18:3	14.15	0.2
11	C20:0	14.72	0.3
	outros		1.7

Fonte: o autor 2021

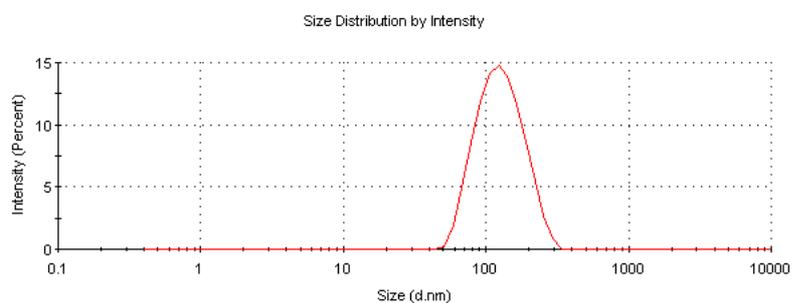
Legenda: RT (min) = tempo de retenção em minutos; A área está relacionada com a área do pico obtida na CG.

6.3 CARACTERIZAÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS

Para a caracterização inicial dos CLN-FNS⁰⁷, o tamanho das partículas e a carga superficial foram medidas e os resultados mostraram que as nanopartículas carregadas com finasterida tem diâmetro hidrodinâmico e índice de polidispersão de $124,5 \pm 1,07$ nm e $0,143 \pm 0,02$ respectivamente (Figura 14). Os valores de polidispersão sugerem que as nanopartículas na suspensão são distribuídas uniformemente. Após 30 dias de armazenamento, os CLN apresentaram diâmetro hidrodinâmico de 132,7 nm e Pdl de 0,113, sugerindo estabilidade da formulação. Valores negativos de potencial Zeta ($-33,1 \pm 2,34$) foram obtidos, o que provavelmente se deve à presença e organização dos ácidos graxos nas nanopartículas. Este resultado também implica que a formulação pode ser

estável por repulsão iônica além do efeito estérico do polietilenoglicol (PEG) na superfície dos CLN.

Figura 14 - Distribuição de tamanho das CLN-FNS⁰⁷ carregadas com finasterida por intensidade.



Fonte: o autor 2019

Posteriormente três formulações distintas de carreadores lipídicos nanoestruturados contendo finasterida (CLN-FNS) foram preparadas e desenvolvidas variando a concentração do copolímero. Após realizar minuciosa caracterização físico-química, observamos que os parâmetros (Tabela 3) atendem aos critérios necessários para aplicação biomédica em termos de tamanho (entre 70 e 300nm), Pdl e potencial Zeta.

Tabela 3: Parâmetros de caracterização das formulações CLN-FNS^{07,14,28}

	CLN-FNS ⁰⁷	CLN-FNS ¹⁴	CLN-FNS ²⁸
Diâmetro hidrodinâmico (nm)	124,5	95,23	117,1
Pdl	0,143	0,206	0,275
Potencial Zeta (ζ) (mV)	-33,1	-17,1	-20,7

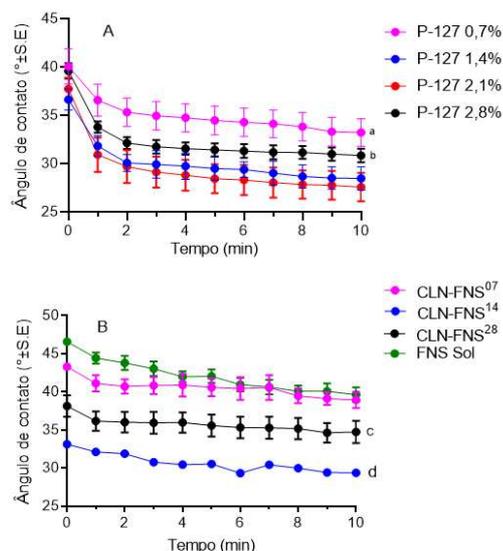
Fonte: o autor 2021

6.4 AVALIAÇÃO DA MOLHABILIDADE

Primeiramente, avaliamos a influência de diferentes concentrações de Pluronic-F127 (P-127) como dispersão aquosa nas medidas de ângulo de contato (θ) para a formulação de CLN. Para todas as dispersões de P-127 testadas, foi observada uma rápida diminuição nos valores de θ ao longo do tempo, que então se estabilizam em valores entre 25° e 35° (Fig. 15A). Além disso, foram encontradas diferenças estatisticamente significativas quando a formulação de 0,7% foi comparada com todas as outras dispersões de P-127. Além disso, 2,8% também foram significativamente diferentes de 2,1%.

Considerando os resultados obtidos no ângulo de contato das dispersões de Pluronic (Fig. 15A), a concentração de 2,1% foi eliminada por apresentar os menores valores de ângulo de contato, e seus valores de molhabilidade não foram significativamente diferentes daqueles obtidos com o 1,4 % de dispersão de P-127. Assim, os CLN-FNS foram formulados com concentrações crescentes de surfactante polimérico, 0,7, 1,4 e 2,8%.

Figura 15 - Variação temporal dos valores do ângulo de contato das dispersões (A) e formulações CLN-NFS (B) em diferentes concentrações de P-127.



Fonte: o autor 2022

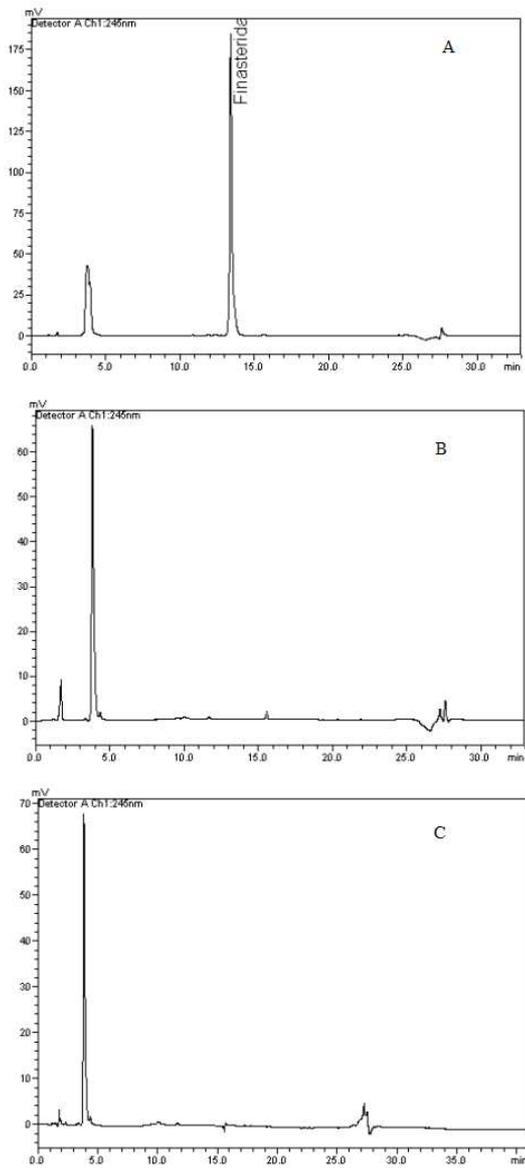
Nota: A: ^a indica diferença estatística de todas as outras dispersões de P-127 b indica diferença estatística entre P-127 1,4% e P-127 2,1%. B: ^c e ^d indicam diferença estatística de todos os grupos ($p < 0,0001$). Todos os experimentos foram realizados em triplicata.

Em relação às formulações de CLN contendo o fármaco (Fig. 15B), o CLN-FNS⁰⁷ não foi diferente da própria solução de FNS. Por outro lado, o CLN-FNS⁰⁷ foi estatisticamente diferente do CLN-FNS¹⁴ e do CLN-FNS²⁸. Do ponto de vista da capacidade de molhabilidade, as formulações CLN-FNS apresentam o mesmo comportamento que as dispersões P-127 mesmo que a variação ao longo do tempo seja menos evidente. Os ângulos de contato tendem a estabilizar em valores entre 41° e 20°. Além disso, a adição de 1,4% de P-127 é a que tem maior influência na molhabilidade e quando a concentração atinge 2,8% foi observado aumento nos valores de θ .

6.5 EFICIÊNCIA DE ENCAPSULAÇÃO E ESTABILIDADE

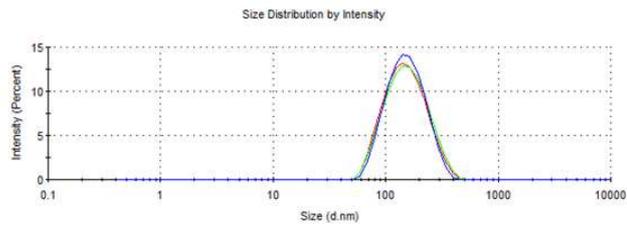
A eficiência de encapsulação (EE) foi avaliada 15 e 45 dias após a preparação das CLN. Inicialmente foi realizado a corrida de HPLC contendo apenas o padrão de finasterida, a fim de se determinar o tempo de retenção que foi de 13,5 min (Figura 16A). Posteriormente, foi realizada a determinação do conteúdo de finasterida na fase aquosa da suspensão. Nenhuma finasterida livre foi detectada nas amostras em 15 e 45 dias de incubação (Figura 16B e 16C). Este resultado sugere que toda a finasterida foi incorporada nas CLN e não houve liberação descontrolada durante o período de armazenamento a 4 °C em até 45 dias. Além disso, as nanopartículas permaneceram estáveis com relação ao tamanho e PDI mesmo após 180 dias de armazenamento (Figura 17).

Figura 16 - Cromatogramas do padrão de finasterida (A) e CLN em 15 dias (B) e 45 dias (C) de armazenamento a 4°C.



Fonte: o autor 2019

Figura 17 - Distribuição de tamanho das CLN carregadas com finasterida por intensidade após 180 dias

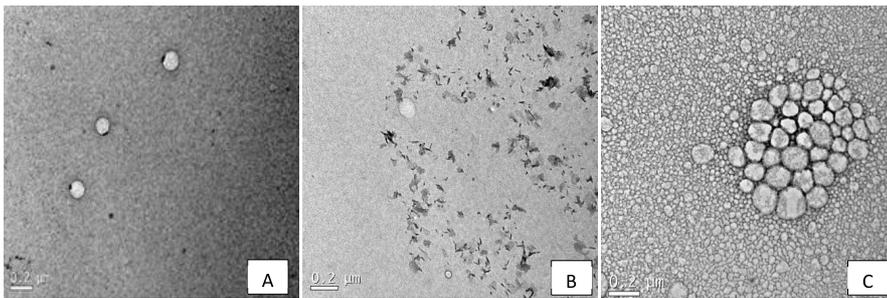


Fonte: o autor 2021

6.6 MICROSCOPIA DE TRANSMISSÃO ELETRÔNICA (MET)

As imagens vistas nas Figuras 18, A, B e C, estão relacionadas respectivamente ao CLN-FNS⁰⁷, CLN-FNS¹⁴ e CLN-FNS²⁸. Na Figura 13A é possível observar partículas bem distribuídas com tamanho em torno de 0,2 μm . Na figura representativa 13B, nanopartículas arredondadas são observadas entre os detritos, enquanto na última imagem (13C) é mostrado um agregado de nanopartículas com diversos tamanhos.

Figura 18 - Imagens MET de CLN.



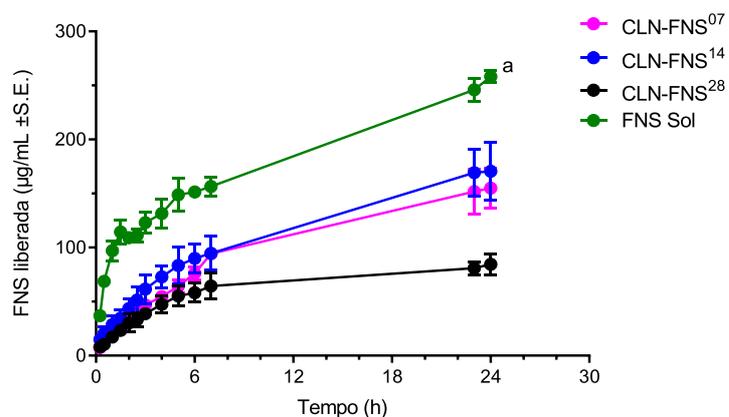
Fonte: o autor 2022

Nota: (A) representa CLN-FNS⁰⁷ (B) CLN-FNS¹⁴ e (C) CLN-FNS²⁸. Escala = 0,2 μm .

6.7 CINÉTICA DE LIBERAÇÃO CONTROLADA

O resultado representado na Figura 19 mostra os perfis de liberação da FNS das formulações de CLN testadas, através da quantificação de FNS na fase receptora por HPLC. Pode-se notar que CLN-FNS⁰⁷ e o CLN-FNS¹⁴ apresentaram perfis semelhantes, sem diferenças significativas na concentração em diferentes momentos de liberação entre essas duas formulações. A liberação de FNS dos carreadores é notavelmente mais lenta em comparação com a solução alcoólica de referência (FNS Sol), uma diferença que demonstra significância estatística em relação a todas as outras formulações. Quando a concentração do polímero é aumentada para 2,8%, a liberação de FNS é ainda mais lenta devido à maior viscosidade do veículo.

Figura 19 - Perfis de liberação da FNS a partir de formulações CLN-FNS.



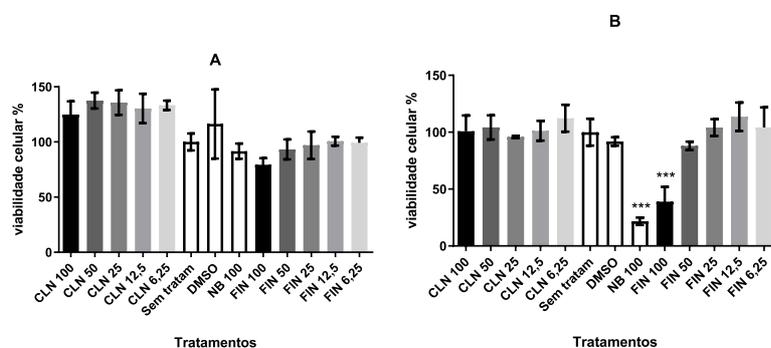
Fonte: o autor 2022

Nota: ^a indica diferença estatística de todos os grupos. Todos os ensaios foram realizados em triplicata.

6.8 CITOTOXICIDADE

A formulação de CLN contendo finasterida não apresentou citotoxicidade contra fibroblastos e queratinócitos (Figura 20). Analisando os resultados em fibroblastos (células L929), nenhuma diferença estatística foi encontrada ao comparar o tratamento com os CLN contendo finasterida, finasterida livre e outros controles, em várias concentrações. Os resultados do tratamento da formulação em queratinócitos (células HaCat) mostra redução de viabilidade das células tratadas com finasterida na concentração mais alta (100 μM da formulação o que equivale a uma dose de 0,09 μg de finasterida) assim como de possível citotoxicidade do nanocarreador em volume equivalente à concentração mais alta do ativo. De forma notável, a formulação (CLN contendo finasterida) em concentração mais alta (100 μM) não apresentou redução de viabilidade. Desta forma, é possível verificar que a nova formulação contendo finasterida não interfere na viabilidade de fibroblastos e queratinócitos, e pode ser aplicada nos futuros testes para uso tópico na AGA.

Figura 20 - Viabilidade celular dos fibroblastos (A) e queratinócitos (B), após tratamento com CLN e controles.



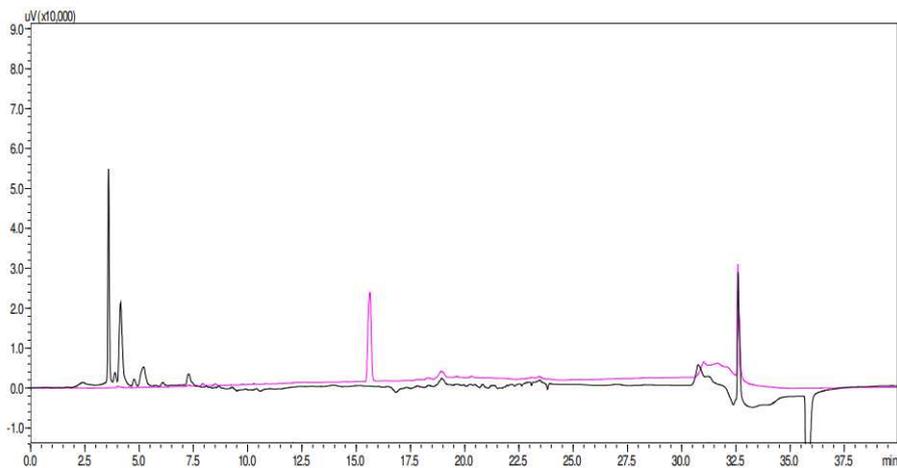
Fonte: o autor 2019

Nota: CLN: carreadores lipídicos nanoestruturados contendo finasterida; NB: nanopartícula branca; FIN: finasterida livre. Números indicam a concentração em $\mu\text{g}/\text{mL}$ para cada tratamento. Dados apresentados como média \pm DP (***) $p < 0,01$.

6.9 PERMEAÇÃO CUTÂNEA *EX-VIVO* EM PELE HUMANA E EM PELE DE ORELHA DE PORCO

A solução receptora do teste de permeação em pele humana não identificou a presença em nenhuma das amostras coletadas conforme demonstrado na Figura 21. O ensaio foi realizado em triplicata.

Figura 21 - Comparação do perfil cromatográfico da amostra CLN-FNS⁰⁷ com o perfil da solução padrão de $9,0 \times 10^{-5}$ mg/mL (cor Rosa)



Fonte: o autor 2021

Todas as amostras coletadas no teste de permeação foram analisadas por HPLC para avaliar a quantidade de finasterida na fase receptora, além da quantificação em cada camada da pele. Vale ressaltar que não foi detectada finasterida nas amostras coletadas na fase receptora, de 4 a 24 horas. Em relação às camadas da pele, a Tabela 4 mostra a quantificação da finasterida de todos os ensaios de *tape stripping* realizados com diversas formulações, medidos ao final do período de ensaio de 24 horas. A tabela também inclui a quantidade de FNS detectada no folículo piloso, bem como a quantidade recuperada após digestão cutânea.

Resumidamente, para o CLN-FNS⁰⁷, a quantidade total média de finasterida encontrada foi de $0,18 \pm 0,12$, $0,16 \pm 0,13$ e $20,24 \pm 7,63$ $\mu\text{g/g}$, no estrato córneo, no folículo capilar (biópsia de cianoacrilato) e pele residual após digestão, respectivamente. Para o CLN-FNS¹⁴, as quantidades encontradas foram $0,52 \pm 1,31$ e $16,51 \pm 12,23$ $\mu\text{g/g}$, no estrato córneo e na pele residual, respectivamente, enquanto não foi observada presença de FNS no folículo capilar. Finalmente, para CLN-FNS²⁸, concentrações de FNS de $0,16 \pm 0,16$, $0,04 \pm 0,03$ e $8,45 \pm 3,14$ $\mu\text{g/g}$ foram detectadas no estrato córneo, no folículo capilar e pele residual, respectivamente.

Tabela 4: Quantidade de finasterida detectada em diferentes camadas da pele, de cada grupo de fitas, biópsia de cianoacrilato, e na pele residual após 24 horas da aplicação das formulações CLN-FNS.

	FNS ($\mu\text{g/g}$) \pm S.E.M		
	CLN-FNS ⁰⁷	CLN-FNS ¹⁴	CLN-FNS ²⁸
Fita 2	$0,267 \pm 0,047$	$1,820 \pm 1,650$	$0,363 \pm 0,127$
Fitas 3-5	$0,187 \pm 0,074$	$0,777 \pm 0,612$	$0,153 \pm 0,115$
Fitas 6-9	$0,197 \pm 0,041$	$0,070 \pm 0,035$	$0,103 \pm 0,067$
Fitas 10-13	$0,163 \pm 0,086$	$0,060 \pm 0,035$	$0,057 \pm 0,047$
Fitas 14-16	$0,087 \pm 0,032$	$0,027 \pm 0,045$	$0,097 \pm 0,082$
Fitas 17-21	$0,207 \pm 0,131$	$0,027 \pm 0,014$	$0,030 \pm 0,020$
Fitas 22-26	$0,190 \pm 0,086$	$0,013 \pm 0,006$	$0,033 \pm 0,020$
Biópsia de cianoacrilato	$0,160 \pm 0,075$	$0,00 \pm 0,00$	$0,030 \pm 0,020$
Pele Residual	$20,274 \pm 4,407$	$16,51 \pm 7,063$	$5,637 \pm 3,097$

Fonte: o autor 2022

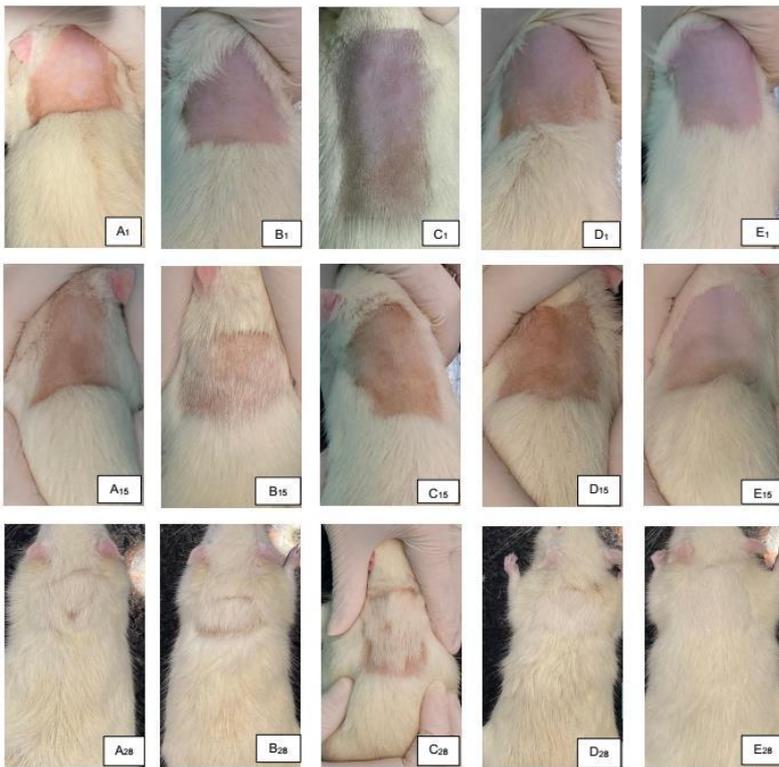
6.10 ESTUDOS *IN VIVO*

Uma condição semelhante à AGA foi induzida com sucesso em ratos machos albinos da linhagem Wistar (*Rattus norvegicus*). A Figura 22 ilustra as fotografias de ratos com AGA induzidos por testosterona tratados com CLN-FNS (Grupo IV, Fig. 22D) e controles. Macroscopicamente, não foram observados sinais de irritação cutânea ou alergia no local de aplicação das formulações em todos os grupos. As imagens representativas também mostram crescimento capilar em todos os grupos, com recuperação completa observada nos Grupos IV (tratamento CLN-FNS⁰⁷) e V (controle negativo para AGA).

A avaliação histológica cega na Figura 23 revelou que as amostras do Grupo I (controle positivo) apresentavam discreta pseudohiperplasia das glândulas sebáceas. Nos Grupos I e II, foi identificada degeneração basofílica focal da membrana vítrea em folículos ativos na derme e ocasionalmente na hipoderme (indicada pelas setas pretas), juntamente com a presença de papila folicular residual e tratos fibrosos coincidentes com o trajeto de ascensão do folículo (indicado por setas azuis). Nos Grupos III e IV (tratados respectivamente com solução hidroalcolica de finasterida e nanopartículas com finasterida ambas nas mesmas concentrações) foi observada vasodilatação cutânea profunda. A Figura 23 mostra os Grupos III e IV (representados pelas letras D e E respectivamente), exibindo bulbos foliculares profundos (indicados por setas vermelhas) com morfologia compatível com a fase anágena e, em menor proporção, o início da fase catágena, exibindo células da bainha epitelial bem estabelecidas (BERNÁRDEZ et al., 2015; STEFANATO 2010).

Avaliação microscópica por meio de estudos histológicos também foi realizada para avaliar a eficácia, referente ao número de bulbos ativos observados (Figura 24). O Grupo V (controle negativo – animais saudáveis) apresentou maior número de bulbos ativos, com diferenças estatísticas em relação a todos os outros grupos. Em seguida, o Grupo IV (CLN-FNS⁰⁷) exibiu a segunda maior pontuação. Posteriormente, o Grupo III, Grupo II e Grupo I demonstraram escores progressivamente mais baixos para bulbos ativos, com diferenças significativas quando comparados ao Grupo IV ($p < 0,001$). Além da avaliação macroscópica e histológica, foram quantificados os níveis de finasterida no sangue dos animais ao final do tratamento. A ausência de FNS no plasma dos animais tratados foi confirmada por análise por HPLC. Além disso, todos os animais exibiram ganho de massa corporal normal ao longo do ensaio.

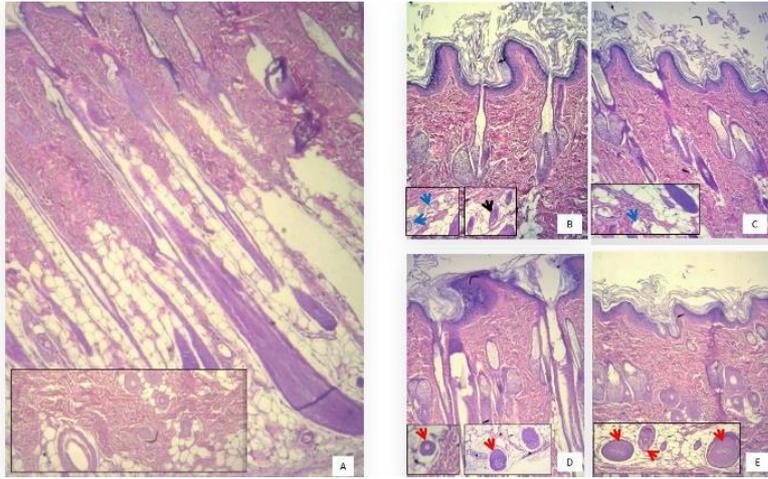
Figura 22 - Registros fotográficos do experimento.



Fonte: o autor 2023

Nota: A (grupo I - controle positivo para AGA), B (grupo II - nanopartículas em branco), C (grupo III - finasterida, FNS Sol, em solução hidroalcoólica 10:1 m/m), D (grupo IV - CLN- FNS07), E (grupo V - controle negativo). Os números que acompanham as letras indicam o dia do tratamento. A primeira linha de fotos representa animais no primeiro dia de tratamento. A segunda linha indica a segunda semana de tratamento e a última linha o último dia de experimento.

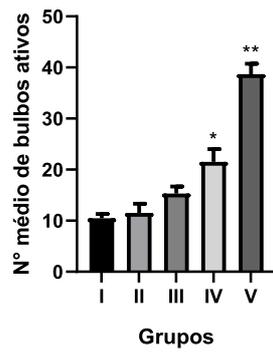
Figura 23 - Imagens capturadas aplicando 400x de ampliação.



Fonte: o autor 2023

Nota: Cortes transversais mostrando em A (grupo V - controle negativo), B (grupo I - controle positivo), C (grupo II - nanopartículas brancas), D (grupo III - solução de finasterida), E (grupo IV - CLN-FNS07).

Figura 24 - Número médio de bulbos ativos encontrados na análise histológica em cada grupo de tratamento após 28 dias de tratamento.



Fonte: o autor 2023

Nota: (\pm) SEM. *indica diferença estatística em relação ao grupo I. **indica diferença estatística em relação a todos os grupos. $p < 0,001$.

7 DISCUSSÃO

Os tratamentos existentes para alopecia androgenética são inadequados para entrega de substâncias com potencial terapêutico diretamente aos folículos capilares para resultar em crescimento capilar contínuo (SALIM; KAMALASANAN, 2020). Estes desafios estão relacionados principalmente a terapias com múltiplas doses e conseqüentemente menor adesão dos pacientes. Os efeitos adversos sistêmicos observados no tratamento oral prolongado da finasterida também é uma questão muito importante a ser levada em consideração como por exemplo a diminuição da libido e a síndrome pós-finasterida que pode persistir mesmo após ao término do tratamento. Com relação ao Minoxidil existe a mesma preocupação com relação ao uso oral prolongado em que a hipotensão postural, retenção líquida, taquicardia, pericardite e náuseas são alguns dos efeitos adversos possíveis. (VAÑÓ-GALVÁN, S. et al, 2021; GUPTA, A.; TALUKDER, M.; BAMIMORE M, 2022).

Khan et al (2018) revisaram em vários bancos de dados, décadas de publicações sobre formulações contendo finasterida incorporada em veículos diferentes com foco em avaliar a entrega, penetração e permeação. Dentre as diversas alternativas a que se mostrou mais promissora, com melhores resultados foram as formulações que utilizaram o polímero Poloxamer P407[®]. O motivo para tal desempenho reside na maior concentração de surfactantes nas nanopartículas, o comportamento bifásico de liberação do ativo, a característica hidrofóbica e não iônica de tal polímero, o que conseqüentemente aumenta a permeação, através da modificação das propriedades da bicamada lipídica das células e fluidificação da camada lamelar da pele (KHAN et al., 2018).

Em 2017, pesquisadores portugueses prepararam e testaram formulações contendo nanopartículas (NP) carregadas com finasterida. Obtiveram nanocarreadores, utilizando o polímero Pluronic[®] com tamanho variando entre 300 nm, eficiência de encapsulação de 79% e valores de potencial Zeta negativos. A microscopia eletrônica mostrou que as NP exibiram um formato esférico e superfície lisa. Testes *in vitro* demonstraram que a finasterida foi liberada de forma lenta e gradual num processo que levou aproximadamente três horas. Além disso as formulações não apresentaram citotoxicidade e testes em humanos mostraram que todos os excipientes usados nas preparações não causaram reações adversas (ROQUE et al., 2017).

Outro estudo realizado em 2014 apresentou resultados semelhantes ao incorporarem minoxidil e finasterida em diferentes tipos de NP. Os autores ressaltaram que as NP lipídicas podem aumentar o teor de água na superfície da pele devido a suas propriedades oclusivas, favorecendo a penetração das substâncias que estão no seu interior na pele. Tais pesquisadores obtiveram NP com tamanho aproximado de 200 nm e índice de polidispersão abaixo de 0,250. Testes de estabilidade também demonstraram que a eficiência de encapsulação das formulações permaneceram inalteradas após 28 dias de armazenamento. Porém o grupo observou que apenas uma quantidade insignificativa de finasterida foi capaz de atravessar a pele e previamente de ser liberada das NP, justificando-se pela natureza lipofílica desta substância (GOMES et al., 2014).

Tripathi *et al*/ também desenvolveram nanopartículas lipídicas estáveis com perda de conteúdo de fármaco menos de 1% após 120 dias de armazenamento (TRIPATHI et al., 2018). Outro estudo também demonstrou que não houve mudanças em termos de tamanho e eficiência de encapsulamento após um mês de armazenamento (GRAVERINI et al., 2018). Gonçalves *et al* observaram, em consonância com esses estudos antecedentes, estabilidade entre parâmetros como eficiência de aprisionamento, tamanho e polidispersão após um mês de armazenamento a 5 ± 3 ° C (GONÇALVES et al., 2016).

Diferentes tipos de NP podem ser utilizadas com a finalidade de incorporar substâncias para o tratamento da AGA. Cientistas brasileiros, propuseram em 2020 a utilização de NP de óxido de ferro carregadas com finasterida ou dutasterida. Apesar das características favoráveis com relação a estabilidade e eficiência de encapsulação dessas NP a aplicação para o tratamento da AGA pode ser prejudicada devido a coloração escura da formulação, evidenciando os pontos de aplicação. Apesar disso, os resultados de liberação de ambas substâncias das NP foram satisfatórias assim como a penetração (AFIUNE et al., 2020).

Os resultados preliminares mostraram que os carreadores de lipídicos nanoestruturados preenchidos com finasterida foram preparados com sucesso com lipídios naturais, apresentaram alta eficiência de encapsulação, estabilidade durante o armazenamento e citotoxicidade insignificante. O tamanho das partículas é adequado para aplicações biomédicas, considerando a via de administração tópica e entrega aos folículos capilares. De acordo com Feng, o tamanho obtido encaixa-se em um faixa desejável para atingir a derme e o folículo (FENG, 2004). Análises adicionais serão realizadas para garantir se esta formulação pode alcançar e permanecer em níveis ideais de concentração na derme, para liberação controlada de finasterida e tratamento da AGA.

Neste estudo foi desenvolvida uma formulação nanotecnológica com alta eficiência de encapsulamento, capaz de entregar e reter a finasterida na pele. A matriz lipídica sólida é composta por manteiga de semente natural que se funde sob condições específicas de temperatura. A formulação apresentou alta biodisponibilidade, permanecendo no local de ação por maior tempo que as formulações tópicas tradicionais, sem absorção sistêmica. Inicialmente preparamos, desenvolvemos, caracterizamos e avaliamos três diferentes formulações de CLN, em que aumentamos sistematicamente a concentração do polímero, a partir de 0,7% (formulação CLN -FNS⁰⁷). Notavelmente, foram observadas diferenças entre as características físico-químicas do CLN. Apesar da reprodutibilidade do CLN -FNS⁰⁷, quando a concentração do polímero foi aumentada, pequenas diferenças no tamanho e no potencial Zeta foram evidentes, e uma diferença significativa foi observada no Pdl, sugerindo um ligeiro aumento na heterogeneidade de tamanho nas formulações CLN -FNS^{14,28} (Tabela 3).

Semelhante aos estudos de Burgalassi et al., 2015 e Capra, Musitelli e Perugini 2017, todas as formulações apresentaram boa molhabilidade (Figura 15, A e B) frente ao filme hidrolipídico, mas é possível notar comportamentos distintos entre as diferentes concentrações de surfactante. Aumentar a concentração de P-127 melhora a molhabilidade; os valores de θ diminuem até certo ponto, após esse ponto a tendência inverte-se: P-127 2,8% apresenta valores de ângulo de contato mais elevados do que as dispersões P-127 em 1,4 e 2,1%. Este comportamento pode ser atribuído ao aumento da viscosidade das dispersões: a dependência do espalhamento final da viscosidade das dispersões poliméricas é um aspecto relacionado principalmente aos efeitos de dissipação viscosa (GENNES, 1985; YANG, LEONG 2002). A mesma tendência é observada nas formulações contendo o fármaco onde o CLN-FNS⁰⁷, com a menor concentração de P-127, possui capacidade umectante semelhante à do FNS Sol de referência. Isto indica que a concentração do surfactante polimérico é apenas suficiente para diminuir os valores de θ da formulação com filme hidrolipídico nos primeiros 3 minutos, após os quais os valores de θ tornam-se sobreponíveis.

As diferenças de morfologia nas imagens de TEM entre o CLN -FNS^{07,14,28} parecem ser atribuídas à duplicação da concentração do polímero que afetou a forma e o tamanho de cada formulação (Figura 18). A morfologia e o tamanho são consistentes com os resultados apresentados na seção 6.6, que destacam as variações de tamanho e Pdl entre as três formulações distintas. Considerando tamanho, Pdl e carga superficial (Tabela 3), a CLN inicial preparado alinha-se bem com o propósito da nanomedicina, permitindo a

internalização celular e liberação de conteúdo (SHARMA et al., 2020; SOHAIB et al., 2022). Notavelmente, até onde sabemos, este é o primeiro trabalho a apresentar uma CLN carreando finasterida, formulada com manteiga de semente da *Passiflora eludis*. Esta formulação apresenta várias vantagens sobre outras nanopartículas utilizadas para tratamento de AGA, incluindo facilidade de preparação, estabilidade, alta eficiência de encapsulamento, ausência de citotoxicidade (PALMIERI et al., 2020), emissão de carbono mínima e ausência de absorção sistêmica após administração tópica (SOHAIB et al., 2022; MOHAMAD et al., 2023; XIANG et al., 2023).

A proporção dos lipídeos presentes na semente da *Passiflora eludis* possui alta concentração de C18:1 representando 38,7% como demonstrado na tabela 2. A composição da manteiga tem impacto direto no seu ponto de fusão, pois o número de insaturações e o comprimento da cadeia de carbono dos ácidos graxos que compõem o material influencia diretamente nesta característica. Em nosso material, a composição de ácidos graxos o torna com ponto de fusão acima da temperatura ambiente e, portanto, apresenta-se em estado sólido. Com relação aos resultados obtidos nos testes de citotoxicidade (Figura 20), é importante notar que mesmo utilizando a concentração mais alta de FNS, não houve alteração na viabilidade das células testadas. Este importante resultado nos permitiu assegurar a segurança da formulação e prosseguir com os demais ensaios subsequentes. (PALMIERI et al., 2020),

Estudos de liberação *in vitro* demonstram uma liberação controlada compatível com o perfil de primeira ordem com uma liberação inicial rápida após a liberação sustentada (Figura 19), como já relatado em outros estudos semelhantes em que a atividade termodinâmica e a viscosidade tiveram um efeito dominante na liberação do princípio ativo (VELISSARATOU, A., PAPAIOANNOU, G. 1989; TAS et al., 2006; GOMES et al., 2014; DAS et al., 2019). Por exemplo, Velissaratou e Papaioannou (1989) encontraram uma relação inversa entre a viscosidade do veículo e a respectiva capacidade de liberação do fármaco. Na verdade, o processo de liberação de um fármaco a partir de uma formulação depende da difusão das moléculas através da matriz viscosa em meio aquoso, e esta difusão é o ponto determinante da taxa. Portanto, formulações mais viscosas liberarão FNS mais lentamente do que formulações menos viscosas (RICCI et al., 2002).

Os resultados *ex vivo* demonstraram que as formulações de CLN-FNS⁰⁷ podem penetrar nas camadas mais profundas da pele, atingindo o folículo folicular. Esta característica desejável está alinhada com os objetivos iniciais e é consistente com

resultados reprodutíveis mostrados pelo nosso grupo (PALMIERI et al., 2020) e por outros pesquisadores (MADHESWARAN et al., 2017; SOHAIB et al., 2022). A finasterida da CLN-FNS⁰⁷ foi encontrada nos folículos, mas também permaneceu na superfície da pele, possivelmente devido à alta viscosidade da formulação. Notoriamente, a análise por HPLC demonstrou que a finasterida não foi encontrada no meio receptor em nenhum dos tratamentos, indicando que nenhuma das formulações promoveu a permeação do fármaco. Isto é de extrema importância, uma vez que as formulações são concebidas para entregar o fármaco apenas aos folículos, a fim de evitar a distribuição sistêmica e outros efeitos indesejados. Com base nestas descobertas, a formulação CLN-FNS⁰⁷ foi escolhida para prosseguir na sequência de experimentos. Avaliamos a viabilidade celular de fibroblastos e queratinócitos tratados com CLN-FNS⁰⁷ (PALMIERI et al., 2020). A formulação foi considerada segura para as células testadas e permitiu-nos avançar para estudos *in vivo*.

A eficácia *in vivo* da formulação selecionada, CLN-FNS⁰⁷, foi primeiramente analisada através da observação macroscópica do crescimento capilar (Figura 22). Em todos os grupos, a área calva raspada ficou coberta com pelos um pouco mais finos que os originais após o tratamento (28 dias). Não foi observada vermelhidão, edema ou qualquer outra característica inflamatória visível na pele no local da aplicação em ambos os grupos que receberam finasterida como tratamento. É importante ressaltar que não foram observados processos inflamatórios nos tecidos durante a avaliação histológica dos grupos tratados com CLN, corroborando com as observações macroscópicas em relação aos sinais inflamatórios (Figura 23). Microscopicamente, os grupos I e II apresentaram microinflamação, característica histológica da AGA e relacionada a fase telógena, quando o cabelo está em fase de repouso, perdendo força, caindo e ficando mais fino. Esses achados não foram percebidos nos grupos III, IV e V, onde foram encontrados bulbos ativos. Os bulbos ativos estão presentes na parte mais profunda do folículo piloso e indicam a fase anágena, que é a fase de crescimento do pelo (BERNÁRDEZ et al., 2015; STEFANATO 2010).

Outra conquista notável é a ausência de finasterida na corrente sanguínea, confirmada pela análise de HPLC em todos os animais que receberam FNS nas formulações, corroborando o estudo de permeação *ex vivo*. Isto confirma que a finasterida não atingiu distribuição sistêmica através da administração tópica de CLN-FNS⁰⁷ e, portanto, muito provavelmente não causará efeitos adversos como os encontrados após administração oral (GUPTA et al., 2024). A ausência de processo inflamatório e de

finasterida na corrente sanguínea sugerem fortemente a segurança de nossa formulação para aplicação tópica.

Finalmente, comparando nossos resultados com outros estudos *in vivo* (KONG et al., 2022; DAS et al., 2019; CHEN et al., 2022), o grupo IV (tratado com CLN-FNS⁰⁷) demonstrou restauração capilar eficiente e significativa em modelo animal com AGA induzida, apresentando melhora do aspecto tecidual e aumento do número de bulbos ativos (Figura 23 e 24) com diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo I (AGA). A análise minuciosa dos gráficos, histologia e registros fotográficos sugere que a formulação CLN-FNS⁰⁷ possui um potencial promissor para melhorar o tratamento AGA, usando constituintes naturais para fornecer FNS às camadas mais profundas da pele e para restaurar os folículos capilares.

8 CONCLUSÃO

Os resultados obtidos neste estudo demonstraram que a concentração de Pluronic® nas formulações nanoestruturadas pode influenciar nas características do sistema carreador, particularmente em termos da taxa de libertação da finasterida, além de aumentar a capacidade do fármaco de penetração na pele. A formulação com menor concentração de polímero (CLN-FNS⁰⁷) demonstrou ter o melhor desempenho *in vitro*. O CLN-FNS⁰⁷ superou as limitações associadas às formulações de medicamentos convencionais, melhorando a estabilidade do medicamento e a permeação da pele, ao mesmo tempo que reduziu a irritação na pele. Por fim, apresentou restauração capilar eficiente *in vivo*, permanecendo na epiderme, sem processo inflamatório, sugerindo ser uma formulação segura para administração tópica além de apresentar maior número de bulbos ativos. A eficácia promissora do novo CLN-FNS⁰⁷ no tratamento de AGA o designa como um candidato para aplicações terapêuticas.

REFERÊNCIAS

- AFIUNE, L. A. F. et al. Novel iron oxide nanocarriers loading finasteride or dutasteride: Enhanced skin penetration for topical treatment of alopecia. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 587, n. May, 2020.
- AHMED, O. A. A.; RIZQ, W. Y. Finasteride nano-transferosomal gel formula for management of androgenetic alopecia: Ex vivo investigational approach. **Drug Design, Development and Therapy**, v. 12, p. 2259–2265, 2018.
- AKINGBOLA, C. O.; VYAS, J. Traction alopecia: A neglected entity in 2017? **Indian journal of dermatology, venereology and leprology**, v. 83, n. 6, p. 644–649, 2017.
- ALI, S.; SHABBIR, M.; SHAHID, N. The structure of skin and transdermal drug delivery system - A review. **Research Journal of Pharmacy and Technology**, v. 8, n. 2, p. 103–109, 2015.
- ASGHAR, F. et al. Telogen Effluvium: A Review of the Literature. **Cureus**, v. 12, n. 5, p. 1–7, 2020.
- BARONI, A. et al. Structure and function of the epidermis related to barrier properties. **Clinics in Dermatology**, v. 30, n. 3, p. 257–262, 2012.
- BARUA, S.; MITRAGOTRI, S. Challenges associated with penetration of nanoparticles across cell and tissue barriers: A review of current status and future prospects. **Nano Today**, v. 9, n. 2, p. 223–243, 2014.
- BATTAGLIA, L.; GALLARATE, M. Lipid nanoparticles: state of the art, new preparation methods and challenges in drug delivery. **Expert Opinion on Drug Delivery**, v. 9, n. 5, p. 497–508, 2012.
- BERNÁRDEZ, C., MOLINA-RUIZ, A.M., REQUENA, L. Histopatología de las alopecias. Parte I: alopecias no cicatriciales, **Actas Dermo-Sifiliográficas**, Volume 106, Issue 3, 2015.
- BERTI, I. R., et al. Concepts and Design of Materials Nanoarchitectonics, ed. O. Azzaroni and K. Ariga, **The Royal Society of Chemistry**, pp. 381-416, 2022.
- BURGALASSI, S. et al. In vitro evaluation of some parameters involved in mucoadhesion of aqueous polymeric dispersions. **Pharmaceutical development and technology**, 20(8), 927-934, 2015.
- CAON, T. et al. Chitosan-decorated polystyrene-b-poly(acrylic acid) polymersomes as novel carriers for topical delivery of finasteride. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 52, n. 1, p. 165–172, 2014.
- CAPRA, P., MUSITELLI, G., PERUGINI, P., 2017. Wetting and adhesion evaluation of cosmetic ingredients and products: Correlation of in vitro-in vivo contact angle measurements. **International journal of cosmetic science**. 39 (4), 393-401, 2017.
- CHEN, Q. et al. Penetration pathways, influencing factors and predictive models for dermal absorption of exobiotic molecules: A critical review. **The Science of the total environment**, 927, 172390, 2024.
- CHEN X, et. al. Bioengineered polyester nanoparticles for the synergistic treatment of androgenic alopecia via the suppression of 5 α -reductase and knockdown of androgen receptor. **Front. Bioeng. Biotechnol.**, Volume 10, 2022.

- CHIRIACÒ, G. et al. An observational retrospective evaluation of 79 young men with long-term adverse effects after use of finasteride against androgenetic alopecia. **Andrology**, v. 4, n. 2, p. 245–250, 2016.
- DAS, R. P.; SINGH, B. G.; KUNWAR, A. Preparation of a size selective nanocomposite through temperature assisted co-assembly of gelatin and pluronic F127 for passive targeting of doxorubicin. **Biomaterials Science**, v. 8, n. 15, p. 1–34, 2020.
- De Gennes PG. Wetting: statics and dynamics. **Rev Mod Phys**;57:827-863, 1985.
- DETONI, C. B. et al. Photostability and skin penetration of different E-resveratrol-loaded supramolecular structures. **Photochemistry and Photobiology**, v. 88, n. 4, p. 913–921, 2012.
- DEVJANI, S. et al. Androgenetic Alopecia: Therapy Update. **Drugs**, 83(8), 701-715, 2023.
- DHANOTIA, R. et al. Effect of Citrullus colocynthis Schrad fruits on testosterone-induced alopecia. **Natural Product Research**, v. 25, n. 15, p. 1432–1443, 2011.
- ESKELAND, S. O.; MOEN, E.; HUMMELEN, B. Trikotillomani. **Tidsskr Nor Laegeforen**, n. 10, 2018.
- FAROKHZAD, O. C.; LANGER, R. Impact of nanotechnology on drug delivery. **ACS Nano**, v. 3, n. 1, p. 16–20, 2009.
- FENG, S. S. Nanoparticles of biodegradable polymers for new-concept chemotherapy. **Expert Review of Medical Devices**, v. 1, n. 1, p. 115–125, 2004.
- FERREIRA, K. C. B. et al. Nanostructured Lipid Carriers for the Formulation of Topical Anti-Inflammatory Nanomedicines Based on Natural Substances. **Pharmaceutics**, v. 13, n. 1454, p. 1–22, 2021.
- FU, D. et al. Dihydrotestosterone-induced hair regrowth inhibition by activating androgen receptor in C57BL6 mice simulates androgenetic alopecia. **Biomedicine & pharmacotherapy = Biomedicine & pharmacotherapie**, 137, 111247, 2021.
- GOMES, M. J. et al. Lipid nanoparticles for topical and transdermal application for alopecia treatment: Development, physicochemical characterization, and in vitro release and penetration studies. **International Journal of Nanomedicine**, v. 9, n. 1, p. 1231–1242, 2014.
- GONÇALVES, L. M. D. et al. Development of solid lipid nanoparticles as carriers for improving oral bioavailability of glibenclamide. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 102, n. 16, p. 1–20, 2016.
- GRAVERINI G, et al. Solid lipid nanoparticles for delivery of andrographolide across the blood-brain barrier: in vitro and in vivo evaluation. **Colloid Surf B** .161:302-13, 2018.
- GÜNGÖR, S.; KAHRAMAN, E. **Nanocarriers Mediated Cutaneous Drug Delivery European Journal of Pharmaceutical Sciences** Elsevier B.V., 1 mar. 2020.
- GUPTA A. et al. Finasteride for hair loss: a review. **The Journal of dermatological treatment**, 33(4), 1938–1946, 2022.
- GUPTA A. et al. The impact of monotherapies for male androgenetic alopecia: A network meta-analysis study. **J Cosmet Dermatol**. 00: 1-9, 2024.
- GUPTA, A.; TALUKDER, M.; BAMIMORE M. Natural products for male androgenetic alopecia. **Dermatologic Therapy**. 35(4):e15323, 2022.

- HAMISHEHKAR, H. et al. Histological assessment of follicular delivery of flutamide by solid lipid nanoparticles: Potential tool for the treatment of androgenic alopecia. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, v. 42, n. 6, p. 846–853, 2016.
- HERZ-RUELAS, M. et al. "Efficacy of Intralesional and Oral Dutasteride in the Treatment of Androgenetic Alopecia: A Systematic Review." **Skin appendage disorders** vol. 6,6; 338-345, 2020.
- IAMSUMANG, W.; LEERUNYAKUL, K.; SUCHONWANIT, P. Finasteride and its potential for the treatment of female pattern hair loss: Evidence to date. **Drug Design, Development and Therapy**, v. 14, p. 951–959, 2020.
- JUÁREZ-RENDÓN, K. J. et al. Alopecia areata. Actualidad y perspectivas. **Archivos argentinos de pediatría**, v. 115, n. 6, p. e404–e411, 2017.
- KARIMI, M. et al. Temperature-Responsive Smart Nanocarriers for Delivery of Therapeutic Agents: Applications and Recent Advances. **ACS Applied Materials and Interfaces**, v. 8, n. 33, p. 21107–21133, 2016.
- KAUL, S. et al. Role of Nanotechnology in Cosmeceuticals: A Review of Recent Advances. **Journal of Pharmaceutics**, v. 2018, p. 1–19, 2018.
- KELLY Y, BLANCO A, TOSTI A. Androgenetic Alopecia: An Update of Treatment Options. **Drugs**. 2016 Sep;76(14):1349-64
- KHAN, M. Z. U. et al. Finasteride Topical Delivery Systems for Androgenetic Alopecia. **Current Drug Delivery**, v. 15, n. 8, p. 1100–1111, 2018.
- KONG, J. et al. Safflower oil body nanoparticles deliver hFGF10 to hair follicles and reduce microinflammation to accelerate hair regeneration in androgenetic alopecia, **International Journal of Pharmaceutics**, Volume 616, 2022.
- LOLLI, F. et al. Androgenetic alopecia: a review. **Endocrine Humana Press Inc.**, , 1 jul. 2017.
- MADHESWARAN, T. et al. Design and In Vitro Evaluation of Finasteride-Loaded Liquid Crystalline Nanoparticles for Topical Delivery. **AAPS PharmSciTech**, v. 14, n. 1, p. 45–52, 2013.
- MADHESWARAN, T. et al. Enhanced Topical Delivery of Finasteride Using Glyceryl Monooleate-Based Liquid Crystalline Nanoparticles Stabilized by Cremophor Surfactants. **AAPS PharmSciTech**, v. 15, n. 1, p. 44–51, 2014.
- MADHESWARAN, T. et al. In Vitro and In Vivo Skin Distribution of 5 α -Reductase Inhibitors Loaded Into Liquid Crystalline Nanoparticles. **Journal of pharmaceutical sciences**, 106(11), 3385–3394, 2017.
- MAITRA, M.; GOYAL, A. K.; RATH, G. A novel approach for follicular delivery of minoxidil for treatment of alopecia. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**, v. 41, p. 113–123, 2017.
- MARTINEZ-JACOBO, L. et al. Genetic and molecular aspects of androgenetic alopecia. **Indian journal of dermatology, venereology and leprology**, 84(3), 263–268, 2018.
- MATIAS, J. R., MALLOY, V., ORENTREICH, N. Animal models of androgen-dependent disorders of the pilosebaceous apparatus. 1. The androchronogenetic alopecia (AGA) mouse as a model for male-pattern baldness. **Archives of dermatological research**, 281(4), 247–253, 1989.
- MATOS, B. N. et al. Chitosan nanoparticles for targeting and sustaining minoxidil sulphate

- delivery to hair follicles. **International Journal of Biological Macromolecules**, 2015.
- MOHAMAD, E. A. et al. Nanotechnol. **Adv. Nat. Sci: Nanosci**, 14 025002, 2023.
- MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunological Methods**, v. 65, n. 1–2, p. 55–63, 1983.
- MOTOFEI, I. G. et al. Finasteride and androgenic alopecia; from therapeutic options to medical implications. **Journal of Dermatological Treatment**, v. 31, n. 4, p. 415–421, 2020.
- MONTI, D. et al. Topical formulations containing finasteride. Part I: in vitro permeation/penetration study and in vivo pharmacokinetics in hairless rat. **Journal of pharmaceutical sciences**, 103(8), 2307–2314, 2014.
- NILFOROUSHZADEH, M. A. et al. Engineering the niche for hair regeneration — A critical review. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine**, v. 15, n. 1, p. 70–85, 2019.
- NOUBARANI, M. et al. Effect of *Adiantum capillus veneris* linn on an animal model of testosterone-induced hair loss. **Iranian Journal of Pharmaceutical Research**, v. 13, n. SUPPL, p. 113–118, 2014.
- NG, K.W., LAU, W.M. Skin Deep: The Basics of Human Skin Structure and Drug Penetration. In: Dragicevic, N., Maibach, H. (eds) *Percutaneous Penetration Enhancers Chemical Methods in Penetration Enhancement*. Springer, Berlin, Heidelberg, 2015.
- OGISO, T. et al. Transfollicular drug delivery: Penetration of drugs through human scalp skin and comparison of penetration between scalp and abdominal skins in vitro. **Journal of Drug Targeting**, v. 10, n. 5, p. 369–378, 2002.
- PALMIERI, M. G. S. et al. Development of nanostructured lipid carriers containing finasteride. **Brazilian journal of health and pharmacy**, v. 2, p. 20–27, 2020.
- PANDIT, S.; CHAUHAN, N. S.; DIXIT, V. K. Effect of *Cuscuta reflexa* Roxb on androgen-induced alopecia. **Journal of Cosmetic Dermatology**, v. 7, n. 3, p. 199–204, 2008.
- PEREIRA, M. N. et al. Nanotechnology advances for hair loss. **Therapeutic Delivery**, v. 9, n. 8, p. 593–604, 2018.
- PERVAIZ, F. et al. Development and ex-vivo skin permeation studies of finasteride–poly(lactic acid-co-glycolic acid) and minoxidil–chitosan nanoparticulate systems. **Journal of Bioactive and Compatible Polymers**, v. 35, n. 2, p. 77–91, 1 mar. 2020.
- PITTELLA, F., et al. PRECISE Scale: a quantitative classification for androgenetic alopecia and its application to hair transplantation, **Aesthetic plastic surgery**, 48(5), 775–784, 2024.
- POHLMANN, A. R. et al. **Nanopartícula polimérica de finasterida e minoxidil, processo de sua preparação, suspensão aquosa contendo a mesma, composição farmacêutica, e seu uso**, 2019.
- POHLMANN, A. R.; JORNADA, D. S.; GUTERRES, S. S. **Nanopartícula polimérica de finasterida, suspensão aquosa contendo a mesma, composição para tratamento de alopecia, processo de preparação de dita composição, e seu uso**, 2014.
- PRICE, V. H. Treatment of hair loss. **The New England Journal of Medicine**, v. 341, p. 964–973, 1999.

- PS, B. et al. Comparing Current Therapeutic Modalities of Androgenic Alopecia: A Literature Review of Clinical Trials. **Cureus**, 31;15(7):e42768, 2023
- RAMEZANI, V. et al. Formulation and optimization of transfersome containing minoxidil and caffeine. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**, v. 44, p. 129–135, 2018.
- RICCI, E. et al. Rheological characterization of poloxamer 407 lidocaine hydrochloride gels. **Eur. J. Pharm. Sci.**, 17:161–167, 2002.
- ROQUE, L. V. et al. Design of Finasteride-Loaded Nanoparticles for Potential Treatment of Alopecia. **Skin Pharmacology and Physiology**, v. 30, n. 4, p. 197–204, 2017.
- RUSTAN, A., DREVON, C. Fatty Acids: Structures and Properties. In: **Encyclopedia of Life Sciences**, John Wiley and Sons, Ltd., Chichester, 2005.
- SALIM, S.; KAMALASANAN, K. Controlled drug delivery for alopecia: A review. **Journal of Controlled Release**, v. 325, p. 84–99, 2020.
- SANTOS, M. et al. Setting Precise Temperature for Triggered Release from Nanostructured Lipid Carriers. **IFAC-PapersOnLine**, v. 51, n. 27, p. 1–6, 2018.
- SATYANARAYANA, V., GUANG, W. Diffusion properties of model compounds in artificial sebum. **International Journal of Pharmaceutics**, Volume 345, Issues 1–2, 2007, Pages 88-94, 2007.
- SCHNEIDER, M. et al. Nanoparticles and their interactions with the dermal barrier. **Dermato-Endocrinology**, v. 1, n. 4, p. 197–206, 2009.
- SCIOLI MONTOTO, S.; MURACA, G.; RUIZ, M. E. Solid Lipid Nanoparticles for Drug Delivery: Pharmacological and Biopharmaceutical Aspects. **Frontiers in Molecular Biosciences**, v. 7, n. October, p. 1–24, 2020.
- SCOW, D. T.; NOLTE, R. S.; SHAUGHNESSY, A. F. Medical treatments for balding in men. **American Family Physician**, v. 59, n. 8, p. 2189–2194, 1999.
- SHAIKH, Z. et al. Nanotechnology-Based Strategies for Hair Follicle Regeneration in Androgenetic Alopecia. **Materials Proceedings**, 14(1):57, 2023.
- SHARMA, A., SHARMA, S., TOMAR, D. S. Optimization of in-situ Nanoparticulate Gel of Ofloxacin using Factorial Design to Improve Treatment Strategy for Conjunctivitis and Corneal Ulcers. **Indian Journal of Pharmaceutical Education and Research**, 54. 284-292, 2020.
- SOHAIB, M. et al. Physicochemical Characterization of Chitosan-Decorated Finasteride Solid Lipid Nanoparticles for Skin Drug Delivery. **BioMed Research International**, 2022.
- SOLDATI, P. P. et al. Controlled release of resveratrol from lipid nanoparticles improves antioxidant effect. **IFAC-PapersOnLine**, v. 51, n. 27, p. 16–21, 2018.
- SOLEYMANI, M., SALIMI, A. Enhancement of Dermal Delivery of Finasteride Using Microemulsion Systems. **Advanced pharmaceutical bulletin**, 9(4), 584–592, 2019.
- SOUTO, E. B.; NAYAK, A. P.; MURTHY, R. S. R. Lipid nanoemulsions for anti-cancer drug therapy. **Pharmazie**, v. 66, n. 7, p. 473–478, 2011.
- SPANGLER, W., ROGA, R., CROSS, H. A detergency test based on rapid aging of unremoved sebum. **J Am Oil Chem Soc**, 44: 728-732, 1967.
- STEFANATO, C. M. Histopathology of alopecia: A clinicopathological approach to diagnosis. **Histopathology**, v. 56, n. 1, p. 24–38, 2010.

- STEFANIAK, A. B., HARVEY, C. J., 2006. Dissolution of materials in artificial skin surface film liquids. **Toxicology in vitro**: an international journal published in association with BIBRA, 20(8), 1265–1283, 2006.
- TAI, T.; KOCHHAR, A. Physiology and Medical Treatments for Alopecia. **Facial Plastic Surgery Clinics of North America**, v. 28, n. 2, p. 149–159, 2020.
- TAMPUCCI, S. et al. Topical formulations containing finasteride. part II: Determination of finasteride penetration into hair follicles using the differential stripping technique. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 103, n. 8, p. 2323–2329, 2014.
- TAMPUCCI, S. et al. Sporopollenin Microcapsule: Sunscreen Delivery System with Photoprotective Properties. **Pharmaceutics**, 14(10):2041, 2022.
- TAS, C. et al. Nasal absorption of metoclopramide from different Carbopol 981 based formulations: In vitro, ex vivo and in vivo evaluation. **European journal of pharmaceutics and biopharmaceutics**: official journal of Arbeitsgemeinschaft für Pharmazeutische Verfahrenstechnik e.V, 64(2), 246–254, 2006.
- TEERANACHAIDEEKUL, V. et al. Influence of oil content on physicochemical properties and skin distribution of Nile red-loaded NLC. **Journal of Controlled Release**, v. 128, n. 2, p. 134–141, 2008.
- TRIPATHI, P. et al. Carbomer gel bearing methotrexate loaded lipid nanocontainers shows improved topical delivery intended for effective management of psoriasis. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 120, p. 1–27, 2018.
- UPADHYAY, K., GUPTA, N. K., DIXIT, V. K. Development and characterization of phyto-vesicles of β -sitosterol for the treatment of androgenetic alopecia. **Archives of dermatological research**, 304(7), 511–519, 2012.
- VAÑÓ-GALVÁN, S. et al. Safety of low-dose oral minoxidil for hair loss: A multicenter study of 1404 patients. **Journal of the American Academy of Dermatology**, 84(6), 1644–1651, 2021.
- VELISSARATOU, A., PAPAIOANNOU, G. In vitro release of chlorpheniramine maleate from ointment bases. **International Journal of Pharmaceutics**, Volume 52, Issue 1, Pages 83-86, 1989.
- VILLEGAS, C., GUNNEY, M., ZAGURY, G. Comparison of five artificial skin surface film liquids for assessing dermal bioaccessibility of metals in certified reference soils. **Science of The Total Environment**, Volume 692, Pages 595-601, 2019.
- XIANG L. et al. Development and evaluation of finasteride niosomes targeting to hair follicles for the management of androgenic alopecia, **Journal of Drug Delivery Science and Technology**, Volume 86, 104725, 2023.
- Wu X. et al. Hybrid hair follicle stem cell extracellular vesicles co-delivering finasteride and gold nanoparticles for androgenetic alopecia treatment. **Journal of Controlled Release**. Volume 373, 652-666, 2024.
- YANG, C., LEONG, K. Influences of substrate wettability and liquid viscosity on isothermal spreading of liquid droplets on solid surfaces. **Exp Fluids** 33, 728–731, 2002.

ANEXOS

Anexo 1 – Projeto aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos da
UFJF

COMISSÃO NACIONAL DE
ÉTICA EM PESQUISA



PARECER CONSUBSTANCIADO DA CONEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Avaliação da permeação dérmica ex-vivo de nanopartículas lipídicas sólidas contendo finasterida

Pesquisador: MIGUEL GONTIJO SIQUEIRA PALMIERI

Área Temática: Equipamentos e dispositivos terapêuticos, novos ou não registrados no País;

Versão: 8

CAAE: 20415319.6.0000.5147

Instituição Proponente: Faculdade de Farmácia

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 4.974.216

Apresentação do Projeto:

As informações elencadas nos campos "Apresentação do Projeto", "Objetivo da Pesquisa" e "Avaliação dos Riscos e Benefícios" foram retiradas do arquivo Informações Básicas da Pesquisa (PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_1385046.pdf) e do Projeto Detalhado.

INTRODUÇÃO

O cabelo é o cartão de visitas do indivíduo e possui grande importância social e estética. Sua formação começa nos folículos capilares que são essencialmente mini órgãos compostos de múltiplas camadas encapsulando e produzindo a haste do fio que se projeta através da epiderme. A haste do fio está envolta pela bainha reticular interna e externa, enquanto que na base do folículo, a papila dérmica está cercada por células da matriz que se proliferam e se diferenciam para formar o fio de cabelo. O bojo do folículo capilar está localizado na parte mediana, onde também se encontram a glândula sebácea e o músculo eretor (JI et al., 2017; NILFOROUSHZADEH et al., 2019). A queda de cabelo é um problema que acomete tanto homens quanto mulheres. Esta condição não deve ser considerada apenas como questão estética, uma vez que tem impactos claros na saúde, pois a mesma diminui a autoestima, causa ansiedade e pode levar a depressão. Uma das causas mais comuns da queda de cabelo é a alopecia androgenética (AGA), alteração fisiológica que acomete metade da população caucasiana do sexo masculino de meia idade e praticamente 100% dessa mesma população para os que estão acima de 80 anos. Além dos

Endereço: SRTVN 701, Via W 5 Norte, lote D - Edifício PO 700, 3º andar
Bairro: Asa Norte **CEP:** 70.719-040
UF: DF **Município:** BRASÍLIA
Telefone: (61)3315-5877 **E-mail:** conep@saude.gov.br

COMISSÃO NACIONAL DE
ÉTICA EM PESQUISA



Continuação do Parecer: 4.974.216

Considerações Finais a critério da CONEP:

Diante do exposto, a Comissão Nacional de Ética em Pesquisa - Conep, de acordo com as atribuições definidas na Resolução CNS nº 466 de 2012 e na Norma Operacional nº 001 de 2013 do CNS, manifesta-se pela aprovação do projeto de pesquisa proposto.

Situação: Protocolo aprovado.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_1385046.pdf	18/06/2021 16:42:49		Aceito
Outros	Carta_resposta_parecer_consustancia do_4770330.pdf	18/06/2021 16:38:31	MIGUEL GONTIJO SIQUEIRA	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLEBiorrepositorio.pdf	14/06/2021 15:34:28	MIGUEL GONTIJO SIQUEIRA PALMIERI	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	projetodetalhadocomite.pdf	04/04/2021 20:13:21	MIGUEL GONTIJO SIQUEIRA PALMIERI	Aceito
Outros	regulamento_de_biorrepositorio_cepuff.pdf	28/06/2020 19:57:10	MIGUEL GONTIJO SIQUEIRA	Aceito
Outros	InfraestruturaNecessaria.pdf	28/06/2020 19:43:14	MIGUEL GONTIJO SIQUEIRA	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	declaracaoinfraestrutura.pdf	24/10/2019 09:16:22	MIGUEL GONTIJO SIQUEIRA PALMIERI	Aceito
Outros	termosigiloAGO.pdf	02/09/2019 12:45:48	MIGUEL GONTIJO SIQUEIRA	Aceito
Folha de Rosto	FOLHADEROSTOAGO.pdf	02/09/2019 12:42:11	MIGUEL GONTIJO SIQUEIRA	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Endereço: SRTVN 701, Via W 5 Norte, lote D - Edifício PO 700, 3º andar
Bairro: Asa Norte **CEP:** 70.719-040
UF: DF **Município:** BRASÍLIA
Telefone: (61)3315-5877 **E-mail:** conep@saude.gov.br



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada “**Estudo das propriedades anti androgênicas da finasterida nanoencapsulada no modelo animal de Alopecia Androgenética (AGA)**”, protocolada sob o nº 22/2022, sob a responsabilidade de **José Otávio do Amaral Corrêa** e equipe **Miguel Gontijo Siqueira Palmieri** e **Frederico Pittella Silva** – que envolve a utilização de animais pertencentes ao filo *Chordata*, subfilo *Vertebra* (exceto homem), para fins de pesquisa científica - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de Julho de 2009, bem como normas editadas pelo Conselho de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi **APROVADA** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Juiz de Fora na reunião de 04/10/2022.

We certify that the proposal “**Estudo das propriedades anti androgênicas da finasterida nanoencapsulada no modelo animal de Alopecia Androgenética (AGA)**”, protocol number 22/2022, under the responsibility of “**José Otávio do Amaral Corrêa**” and team “**Miguel Gontijo Siqueira Palmieri** e **Frederico Pittella Silva**” – which involves the use of animals belonging to the phylum *Chordata*, subphylum *Vertebra* (except human beings), for scientific research purposes – is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, and Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was APPROVED by the Ethic Committee of Animal Use of the Federal University of Juiz de Fora/MG in the meeting of 10/04/2022.

Finalidade	() Ensino (x) Pesquisa Científica
Vigência da autorização	15/10/2022 a 15/10/2024
Médico Veterinário responsável pela pesquisa	Ricardo Palhares Zschaber de Araujo ART: 4364/22
ART e vigência	Período de validade: 05/04/2022 a 05/04/2023
Espécie/linhagem/raça	Ratos albinos Wistar (<i>Rattus norvegicus</i>)
Nº de animais	25
Peso/Idade	120 a 150gramas/8 a 12 semanas
Sexo	Machos

Procedência dos animais	CBR/UFJF
Local de manutenção dos animais	CBR/UFJF

APROVEITAMOS A OPORTUNIDADE PARA INFORMAR QUE:

- 1) O projeto/treinamento de pesquisa deve ser desenvolvido conforme delineado no processo aprovado;
- 2) A CEUA/UFJF deve ser informada de todos os fatos relevantes que alterem o curso normal do projeto/treinamento. É papel do pesquisador responsável assegurar medidas imediatas adequadas frente a e evento não previstos.
- 3) Eventuais modificações ou emendas ao processo devem ser apresentadas à CEUA/UFJF de forma clara e sucinta, identificando a parte a ser modificada e suas justificativas.
 - No caso de treinamento, esta aprovação tem validade de 12 meses a partir da data de aprovação pela CEUA/UFJF e para cada evento realizado nesse período, o pesquisador responsável deverá apresentar um relatório das atividades realizadas;
 - No caso de projeto de pesquisa, esta aprovação tem validade de acordo com o cronograma proposto no protocolo. Os relatórios deverão ser enviados a cada 12 (doze meses), a partir da data de aprovação da CEUA/UFJF.
- 4) Havendo interesse na renovação do projeto, a solicitação deverá ser protocolada até o último dia de validade da atual proposta. Após esta data uma nova proposta deverá ser encaminhada.

Atenciosamente,

Coordenação da CEUA/UFJF



Documento assinado eletronicamente por **Ana Eliza Andreazzi, Professor(a)**, em 11/10/2022, às 10:07, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Vera Maria Peters, Coordenador(a)**, em 11/10/2022, às 11:12, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no Portal do SEI-Ufjf (www2.ufjf.br/SEI) através do ícone Conferência de Documentos, informando o