

ANA CHRISTINA SILVA DE OLIVEIRA

**DESENVOLVIMENTO DE NANOCÁPSULAS DE LATANOPROSTA PARA O
TRATAMENTO TÓPICO DE ALOPECIA**

BRASÍLIA, 2020

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

ANA CHRISTINA SILVA DE OLIVEIRA

**DESENVOLVIMENTO DE NANOCÁPSULAS DE LATANOPROSTA PARA O
TRATAMENTO TÓPICO DE ALOPECIA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação
em Ciências da Saúde da Universidade de Brasília para
obtenção do título de Mestra em Ciências da Saúde

Orientador: Prof. Dr. Guilherme Martins Gelfuso

BRASÍLIA, 2020

ANA CHRISTINA SILVA DE OLIVEIRA

**DESENVOLVIMENTO DE NANOCÁPSULAS DE LATANOPROSTA PARA O
TRATAMENTO TÓPICO DE ALOPECIA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação
em Ciências da Saúde da Universidade de Brasília para
obtenção do título de Mestra em Ciências da Saúde

Aprovada em 29 de julho de 2020.

BANCA EXAMINADORA

Presidente: Prof. Dr. Guilherme Martins Gelfuso

Membro Interno: Prof. Dr. Breno Noronha Matos

Membro Externo: Prof^ª. Dr^ª. Taís Gratieri

Membro Suplente: Prof^ª. Dr^ª. Livia C. Lira de Sá Barreto

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, por estar comigo em todos os momentos e me dar capacidades e forças para continuar.

Um agradecimento especial ao meu orientador Dr. Guilherme M. Gelfuso. Agradeço por apostar em mim mesmo não me conhecendo muito bem. Muito obrigada por se mostrar presente, solícito e interessado no meu aprendizado e crescimento profissional. Obrigada pelo ser humano que é e por compreender o momento difícil que passei durante o mestrado me ajudando ir até o final. Muito obrigada!

Agradeço à minha família que sempre acreditou em mim e isso sempre fez a diferença em minhas conquistas. Agradeço ao meu noivo Jan, que vivenciou de perto os momentos de tristezas, alegrias e estresses que passei nesse período.

Quero agradecer também aos meus companheiros do LTMAC, que transformaram a caminhada mais agradável. Em especial à Doutoranda Paula Martins de Oliveira que me ajudou no desenvolvimento deste trabalho. Muito obrigada pela oportunidade de fazer pesquisa com você. Te desejo todo o sucesso. Quero agradecer também ao Doutorando Ricardo Ferreira Nunes, que sempre muito solícito me ensinou muito e me acrescentou muito como profissional.

Por fim, agradeço a CAPES que tornou possível a minha dedicação exclusiva ao Mestrado por meio da concessão de Bolsa de Estudos. Agradeço também ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde na pessoa de sua coordenadora, Prof^ª. Dr^ª. Pérola de Oliveira Magalhães, bem como, às técnicas administrativas que me auxiliaram nesse acréscimo na minha caminhada profissional.

RESUMO

Alopecia é uma doença que atinge os folículos pilosos diminuindo gradativamente a produção de seus fios. A latanoprostá vem recentemente mostrando ser uma molécula promissora ao tratamento desta doença, por estimular o crescimento capilar. Considerando-se que a lipofilicidade alta dessa molécula dificulta sua incorporação em uma formulação de base aquosa e restringe sua penetração cutânea, esse trabalho visou desenvolver uma formulação baseada em nanocápsulas poliméricas de policaprolactona incorporando a latanoprostá na tentativa de promover o acúmulo desta substância nos folículos pilosos e favorecer assim a terapia tópica da alopecia. As nanocápsulas foram obtidas seguindo-se o método de evaporação do solvente. Os nanossistemas produzidos tiveram seu tamanho médio, índice de polidispersividade (PdI) e potencial zeta medidos através da análise de espalhamento da luz dinâmica e mobilidade eletroforética. Os valores de eficiência de encapsulação foram determinados através da quantificação da latanoprostá não encapsulada separada por centrifugação. A estabilidade do nanossistema desenvolvido foi monitorada por 90 dias, observando-se características como tamanho médio, índice de polidispersividade, potencial zeta e teor de fármaco. Para os estudos de permeação, células de difusão foram montadas com pele de orelha de porco separando o compartimento doador do comportamento receptor. Formulações de nanocápsulas e controle foram aplicadas por 8 h na superfície da pele. Os experimentos foram realizados com e sem estímulo mecânico na pele depois de aplicada a formulação. Nanocápsulas de $197,0 \pm 2,2$ nm (PdI = $0,15 \pm 0,01$), com potencial zeta de $-30,1 \pm 1,8$ mV e capazes de encapsular $93,9 \pm 0,4\%$ de latanoprostá foram obtidas. Elas se mostraram estáveis por pelo menos 90 dias quando armazenadas a 6°C ($209,8 \pm 2,31$ nm; PdI = $0,35 \pm 0,04$; potencial zeta de $-29,2 \pm 0,25$). Estudos de permeação mostraram que houve um aumento de aproximadamente 20% no acúmulo de latanoprostá nos folículos pilosos na aplicação de formulação de nanocápsulas comparadas com a formulação controle. Essa diferença aumentou para 86% quando as nanocápsulas foram aplicadas na pele sob uma massagem manual. Assim, considerando que a dispersão coloidal das nanocápsulas também demonstrou um potencial irritante nulo para a pele, pode-se concluir que o sistema desenvolvido possui um alto potencial de uso como formulação tópica para o tratamento da alopecia androgênica.

ABSTRACT

Alopecia is a disease that affects the hair follicles, gradually decreasing the production of hair shafts. Latanoprost has recently been shown to be a promising molecule for the treatment of this disease, given its influence on hair follicle cells. Considering that the high lipophilicity of this molecule hinders its incorporation in an aqueous-based formulation and restricts its cutaneous penetration, this work aimed to develop a formulation based on polymeric nanocapsules of polycaprolactone incorporating latanoprost in an attempt to promote the accumulation of this substance in hair follicles to favor topical alopecia therapy. The nanocapsules were obtained following the solvent evaporation method. The produced nanosystems had their average size, polydispersity index (PdI) and zeta potential measured through the analysis of light scattering and electrophoretic mobility. The encapsulation efficiency values were determined by quantifying the non-encapsulated latanoprost separated by centrifugation. The stability of the developed nanosystem was monitored for 90 days, observing characteristics such as average size, polydispersity index, zeta potential and drug content. For permeation studies, diffusion cells were assembled with pig ear skin separating the donor compartment from the recipient behavior. Nanocapsules and control formulations were applied for 8 h on the skin surface. The experiments were carried out with and without mechanical stimulation on the skin after the formulation was applied. Nanocapsules of 197.0 ± 2.2 nm ($PdI = 0.15 \pm 0.01$), with zeta potential of -30.1 ± 1.8 mV and capable of encapsulating $93.9 \pm 0.4\%$ of latanoprost were obtained. They were stable for at least 90 days when stored at 6°C (209.8 ± 2.31 nm; $PdI = 0.35 \pm 0.04$; zeta potential of -29.2 ± 0.25). Permeation studies showed there was an increase of approximately 20% in the accumulation of latanoprost in hair follicles in the application of nanocapsules' formulation compared to the control formulation. This difference increased to 86% when the nanocapsules were applied to the skin under a manual massage. Thus, considering that the colloidal dispersion of nanocapsules also demonstrated a very low irritating potential for the skin, it can be concluded that the developed system has a high potential for use as a topical formulation for the treatment of androgenic alopecia.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Morfologia da pele	4
Figura 2: Anatomia do folículo piloso	6
Figura 3: Ciclo de crescimento dos fios capilares.	7
Figura 4: Ação da DHT nos folículos pilosos.....	9
Figura 5: Estrutura química da latanoprosta	11
Figura 6: Diferença entre o sistema matricial (nanoesferas) e o sistema vesicular (nanocápsulas)	13
Figura 7: Cromatograma obtido para uma solução de latanoprosta a 10 µg/mL eluída seguindo-se o método proposto por cromatografia líquida de alta eficiência com detecção por DAD.....	28
Figura 8: Cromatogramas das amostras contendo 10 µg/mL de latanoprosta (LAT) em metanol e na presença dos estratos metanólicos das camadas da pele (EC – estrato córneo; FP – folículo piloso; PR – pele remanescente) e dos excipientes das nanocápsulas obtidos por cromatografia líquida de alta eficiência com detecção no DAD	29
Figura 9: Curva analítica em metanol obtida de análises em triplicata. Faixa = 0,5 µg/mL a 25 µg/mL; equação da reta: $y = 21455x + 255,05$; $r^2 = 0,9993$	30
Figura 10: (A)Cromatograma da latanoprosta (m/z 433,3) e (B)do seu fragmento (m/z 397,3) respectivamente com tempo de retenção em 11,8 minutos	32
Figura 11: Espectro de massas para a latanoprosta	33
Figura 12: Curva analítica para latanoprosta diluída em metanol, obtida em triplicata na faixa de concentração de 0,1 a 5,0 µg/mL seguindo-se o método por LC-MS. Equação da reta = $172370x + 6637,1$; $r^2 = 0,9994$	33
Figura 13: Correspondência entre as curvas em metanol e as curvas em solução metanólica	

contaminadas com as camadas da pele em triplicata. Equação da reta = $190358x + 6940,3$; $r^2 = 0,9978$ para o Estrato Córneo. Equação da reta = $208000x + 15736$; $r^2 = 0,9993$ para o Folículo Piloso. Equação da reta = $181124x + 16128$; $r^2 = 0,9969$ para o Pele Remanescente 34

Figura 14: Imagens das nanocápsulas de latanoprosta. (A) Aumento em 15.000 vezes; (B) aumento em 5.000 vezes 42

Figura 15: Variação de tamanho médio (A) e PDI (B) da dispersão das nanocápsulas de latanoprosta ao longo de 90 dias mantidas tanto a $25 \pm 5^\circ\text{C}$ quanto a $6 \pm 2^\circ\text{C}$ 43

Figura 16: Variação do potencial zeta das nanocápsulas de latanoprosta mantidas a $25 \pm 5^\circ\text{C}$ e a $6 \pm 2^\circ\text{C}$ ao longo de 90 dias 44

Figura 17: Teor de latanoprosta após as nanoformulações serem mantidas a $25 \pm 5^\circ\text{C}$ e a $6 \pm 2^\circ\text{C}$ por 90 dias 45

Figura 18: Perfil de liberação *in vitro* da latanoprosta encapsulada em nanocápsulas de policaprolactona 47

Figura 19: Resultados de recuperação da latanoprosta permeada nas camadas da pele. À esquerda, resultados para o teste controle sem e com massagem respectivamente. À direita, resultados para o teste com as nanocápsulas sem e com massagem respectivamente 48

Figura 20: Imagens da interação dos controles e da solução de nanocápsulas de latanoprosta com a membrana CAM. (A) Nanocápsulas de latanoprosta. (B) Controle negativo – NaCl 0,9% (p/v). (C) Controle positivo – 1 mol/L de NaOH 50

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Resultados dos testes de precisão e exatidão para os analistas 1 e 2 nos dias 1 e 2 nas concentrações de 2µg/mL ;10 µg/mL e 20 µg/mL de latanoprosta	31
Tabela 2: Limites de detecção e quantificação para método analítico em cromatografia líquida de alta eficiência	32
Tabela 3: Dados obtidos do efeito matriz na presença de contaminantes (estrato córneo, folículo piloso e pele remanescente) para a latanoprosta nas diferentes matrizes	35
Tabela 4: Limites de detecção e quantificação para a latanoprosta em metanol, estrato córneo, folículo piloso e pele remanescente	35
Tabela 5: Valores de exatidão e precisão intra e inter-ensaio do método analítico para a latanoprosta nas concentrações de 0,5 µg/mL; 2,0 µg/mL e 5,0 µg/mL. CV: coeficiente de variação	37
Tabela 6: Valores de recuperação da latanoprosta quantificada nas diferentes camadas da pele por extração overnight em metanol	38
Tabela 7: Tamanho médio, número de populações formadas e Pdl de dispersões de nanocápsulas formadas a partir de 10 mg de latanoprosta e quantidades variadas de policaprolactona	39
Tabela 8: Tamanho médio (nm) e Pdl de nanocápsulas de latanoprosta preparadas sem e com a adição de 5 mg de álcool polivinílico com e sem sonicação	40
Tabela 9: Resultados de tamanho médio, índice de polidispersividade e potencial zeta para nanocápsulas de latanoprosta em policaprolactona (1:1)	41
Tabela 10: Solubilidade da latanoprosta (g/L) nos diferentes meios tamponados testados	46

LISTA DE SIGLAS E ABREVIACÕES

(m/z) – razão massa-carga

AA – Alopecia Areata

AGA – Alopecia Androgênica

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária

CLAE - Cromatógrafo Líquido de Alta Eficiência

CV – Coeficiente de Variação

DAD – Detector por arranjo de diodo

DHT – Dihidrotestosterona

EC – Estrato Córneo

EE – Eficiência de Encapsulação

FDA – Food and Drug Administration

FP – Folículo Piloso

HET-CAM – Ensaio teste da membrana corioanlotoide de ovos de galinha (*hen's egg-chorioallantoic membrane test*)

HPLC – Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (*High performance Liquid Chromatography*)

ICH – International Conference of Harmonization

LAT - Latanoprostá

LC-MS – Cromatografia Líquida Acoplada à Espectrometria de massas (*Liquid Chromatography Mass Spectrometry*)

LD – Limite de Detecção

LQ – Limite de Quantificação

MEV – Microscopia Eletrônica de Varredura

PCL – Policaprolactona

PdI – Índice de Polidispersividade (*Polidispersity Index*)

PR – Pele Remanescente

RDC - Resolução da Diretoria Colegiada

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
2. OBJETIVOS	3
2.1. Objetivos específicos.....	3
3. REVISÃO DE LITERATURA	4
3.1. Morfologia da pele	4
3.2. Ciclo de crescimento capilar	5
3.3. Alopecia androgênica	8
3.4. Tratamentos para a Alopecia Androgênica	9
3.5. Latanoprosta	10
3.6. Nanotecnologia	12
4. MATERIAL	15
4.1. Fármacos, excipientes e reagentes	15
4.2. Equipamentos e outros insumos	15
5. MÉTODOS	17
5.1. Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com detecção por DAD.....	17
5.1.1. Preparo de interferentes	17
5.1.2. Seletividade	18
5.1.3. Linearidade	18
5.1.4. Precisão e Exatidão	19
5.1.5. Limite de Detecção (LD) e Limite de Quantificação (LQ).....	19
5.2. Cromatografia Líquida acoplada à Espectrometria de Massas	20
5.2.1. Seletividade	20
5.2.2. Linearidade	21
5.2.3. Precisão e Exatidão	21
5.2.4. Limite de detecção (LD) e Limite de quantificação (LQ).....	22
5.2.5. Estudos de recuperação	22
5.3. Desenvolvimento de nanocápsulas poliméricas contendo latanoprosta	23
5.4. Caracterização das nanocápsulas poliméricas contendo latanoprosta	23
5.4.1. Tamanho médio, Índice de Polidispersividade e Potencial Zeta	23
5.4.2. Morfologia.....	23

5.4.3. Eficiência de encapsulação.....	24
5.5. Estabilidade das nanocápsulas poliméricas contendo latanoprosta	24
5.6. Estudos de solubilidade da latanoprosta	25
5.7. Estudos <i>in vitro</i> de liberação da latanoprosta a partir das nanocápsulas	25
5.8. Estudos <i>in vitro</i> de permeação cutânea da latanoprosta a partir da dispersão de nanocápsulas	26
5.9. Avaliação <i>in vitro</i> do potencial irritativo das nanocápsulas	26
5.10. Análise dos dados	27
6. RESULTADOS E DISCUSSÃO	28
6.1. Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com Detecção por DAD	28
6.1.1. Ajuste de parâmetros cromatográficos	28
6.1.2. Seletividade	39
6.1.3. Linearidade	30
6.1.4. Precisão e Exatidão.....	30
6.1.5. Limite de Detecção (LD) e Limite de Quantificação (LQ)	31
6.2. Cromatografia Líquida acoplada à Espectrometria de Massas	32
6.2.1. Seletividade e Linearidade	32
6.2.2. Limite de Detecção (LD) e Limite de Quantificação (LQ)	35
6.2.3. Precisão e Exatidão	36
6.2.4. Estudos de recuperação	37
6.3. Desenvolvimento de nanocápsulas poliméricas contendo latanoprosta	38
6.4. Caracterização das nanocápsulas poliméricas contendo latanoprosta	41
6.5. Avaliação da estabilidade das nanocápsulas	42
6.6. Estudos de solubilidade da latanoprosta	45
6.7. Estudos <i>in vitro</i> de liberação da latanoprosta	47
6.8. Estudos <i>in vitro</i> de permeação cutânea da latanoprosta	48
6.9. Avaliação <i>in vitro</i> do potencial irritativo das nanocápsulas	50
7. CONCLUSÕES	52
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	53

1. INTRODUÇÃO

A alopecia é uma doença com causas e origens variadas que atinge os folículos capilares fazendo com que se diminuam progressivamente a produção de fios de cabelo (CHANDRASHEKAR *et al.*, 2015). Dentre os tipos mais comuns de alopecia pode-se citar o eflúvio telógeno, alopecia areata e alopecia androgênica.

A alopecia androgênica, que é também conhecida como alopecia hereditária ou calvície masculina, é o tipo mais comum de perda de cabelos, que pode atingir homens e mulheres na idade adulta. Esse tipo de calvície ocorre por meio da atividade da dihidrotestosterona (DHT), que é um metabólito mais ativo do hormônio testosterona, presente em maior quantidade em indivíduos geneticamente predispostos a esta condição. Assim, o DHT liga-se a células do bulbo dos folículos capilares estimulando-as a cessar a produção dos fios (DEY-RAO *et al.*, 2017). De fato, ao se analisar os fios em alopecia androgênica, observa-se uma progressiva diminuição da fase anágena, que corresponde à fase crescimento capilar, e o alongamento da fase telógena, que é a fase de involução dos fios, acarretando em um decréscimo da taxa anágena/telógena e eventualmente na perda de fios (CHOI *et al.*, 2015).

Atualmente, os tratamentos medicamentosos reconhecidos pelo FDA (*Food and Drugs Administration*) para tratamento da alopecia são feitos à base dos fármacos minoxidil e finasterida (AREEJ *et al.*, 2017). A finasterida atua como um bloqueador da enzima 5-alfa-redutase, impedindo a conversão de testosterona em DHT que, como descrito anteriormente, é o hormônio responsável por estimular a perda capilar (AIZPURUA *et al.*, 2014). Apesar de ter eficiência comprovada, os medicamentos à base de finasterida disponíveis são apenas para uso oral e restritos a homens, e trazem diversos efeitos adversos, como perda de libido, disfunção erétil, diminuição do volume da ejaculação, aumento do volume e da sensibilidade das mamas, edema labial e erupções cutâneas (ROWLAND *et al.*, 2018).

Já os tratamentos à base de minoxidil são apenas tópicos, visto que o fármaco atua sistemicamente como vasodilatador. O minoxidil ($\log P = 1,24$) topicamente aplicado age dilatando os vasos sanguíneos que nutrem os folículos pilosos melhoram a qualidade dos

fiões, retardando sua passagem precoce para a fase telógena. Apesar de apresentarem altas taxas de sucesso na atenuação da calvície, as formulações de minoxidil disponíveis no mercado contêm altas concentrações de etanol ou outros solventes orgânicos e são, portanto, irritantes à pele (FANG *et al.*, 2014). Esses solventes estão presentes nas formulações devido à baixa solubilidade aquosa do fármaco. Além disso, o sucesso da terapia com este fármaco exige uso contínuo e, quando o paciente suspende sua utilização, os efeitos de redução do crescimento capilar retornam. Assim, os estudos para se inserir novas moléculas e formulações eficientes para o tratamento da alopecia são altamente demandados.

Recentes descobertas mostraram que colírios usados no tratamento de glaucoma aumentavam o crescimento dos cílios do paciente (VAÑO-GALVÁN, S. CAMACHO, F., 2017). Esses medicamentos continham análogos de prostaglandina F2 alfa, que seriam os responsáveis por esse efeito colateral. A latanoprostá é uma dessas substâncias que já mostrou por meio de estudos clínicos aumentar significativamente a densidade capilar de pacientes calvos se comparados a pacientes que fizeram uso de placebo (CHOI *et al.*, 2015). No entanto, por se tratar de uma molécula ainda mais lipofílica ($\log P = 4,3$) que o minoxidil, as formulações magistrais contendo latanoprostá também demandam a adição de altas concentrações de co-solventes como etanol e propilenoglicol, permanecendo o problema de irritação cutânea com o uso contínuo do produto.

Considerando essas questões farmacotécnicas e o alvo de ação da latanoprostá, que é a região dos folículos pilosos, considerou-se neste trabalho o desenvolvimento de nanocápsulas para incorporar este fármaco oleoso, pois essas nanoestruturas têm se mostrado capazes de se acumularem preferencialmente nos folículos pilosos e aumentarem penetração de fármacos nessas estruturas da pele (ALJJUFFALI *et al.*, 2014; MATOS *et al.*, 2015; SILVA *et al.*, 2019). Além disso, por serem partículas de dimensões nanométricas, os sistemas coloidais resultantes de sua dispersão em água possuem estabilidade física e evitam o uso de adjuvantes irritantes na formulação, como álcoois e tensoativos (PEREIRA *et al.*, 2018; USHIROBIRA *et al.*, 2020).

2. OBJETIVO

Este trabalho teve como objetivo desenvolver, caracterizar e avaliar o desempenho de uma formulação baseada em nanocápsulas poliméricas contendo latanoprosta como uma alternativa no tratamento tópico da alopecia androgênica.

2.1. Objetivos Específicos

- Padronizar e validar métodos analíticos seletivos para doseamento de latanoprosta em formulações farmacêuticas e matrizes cutâneas;
- Desenvolver e caracterizar nanocápsulas poliméricas contendo latanoprosta;
- Avaliar a estabilidade físico-química das dispersões de nanocápsulas poliméricas contendo a latanoprosta;
- Avaliar a liberação da latanoprosta a partir das nanocápsulas;
- Determinar o perfil de penetração cutânea do fármaco a partir do sistema desenvolvido;
- Verificar o potencial de irritação causado pela formulação das nanocápsulas de latanoprosta.

3. REVISÃO DA LITERATURA

3.1. Morfologia da pele

A pele, considerada o maior órgão do corpo humano com área superficial de 1,5 a 2,0 m², é dividida em três camadas - epiderme, derme e hipoderme (Figura 1). Como parte do sistema tegumentar, a pele recobre o corpo protegendo-o contra atritos, perda de água, radiação ultravioleta e invasão de micro-organismos. A pele também tem um papel importante na percepção sensorial, na termorregulação, excreção de íons e síntese de vitamina D (LOWE & ANDERSON, 2015; JUNQUEIRA & CARNEIRO, 2013; OVALLE & NAHIRNEY, 2008; CHU, 2012).

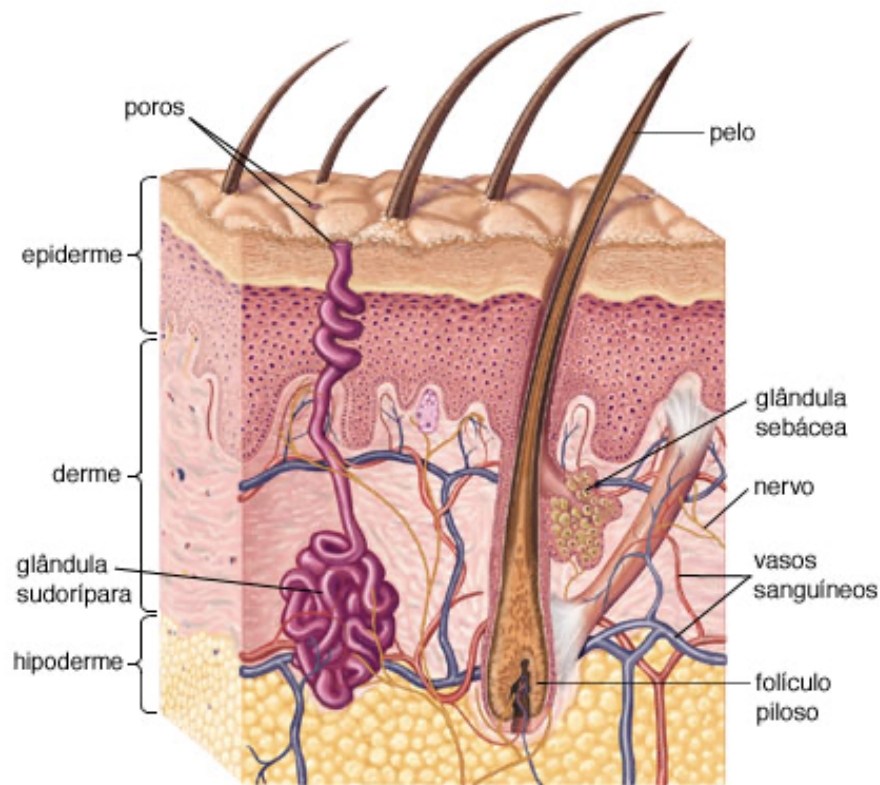


Figura 1: Morfologia da pele (Encyclopaedia Britannica, Inc, 2010).

A epiderme, camada mais superficial da pele, é composta por quatro camadas celulares. A basal é a mais profunda e responsável pela renovação celular da epiderme. Apresenta também células produtoras de melanina e células responsáveis pelas respostas sensoriais.

A camada espinhosa contém células de Langerhans que tem papel essencial na ativação da resposta imunológica. A granulosa é responsável pela formação de queratina, e síntese de lipídeos (KHAVKIN, 2011). Por último a camada mais externa da epiderme, a camada córnea (estrato córneo), contém células queratinizadas organizadas em estruturas lamelares envoltas por uma matriz lipídica, o que faz com que esta camada seja a principal barreira à penetração cutânea de fármacos (MADISON, 2003) (BARONI *et al.*, 2012).

A derme, composta por tecido conjuntivo, se encontra abaixo da epiderme e acima da hipoderme. Esta camada tem papel essencial fornecendo apoio estrutural e nutricional à epiderme e pode ser dividida em duas camadas: papilar e reticular. Na camada papilar, formada por tecido conjuntivo frouxo, se encontram fibras elásticas, fibras reticulares e colágeno. Por sua vez, na camada reticular, formada por tecido conjuntivo denso, se encontram vasos sanguíneos, fibroblastos, vasos linfáticos e terminações nervosas. No entanto, as duas camadas são irrigadas por vasos sanguíneos e linfáticos. Na derme pode-se observar invaginações da epiderme que formam os anexos cutâneos, que são os folículos pilosos, glândulas sebáceas e glândulas sudoríparas (HARRIS, 2009; TANG, 2010; (MENON, 2002).

Por fim, a hipoderme, que é formada por tecido conjuntivo frouxo e adiposo, tem a função de proteger a pele de impactos mecânicos e atuar como reserva energética e isolante térmico. Esta camada também se subdivide em outras duas: areolar e lamelar. Na camada areolar encontram-se adipócitos globulares e volumosos, enquanto na camada lamelar observa-se um aumento de espessura causado pelos adipócitos que invadem a fáscia superficial. Na hipoderme também pode-se encontrar invaginações de epiderme que originam os folículos pilosos (GARTNER & HIATT, 2007; SAMPAIO & RIVITTI, 2007).

3.2. Ciclo de crescimento capilar

O folículo piloso é uma estrutura dérmica que tem como função revestir e produzir o fio capilar. A atividade de todo o folículo piloso é controlada por populações de células-tronco localizadas principalmente na região de projeção local de inserção do músculo *arrector pili* e em uma estrutura morfológicamente distinta abaixo dessa região conhecida como germe capilar (CALVO-SÁNCHEZ *et al.*, 2019).

O folículo pode ser dividido em três partes: inferior, meio e superior (Figura 2). A parte inferior, corresponde a área da base do folículo até a inserção do músculo *arrector pili* e contém o bulbo e o suprabulbo (região entre o bulbo e o istmo). No bulbo capilar, se localizam estruturas vasculares e nervosas, além das células responsáveis por regular o crescimento dos fios e fazer a manutenção capilar (CORRÊA, 2012). A parte do meio é curta e abrange desde a inserção do músculo *arrector pili* até o canal do ducto da glândula sebácea. Assim, a parte superior vai do canal da glândula sebácea até o orifício folicular (PARK *et al.*, 2018).

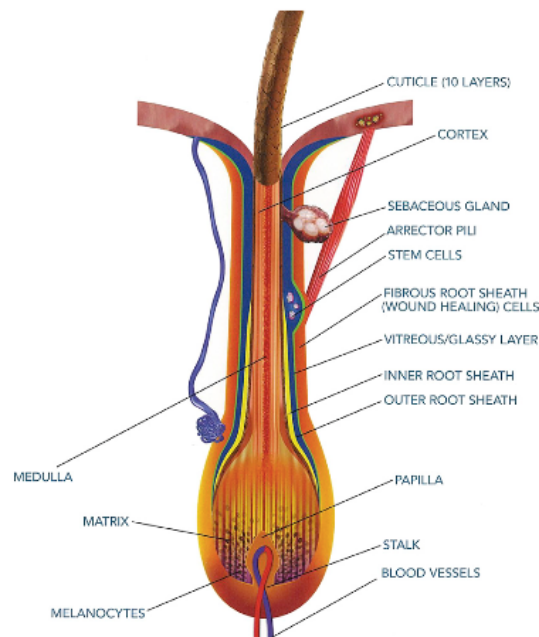


Figura 2: Anatomia do folículo piloso (PARK *et al.*, 2018).

Os fios de cabelo podem crescer individualmente no folículo ou em grupos que podem ir de 2 a 5 fios. Esses grupos são chamados unidades foliculares. Cada fio é composto por três regiões principais: medula, córtex e cutícula. A medula é a camada mais interna do fio e além de células, contém espaços vazios que podem variar entre os diferentes tipos de cabelo. Entre a medula e a cutícula, encontra-se o córtex, que é responsável por garantir força mecânica ao eixo do cabelo. Por fim, tem-se a cutícula, esta possui de 3 a 4 mm de espessura, e é responsável por proteger o córtex e refletir a luz, dando brilho e aparência saudável aos cabelos (PARK *et al.*, 2018).

O ciclo de crescimento dos fios é resultado da proliferação e diferenciação das células tronco epiteliais e pelas células geminais do folículo piloso (Figura 3). Neste ciclo, estão presentes três fases e quando estas não se comportam como esperado é possível se observar um crescimento mais rápido que o natural dos fios ou perda de densidade capilar.

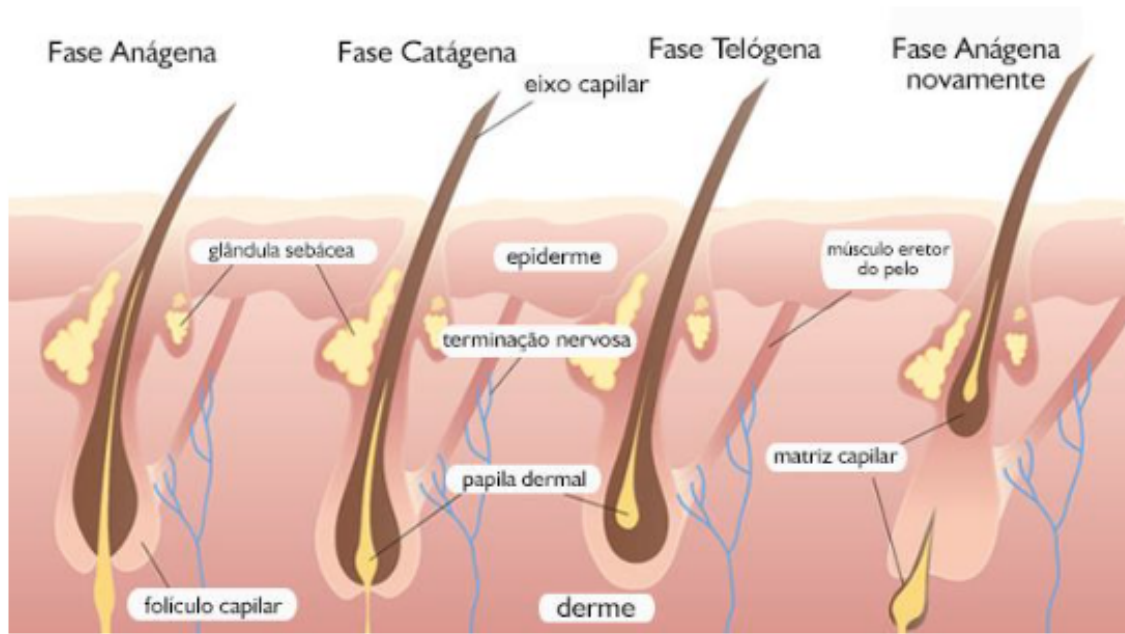


Figura 3: Ciclo de crescimento dos fios capilares. Fonte: adaptado de <https://www.superdicasartvitta.com.br/2017/03/ciclo-de-vida-do-cabelo/>.

A primeira fase do ciclo de crescimento capilar se denomina fase anágena. Nela, o pelo desenvolve seus padrões de atividade mitótica. A duração dessa fase varia para cada indivíduo de acordo com suas características genéticas, mas em média vai de 2 a 6 anos com um crescimento em torno de 0,3 mm/dia. Cerca de 85% dos pelos do couro cabeludo estão na fase anágena, já em outras áreas como cílios e sobrancelhas o ciclo é mais curto e essa fase dura em torno de 30 dias (THOM, 2016; GAMONAL, 1999).

Após a primeira fase, tem-se uma fase de transição chamada fase catágena onde os pelos param de crescer para começar uma substituição. Aqui, o segmento inferior do folículo se diminui por causa da apoptose do epitélio folicular, reduzindo o seu tamanho. Sua duração é curta, indo de 2 a 3 semanas, e apenas 3% dos folículos do couro cabeludo se encontram nessa fase (RESTREPO, 2010).

A última fase do ciclo capilar, denominada fase telógena, ocorre quando se encerra toda a atividade mitótica de crescimento. Essa fase dura em torno de 3 meses e apenas 15% dos pelos do couro cabeludo se encontram nessa fase. Ao seu final, o fio é expulso por um outro fio que está crescendo. O ser humano perde de 25 a 100 fios por dias em decorrência dessa fase (RESTREPO, 2010; GAMONAL, 1999).

O ciclo de crescimento capilar pode sofrer variações por diversos motivos ao longo da vida de um indivíduo, a saber: gravidez, desnutrição, efeitos adversos de medicamentos, questões hormonais e genética. Neste trabalho discutiremos a alteração do ciclo de crescimento capilar devido a fatores atrelados e genética e ação de hormônios de um indivíduo denominada alopecia androgênica (THOM, 2016).

3.3. Alopecia androgênica

Em geral, define-se como alopecia a condição clínica causada por diversos fatores, que acarreta a queda capilar. Como sugere o nome, a alopecia androgênica se dá por uma influência do hormônio masculino testosterona causando sensibilidade aos folículos pilosos devido a uma herança genética no indivíduo. Por isso, esta geralmente se apresenta em maior frequência em homens se iniciando no final da adolescência e início da fase adulta, ganhando expressividade na meia idade. A doença também atinge um número expressivo de mulheres na fase adulta. Essa alopecia geralmente se inicia com recessões bilaterais frontais na cabeça, ao progredir, essas áreas afetadas podem se juntar formando uma coroa (JAY *et al.*, 2015).

Embora ainda existam fatos a serem descobertos sobre a decorrência de alopecia androgênica, é sabido que a ação de DHT em excesso nos folículos pilosos causa um encurtamento da fase anágena no ciclo de crescimento capilar e um aumento da expressividade da fase telógena. Com o passar dos ciclos, os folículos produzem fios menores, mais finos e menos pigmentados e, em determinado momento, o folículo fica incapaz de produzir um fio que alcance a superfície do couro cabeludo (GOMES, 2012; LIANG *et al.*, 2018).

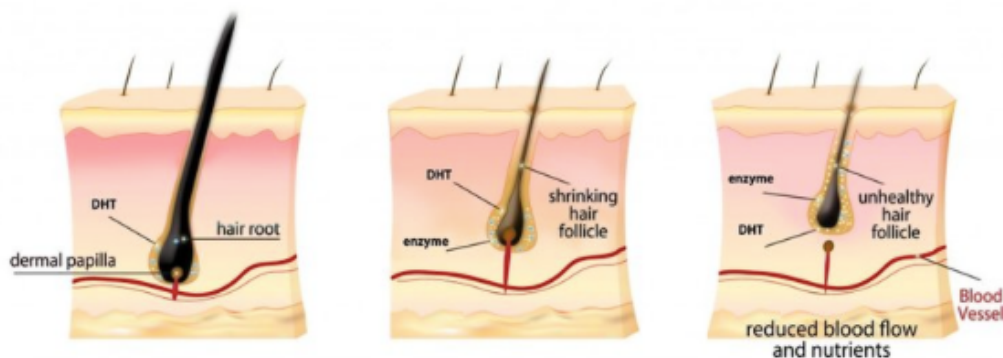


Figura 4: Ação da DHT nos folículos pilosos. Fonte: adaptado de <http://www.brदानutricao.com.br/dihidrotestosterona-dht>.

Embora apresente poucos efeitos na fisiologia do corpo, esta doença apresenta muitos efeitos psicológicos e psicossociais afetando a autoestima do paciente podendo causar até mesmo depressão. Quando esta afeta mulheres, os efeitos são ainda mais expressivos, devido à conceitos culturais (ROWLAND *et al.*, 2018). Aproximadamente 50% dos homens em torno dos 50 anos são afetados pela alopecia. Já em mulheres com a mesma idade, a doença afeta em torno de 20 a 30% (JAY *et al.*, 2015).

3.4. Tratamentos para a Alopecia Androgênica

Diversos tratamentos para a doença são propostos, desde medicamentos, terapias e até mesmo implantes capilares. Medicamentos se encontram entre os tratamentos de mais fácil acesso e ainda com eficácia comprovada. Estes podem vir em formulações de uso tópico como minoxidil ou formulações orais como a finasterida - que atualmente são as classes de medicamentos mais usados no tratamento desta alopecia.

Medicamentos à base de minoxidil são citados com frequência neste tratamento. Este pode ser usado em formulações tópicas ajudando na diminuição da queda de cabelo e algumas vezes até promovendo a retomada de crescimento capilar. Em contrapartida, comumente os usuários de minoxidil reportam irritação no local de aplicação, sinais de impotência sexual e no início do tratamento podem apresentar uma pequena queda de cabelo que depois é administrada com o uso contínuo da medicação (JAY *et al.*, 2015).

Outros medicamentos amplamente conhecidos são os à base de finasterida, e estes são os únicos permitidos pelo FDA para o tratamento oral de alopecia androgênica em homens. Já para mulheres, o uso deste medicamento não é indicado pelo FDA. Em mulheres gestantes, a finasterida pode gerar um efeito embriototeratogênico acarretando a feminização do feto, enquanto nas mulheres na pós-menopausa a finasterida parece ser eficaz apenas em altas doses o que poderia desregular os níveis hormonais da paciente (JAY *et al.*, 2015). Estes medicamentos atuam bloqueando o tipo II 5 α -reductase, não permitindo que a testosterona se transforme em DHT. Os efeitos adversos mais comuns devido ao uso de finasterida são redução de libido, disfunção erétil e diminuição no volume de ejaculação (ROWLAND *et al.*, 2018).

3.5. Latanoprosta

Análogos de prostaglandinas atuam como bloqueadores de receptores beta e vem sendo muito eficazes na redução da pressão interna ocular de pacientes com glaucoma (MOUSSA *et al.*, 2018; YOUNUS *et al.*, 2018). Em 1996, a latanoprosta, que é um desses análogos que aumenta a saída uveoscleral, foi aprovada pelo FDA para o uso em colírios para pacientes adultos (MOUSSA *et al.*, 2018; YOUNUS *et al.*, 2018). No entanto, o seu uso, assim como o de outros análogos de prostaglandinas em colírios apresentou alguns efeitos adversos como hiperemia conjuntival, aumento da pigmentação da íris, pigmentação palpebral e curiosamente o aumento dos cílios do paciente, fazendo com que esses fármacos fossem agora estudados para outros fins. Acredita-se hoje que esses betabloqueadores estão envolvidos em um mecanismo complexo abrangendo o controle do ciclo de crescimento e diferenciação capilar. Isso se explicaria no fato de que a maior parte das células capilares são influenciadas pelo metabolismo das prostaglandinas e células presentes no bulbo dos folículos pilosos apresentam receptores para estes hormônios (SAYED *et al.*, 2019).

Um estudo com 20 pacientes, onde 10 deles estavam em tratamento quimioterápico, apresentou resultados estatisticamente significativos no aumento dos cílios, na pigmentação e espessura dos fios (SMITH *et al.*, 2018). Um outro estudo com 130 pacientes de quimioterapia em que foi feito o uso contínuo da medicação por 12 meses

também apresentou resultados proeminentes no aumento da densidade capilar dos pacientes (SMITH *et al.*, 2018).

Também foram feitos testes em pacientes que sofriam de alopecia com diversas origens. Um estudo com pacientes portadores de eflúvio telógeno e alopecia androgênica mostraram resultados eficazes no controle da queda capilar e no aumento total de fios com o uso de formulação contendo 0,005% de latanoprost (BLOCH *et al.*, 2018; XU *et al.*, 2019). Um outro estudo duplo cego com placebo e controle foi feito com 16 homens com alopecia androgênica. Um tratamento diário com formulação tópica contendo 0,01% de latanoprost em solução foi realizado no lado direito ou esquerdo da recessão frontal capilar. Após 24 semanas o lado tratado com latanoprost apresentou um aumento significativo de densidade capilar comparado à linha de base ($p < 0,001$) e placebo ($p = 0,0004$), evidenciando a efetividade do fármaco no tratamento da alopecia (CHOI *et al.*, 2015).

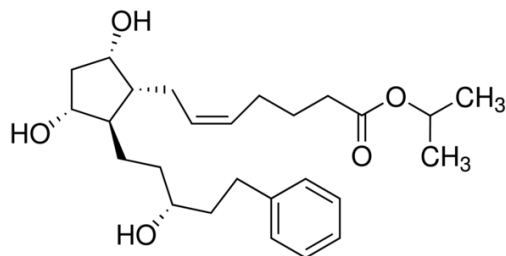


Figura 5: Estrutura química da latanoprost. $pK_a = 4,88$; $\log P = 4,28$; massa molar = 432,6 g/mol; solubilidade em água = 12,9 $\mu\text{g/mL}$ (MERCK, 2020; PUBCHEM, 2020).

Prostaglandinas em geral são importantes mediadores lipídicos em processos inflamatórios, que também exercem funções importantes na manutenção homeostática (DUNCAN *et al.*, 2018). A latanoprost (Figura 5) é um fármaco lipofílico e se apresenta na forma de um óleo, o que dificulta sua solubilização em água e sua penetração na pele. Essa característica, pode fazer com que formulações a base de latanoprost fiquem associadas ao estrato córneo, que como mencionado anteriormente, é uma camada altamente lipofílica que impede a penetração cutânea de vários fármacos. Comumente é feito o uso de co-solventes (etanol, propilenoglicol) e agentes solubilizantes para administrar esse problema. No entanto essa alternativa geralmente ocasiona irritação

cutânea quando usados em formulações tópicas (NATARAJAN *et al.*, 2012). Assim, o objetivo deste trabalho é preparar nanoestruturas contendo o fármaco como ferramenta no desenvolvimento de formulações livres de solventes orgânicos e que possibilitem a administração da latanoprost de forma segura ao paciente e mais efetiva.

3.6. Nanotecnologia

De acordo com a *European Medicines Agency* (EMA), a nanotecnologia se define pelo uso de estruturas menores de 1000 nm de diâmetro, com propriedades específicas. Visa-se com o uso da nanotecnologia a oferecer vantagens na aplicação de um fármaco devido ao aumento na área de superfície em relação ao seu volume. Assim, atuam como nanocarreadores transportando o fármaco, que pode ser encapsulado por diversos mecanismos, para um sítio ativo específico, onde exercerá uma atividade terapêutica. Nanopartículas tendem a apresentar-se de forma estável. Suas partículas menores e mais leves acarretam num movimento browniano mais vigoroso impedindo que estas se aglomerem e depositem no fundo do recipiente que as contém (HWANG *et al.*, 2008) (DIMER *et al.*, 2013).

Nanopartículas poliméricas são uma ótima aplicação da tecnologia porque podem oferecer alternativas de alta biocompatibilidade, baixa toxicidade, capacidade imunogênica e ainda biodegradáveis. Estas funcionam como sistemas coloidais podendo ser formadas por polímeros naturais ou sintéticos. Nanopartículas são de grande importância para farmácia, devido ao seu papel na liberação controlada de fármacos, se mostrando compatíveis com diversas moléculas e tecidos do corpo humano. Essas também se apresentam diminuindo a degradação dos princípios ativos em seu interior, aumentando sua meia-vida de prateleira e no organismo (DIMER *et al.*, 2013; FORMIGA *et al.*, 2009).

As nanopartículas poliméricas podem ser divididas em dois grandes grupos. Os sistemas matriciais, em que o fármaco se encontra distribuído uniformemente em seu núcleo, são denominados nanoesferas. Já os sistemas vesiculares, que têm o fármaco concentrado no interior do núcleo, geralmente dissolvidos em um solvente oleoso, são chamados de nanocápsulas (Figura 4) Assim, a presença de óleos nas nanocápsulas leva à formação de uma estrutura vesicular, enquanto a ausência de óleo nas nanoesferas fornece

uma organização matricial das cadeias poliméricas (DIMER *et al.*, 2013; GUTERRES *et al.*, 2007).

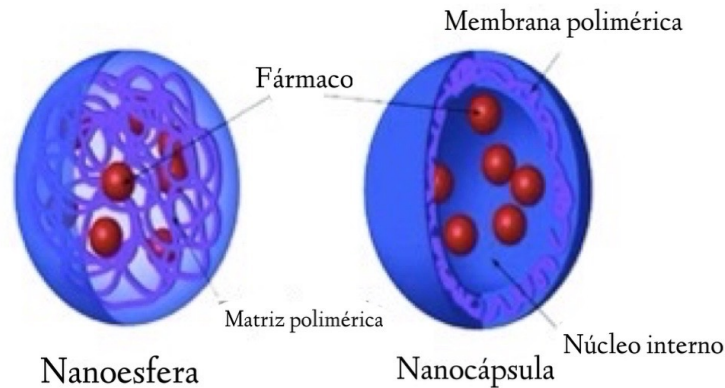


Figura 6: Diferença entre o sistema matricial (nanoesferas) e o sistema vesicular (nanocápsulas) (Nanomedicine (2010) Future Medicine Ltd).

As nanocápsulas são, portanto, uma boa alternativa para a veiculação de altas concentrações de fármacos lipofílicos, como é o caso da latanoprost. Além de serem capazes de dispersar o fármaco em um meio aquoso (MHLWATIKA *et al.*, 2018), e melhorar sua estabilidade e controlar sua liberação, esse tipo de nanoestrutura também é capaz de transpassar camadas da pele fazendo com que o fármaco atinja efetivamente o seu alvo terapêutico (DADWAL *et al.*, 2018). Quando o uso de nanopartículas é associado a estímulo mecânico a entrega do fármaco para o seu alvo de ação pode ser ainda maior (LEITE-SILVA *et al.*, 2012). Um estudo mostrou que uma formulação contendo nanopartículas poliméricas foi capaz de manter dez vezes mais fármaco estável nos folículos comparada a uma solução tradicional (LADEMANN *et al.*, 2008).

Neste trabalho, optou-se por utilizar a policaprolactona (PCL) no preparo das nanocápsulas de latanoprost. Trata-se de um polímero semicristalino e alifático comumente utilizado em formulações de nanocápsulas devido a sua alta biocompatibilidade, baixa imunogenicidade e por ser biodegradável (SEPÚLVEDA *et al.*, 2016). Sua biocompatibilidade se deve a hidrólise que sofre em sua metabolização gerando ácido 6- hidroxilcaproico e a Acetil-CoA, podendo ser eliminados do corpo (WOODRUFF; HUTMACHER, 2010).

Nanocápsulas de PCL também já demonstraram boa estabilidade frente a alguns outros polímeros como o poli ácido láctico-co-glicólico (PLGA), aumentando a meia-vida dos fármacos encapsulados. Essa característica é muito importante no uso de medicamentos que precisam apresentar uma liberação controlada (FORMIGA *et al.*, 2009).

A PCL é aprovada pela agência americana *Food and Drug Administration* (FDA) para ser usado em propósitos biomédicos. Apresenta um baixo ponto de fusão de (60°C) e uma alta temperatura de decomposição (350°C). Esta também apresenta uma alta solubilidade em compostos orgânicos permitindo a obtenção de boas nanopartículas (PEÑA *et al.*, 2015).

Considerando que existe muito espaço para a pesquisa envolvendo nanotecnologia no tratamento tópico de alopecia, e que não há publicado nenhum estudo que proponha a aplicação de nanocápsulas poliméricas para a administração tópica da latanoprost, o presente trabalho visa a contribuir para o crescimento de conhecimento nessa área.

4. MATERIAL

4.1. Fármacos, excipientes e solventes

A latanoprostina foi gentilmente cedida pela Aché Laboratórios Farmacêuticos (São Paulo, Brasil). Seu padrão analítico foi adquirido da Sigma-Aldrich (Steinheim, Alemanha). Para o desenvolvimento das nanocápsulas, foi utilizado o polímero policaprolactona adquirido da Sigma-Aldrich (Steinheim, Alemanha), álcool polivinílico também adquirido da Sigma-Aldrich (Steinheim, Alemanha), Tween 80 e diclorometano adquiridos da Dinâmica (Campinas, Brasil). Para o preparo da solução tampão foram utilizados o fosfato de sódio monobásico, o fosfato de sódio dibásico e o cloreto de sódio todos adquiridos pela Dinâmica (Campinas, Brasil).

Metanol e acetonitrila, ambos de grau HPLC foram adquiridos da J.T.Baker (Philisburgh, Estados Unidos). O ácido fórmico grau HPLC usado na fase móvel dos testes realizados no LC-MS foi adquirido da Sigma-Aldrich (Steinheim, Alemanha). A água ultrapura foi obtida através de um sistema Mili-Q da Millipore (Illkirch Graffenstaden, França).

4.2. Equipamentos e outros insumos

Para a detecção e quantificação da latanoprostina foram utilizados um cromatógrafo líquido de alta eficiência (CLAE) LC 20-AD e um cromatógrafo líquido acoplado ao espectrômetro de massas (LC-MS) modelo 2020, ambos da Shimadzu (Kyoto, Japão).

O cromatógrafo líquido de alta eficiência que compõe os dois sistemas é composto por duas bombas (modelo LC 20-AT), um injetor automático (modelo 9SIL-20AD) e forno (modelo CTO- 20AS), acoplados a um detector espectrofotométrico (modelo SPD-M20A). Conectado ao LC-MS foi usado um gerador de gás nitrogênio modelo Genius NM32LA (Peak Scientific, Reino Unido) e bomba de vácuo mecânica (Edwards, Burgees Hill, Inglaterra), com fonte de ionização dual-spray, atuando no modo de ionização positivo por electrospray (ESI+), acoplado à sistema de cromatografia líquida. A aquisição de dados foi realizada utilizando o software *Shimadzu LC Solution*. Para a fase estacionária, utilizou-se uma coluna de fase reversa C18 (4,6mm x 150mm; Shim-pack, Shimadzu).

Para o desenvolvimento das nanocápsulas foi utilizada uma balança analítica da Shimadzu, um rotaevaporador do Laboratório de Ensaios Químicos em Farmácia do Departamento de Farmácia da UnB e um sonicador da VibraCell. Para a sua caracterização foram utilizados um Zetasizer Nano series da Malvern, uma centrífuga da KASVI e um microscópio eletrônico de varredura - MEV Jeol JSM-7000F do Instituto de Biologia da UnB.

Para os testes de diferencial *tape-stripping* foi utilizada uma cola de cianocrilato da Super Bonder (Locctite, São Paulo, Brasil) e uma fita Scotch n°845 Book Tape – 3M, EUA.

Para os ensaios de liberação e permeação foram utilizadas células de difusão verticais do tipo Franz do próprio laboratório. Para os testes de liberação foram ainda utilizadas membranas de nitrocelulose (filtro 0,1um) da Millipore e para os de permeação foi utilizada pele retirada de orelhas de porco, obtidas do Frigorífico Sabugy (Planaltina, Brasil) logo após o abate dos animais.

5. MÉTODOS

Dois métodos analíticos utilizados neste trabalho foram validados seguindo os padrões *International Conference of Harmonisation* (ICH) e RDC N°166, de 24 de julho de 2017 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). O primeiro deles foi utilizando Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com detecção por DAD/UV para quantificação do fármaco em praticamente todos os experimentos, exceto aqueles com interferentes da pele, para os quais utilizou-se Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com detecção em massas (LC-MS).

5.1. Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com detecção por DAD

A latanoprostá foi analisada seguindo-se um método analítico para cromatografia líquida de alta eficiência proposto por PATEL *et al.* (2015). A fase móvel foi composta por uma mistura de acetonitrila:água ultrapura (60:40) (v/v). A vazão de eluição da fase móvel foi igual a 1 mL/min, o volume de injeção das amostras igual a 20 µL e o forno mantinha a temperatura da coluna cromatográfica a 40°C.

Para essa determinação, foram feitas inicialmente varreduras de uma solução de latanoprostá em metanol a 10 µg/mL, fazendo-se ajustes para se obter o comprimento de onda onde se encontraria um pico uniforme e sem interferentes partindo-se dos dados descritos na literatura (PATEL *et al.*, 2015). A partir de então, o método proposto foi validado, avaliando-se parâmetros de seletividade, linearidade, precisão, exatidão e sensibilidade (limites de detecção e de quantificação).

5.1.1. Preparo de interferentes

Os interferentes da pele foram preparados da seguinte forma: a orelha de porco foi lavada em água corrente, e a pele retirada da cartilagem com auxílio de uma lâmina e uma tesoura. O tecido subcutâneo gorduroso foi então removido com o auxílio da tesoura. A pele foi então cortada em pedaços redondos de aproximadamente 3,5 cm de diâmetro. Para separar o estrato córneo, dez pedaços quadrados de fita adesiva foram colados e retirados da superfície da pele e armazenados em um frasco de vidro para a extração. Para a retirada do folículo piloso, três gotas de cola de cianoacrilato foram adicionadas à pele que já teve

seu estrato córneo retirado e então um pedaço de fita adesiva foi colocado sobre a cola e após a secagem, retirada em um único movimento. Esse processo foi repetido e as duas fitas com a cola foram transferidas para um frasco de vidro. Por último a pele remanescente foi cortada em pequenos pedaços e transferida para um terceiro frasco. Adicionou-se, então, 5 mL de metanol a cada frasco com fita ou pele vedando-se bem o vidro para que o solvente não evaporasse. A extração durou 15 h e foi realizada sem agitação. Após esse período, as soluções foram filtradas e utilizadas para contaminar as soluções de fármaco.

Para as análises com os interferentes presentes nas nanocápsulas de latanoprost, foi feita uma formulação contendo as nanocápsulas vazias, ou seja, sem o fármaco. Para isso, usou-se uma fase aquosa com 5 mg de álcool polivinílico e 80 mg de Tween 80 dissolvidos em 15 mL de água ultrapura. Usou-se também uma fase orgânica com 10 mg de policaprolactona dissolvidos em 4 mL de diclorometano. Gotejou-se lentamente a fase orgânica na fase aquosa enquanto esta era agitada para que a dispersão de nanocápsulas fosse formada. Uma vez terminado este processo, o diclorometano foi evaporado com o auxílio de um rotaevaporador a 35°C por 15 min.

5.1.2. Seletividade

A seletividade do método para a latanoprost em relação aos possíveis interferentes (camadas da pele e excipientes das nanocápsulas) foi inicialmente avaliada. Para isso, foi analisado em sextuplicata soluções metanólicas de latanoprost a 10 µg/mL sozinhas ou contaminadas com alíquotas de 100 µL dos possíveis interferentes em questão. Observou-se então se os valores de precisão e exatidão para concentração mensurada das amostras contaminadas comparadas as não contaminadas eram aceitáveis de acordo com as normas vigentes (ICH e RDC N°166, 2017 - ANVISA).

5.1.3. Linearidade

Obteve-se uma curva analítica que relacionava as concentrações de latanoprost com as áreas dos picos obtidos pelo equipamento de cromatografia líquida. Para tal, uma solução mãe de 50 µg/mL de latanoprost foi diluída em metanol para sete concentrações (0,5 µg/mL; 2,0 µg/mL; 5,0 µg/mL; 10,0 µg/mL; 15,0 µg/mL 20,0 µg/mL e 25 µg/mL),

que foram levadas ao equipamento para análise. As diluições foram preparadas em triplicata para cada concentração a partir de três soluções mãe independentes. As áreas dos picos correspondentes a cada concentração foram usadas para se obter a curva analítica, com sua respectiva equação linear. A linearidade foi determinada a partir do coeficiente de correlação linear calculado para a curva obtida.

5.1.4. Precisão e Exatidão

Para a avaliação desses parâmetros, dois analistas diferentes em dois dias diferentes fizeram a análise cromatográfica de soluções em três concentrações diferentes da curva analítica (2 µg/mL; 10 µg/mL; e 20 µg/mL) cada uma em triplicata. Para medir a precisão, obteve-se o coeficiente de variação (*CV*) dividindo-se o desvio padrão da média das leituras (σ) por sua média (*m*) e multiplicando-se por 100, como demonstra a Equação 1 (ANVISA - RE no 899):

$$CV = \frac{\sigma}{m} \times 100$$

Equação 1

Para medir a exatidão dividiu-se a concentração obtida para cada análise pela concentração teórica e multiplicou-se por 100, como demonstra a Equação 2 (ANVISA - RE no 899):

$$\text{Exatidão} = \frac{\text{Concentração obtida}}{\text{Concentração teórica}} \times 100$$

Equação 2

5.1.5. Limite de detecção (LD) e Limite de Quantificação (LQ)

Os limites de detecção e quantificação foram medidos de forma teórica, seguindo as normas RDC N°166, a partir das três curvas analíticas obtidas conforme descrito acima. Para se determinar a menor concentração de analito presente na amostra detectável (LD),

usou-se a seguinte equação:

$$LD = \frac{3,3 \times \text{desvio padrão do coeficiente linear das curvas analíticas}}{\text{média do coeficiente angular das curvas analíticas}}$$

Equação 3

Para medir a menor quantidade do analito em uma amostra que pode ser determinada com precisão e exatidão aceitáveis (LQ), usou-se a seguinte equação:

$$LQ = \frac{10 \times \text{desvio padrão do coeficiente linear das curvas analíticas}}{\text{média do coeficiente angular das curvas analíticas}}$$

Equação 4

5.2. Cromatografia Líquida acoplada à Espectrometria de Massas

A latanoprostá extraída das camadas da pele foi analisada através de um método analítico por cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas inicialmente proposto por OLIVEIRA *et al.* (2020). A fase móvel foi composta de 0,1% (m/v) de ácido fórmico em água (A) e 0,1% (m/v) de ácido fórmico em acetonitrila (B) aplicada ao sistema de eluição por gradiente com vazão igual a 0,5 mL/min, programada como A/B = 80/20 (0,01 – 4 min), 30/70 (4,1 – 10 min), e 80/20 (10,1 – 15 min). O volume de injeção das amostras era igual a 2 µL e o forno mantinha a temperatura da coluna cromatográfica a 30°C. O método também foi validado de acordo com parâmetros de seletividade, linearidade, precisão, exatidão, sensibilidade (limites de detecção e de quantificação) e recuperação utilizando o processo de extração.

5.2.1. Seletividade

Neste método identifica-se o analito de estudo através de sua razão massa-carga (m/z) uma vez separado por cromatografia. Como essa é particular de cada analito, monitorar a razão massa-carga também é útil para verificar a seletividade do método. O espectrômetro de massas é capaz de determinar os picos correspondentes a cada espécie, sendo assim possível obter o cromatograma para cada analito a partir de uma amostra

garantindo sua seletividade (IGLESIAS, 2013; SKOOG *et al.*, 2005; OLIVEIRA *et al.*, 2020). Assim, soluções metanólicas de latanoprostá com e sem a adição dos interferentes de pele obtidos conforme descrito anteriormente (item 5.1.1) foram analisadas monitorando a razão massa-carga para a latanoprostá utilizando-se esse método e possíveis alterações na quantificação do analito foram verificados para confirmar a seletividade do método.

5.2.2. *Linearidade*

Para determinar a linearidade do método, foi considerado o efeito da matriz em que a latanoprostá se encontrava na sua detecção. Sendo assim, nesses experimentos o fármaco foi analisado na presença dos interferentes desta pesquisa. Foram feitas curvas de calibração da latanoprostá em diferentes diluentes: metanol e extrato em metanol das três camadas da pele (estrato córneo, folículo piloso e pele remanescente) obtidos por conforme descrito anteriormente (item 5.1.1)

Desenvolveram-se as quatro curvas analíticas com seis concentrações de latanoprostá (0,05 µg/mL; 0,1 µg/mL; 0,2 µg/mL; 0,5 µg/mL; 0,8 µg/mL; e 1,0 µg/mL) para se obter as áreas dos picos correspondentes a cada concentração. Avaliou-se também a significância do efeito matriz na análise do fármaco de estudo usando-se a seguinte equação:

$$Ef = \frac{S_{matriz} - S_{solvente}}{S_{solvente}} \times 100$$

Equação 5

Onde: S_{matriz} é o coeficiente angular da curva analítica da latanoprostá na matriz e $S_{solvente}$ é o coeficiente angular da curva analítica da latanoprostá no solvente.

5.2.3. *Precisão e Exatidão*

Para se determinar a precisão e a exatidão, foram realizados os mesmos ensaios realizados na validação em cromatografia líquida de alta eficiência com detecção DAD. Neste caso, no entanto, as concentrações de latanoprostá escolhidas foram menores devido

à alta sensibilidade deste método analítico (0,5 µg/mL; 2 µg/mL; e 5 µg/mL) (IGLESIAS, 2013). Foram usadas as mesmas equações para medir os dois parâmetros e cada um foi medido para as amostras metanol e para as amostras em extrato de cada camada da pele analisada.

5.2.4. *Limite de detecção (LD) e Limite de quantificação (LQ)*

Os limites de detecção e quantificação foram determinados da mesma forma em que foram determinados para o método de cromatografia líquida de alta eficiência com detecção DAD, mas utilizando-se os dados das curvas analíticas obtidas para cada matriz biológica seguindo-se este novo método analítico.

5.2.5. *Estudos de recuperação*

O objetivo deste ensaio foi validar o método de extração da latanoprostá das matrizes biológicas da pele. Assim, inicialmente as camadas da pele foram separadas usando a técnica de *differential tape-stripping*, que foi descrita no item 5.1.1. Após a separação, cada camada da pele acondicionadas em frascos diferentes foram contaminadas com quantidades conhecidas de latanoprostá diluída em metanol. Manteve-se os frascos abertos até a evaporação do solvente restando apenas o fármaco seco em contato com cada uma das camadas da pele. Então, adicionou-se 5 mL de metanol para a proceder a extração. Os frascos foram vedados e mantidos em repouso por 15 h. Após esse período as dispersões foram filtradas e o filtrado analisado utilizando-se o método analítico. A recuperação de latanoprostá em cada camada da pele e em cada nível de concentração foi então calculada através da razão entre concentração mensurada pela concentração adicionada, como mostra a Equação 6.

$$R\% = \frac{\text{Concentração mensurada}}{\text{Concentração real}} \times 100$$

Equação 6

5.3. Desenvolvimento de nanocápsulas poliméricas contendo latanoprosta

Nanocápsulas de policaprolactona foram obtidas através do método de evaporação do solvente e nanoprecipitação (PIRES *et al.*, 2019; MILADI *et al.*, 2016). Preparou-se uma fase aquosa contendo 15 mL de água ultrapura, 80 mg de Tween 80 e, em alguns testes, 5 mg de álcool polivinílico. Para chegar-se à proporção adequada de polímero/fármaco na fase orgânica, a quantidade de latanoprosta foi fixada em 10 mg e foram testadas diferentes proporções policaprolactona/latanoprosta: 1:1; 2:1; 3:1; 4:1; 5:1 e 6:1 (p/p). Foi preparada então, uma fase orgânica contendo diferentes quantidades de policaprolactona e 10 mg de latanoprosta dissolvidos em 4 mL de diclorometano. A fase orgânica foi gotejada com o auxílio de uma seringa na fase aquosa, enquanto agitada por meio de agitação magnética ou um sonicação até ser formada uma nanoemulsão. Depois de formada a nanoemulsão, o solvente orgânico foi evaporado com o auxílio de um rotaevaporador, que operou a 35°C durante 10 min.

5.4. Caracterização das nanocápsulas poliméricas contendo latanoprosta

5.4.1. Tamanho médio, Índice de Polidispersividade e Potencial Zeta

Os nanossistemas desenvolvidos tiveram o seu tamanho médio, índice de polidispersividade e potencial zeta determinados com o auxílio de um equipamento *Zetasizer Nano ZS* (Malvern, EUA). O tamanho médio e o índice de polidispersividade foi avaliado por espalhamento da luz dinâmica, enquanto o potencial zeta foi determinado por meio da mobilidade eletroforética. Para a medição desses três parâmetros, 10 µL da dispersão das nanocápsulas foram diluídas em 40 µL de água ultrapura. As leituras foram realizadas em triplicata para cada amostra em temperatura ambiente.

5.4.2. Morfologia

A morfologia das nanocápsulas foi determinada com o auxílio de imagens obtidas por meio de um microscópio eletrônico de varredura (MEV JOEL, JSM-7000 IF). Para o preparo das amostras, uma gota da dispersão de nanocápsulas de latanoprosta foi diluída em uma gota de água ultrapura (1:1 v/v) e colocada sob uma superfície isolante em cima

de um suporte. As amostras foram deixadas em temperatura ambiente até que a água fosse completamente seca. As amostras foram então metalizadas com ouro para serem levadas ao equipamento e analisadas por meio de fotografias com aumento de até 5000 a 15000 vezes.

5.4.3. Eficiência de encapsulação

A eficiência de encapsulação do fármaco nas nanopartículas foi determinada através da quantificação de latanoprostá não encapsulada separada por filtração da dispersão de nanocápsulas. Para análise do fármaco livre, 2 mL da dispersão de nanocápsulas de latanoprostá foi disposta em um sistema de filtração Vivaspin®. As amostras foram centrifugadas a 4000 rpm por 20 min. Após, 0,02 mL do filtrado foi coletado e diluído em 0,98 mL de metanol e levado para análise em HPLC. A eficiência de encapsulação foi então calculada de acordo com a Equação 7:

$$EE\% = [(F_{\text{total}} - F_{\text{livre}}) / F_{\text{total}}] \times 100$$

Equação 7

Onde: EE é a eficiência de encapsulação em porcentagem, F_{total} corresponde à quantidade de fármaco total presente em 2 mL de dispersão das nanocápsulas, e F_{livre} corresponde à quantidade de fármaco livre dosado do filtrado de 2 mL da dispersão.

Foi feito ainda um teste controle, em que se usou uma solução de latanoprostá em metanol na mesma concentração da suspensão de nanocápsulas e se procedeu a filtração por centrifugação utilizando o sistema de filtração Vivaspin®. O objetivo era observar se o fármaco não encapsulado também ficaria retido no sistema Vivaspin®, o que não ocorreu.

5.5. Estabilidade das nanocápsulas poliméricas contendo latanoprostá

A estabilidade das nanocápsulas foi observada através da medição de tamanho médio das nanocápsulas, índice de polidispersividade, potencial zeta, e teor total de latanoprostá ao longo de 90 dias (dias 0, 1, 7, 15, 30, 60 e 90). Para a medição do teor de latanoprostá, 15 µL da solução de nanocápsulas foram diluídos em 1,5 mL de metanol e

analisadas pelo método em cromatografia líquida de alta eficiência. As amostras para os outros testes desta seção foram realizadas como descritas anteriormente (item 5.4.1). As amostras foram mantidas em triplicada em temperatura ambiente ($25 \pm 5^\circ\text{C}$) e a $6 \pm 2^\circ\text{C}$.

5.6. Estudos de solubilidade da latanoprosta

Foram feitos estudos para determinar a solubilidade da latanoprosta em diferentes solventes com o objetivo de escolher um meio que sirva de solução receptora para ser usada em experimentos que envolvem difusão do fármaco, especificamente os ensaios *in vitro* de liberação e permeação cutânea. Para isso, 1 g de latanoprosta (excesso) foi adicionada a 5 mL de cada um dos meios (solução tampão fosfato pH 7,2; s solução tampão fosfato pH 7,2/etanol (6:4); solução tampão fosfato pH 7,2 com 2% de Tween 80 e solução tampão fosfato pH 7,2 com 2% de SDS) e foi deixada sob agitação moderada por um período de 48 h. Após, a dispersão foi filtrada em membrana de $0,45 \mu\text{m}$, o filtrado foi adequadamente diluído em metanol e a latanoprosta quantificada por HPLC. Assim, a solubilidade foi igual à concentração de fármaco na solução saturada em cada meio.

5.7. Estudos *in vitro* de liberação da latanoprosta a partir das nanocápsulas

O perfil de liberação do fármaco a partir das nanocápsulas foi obtido por meio de estudos *in vitro* utilizando células “Franz” e membrana de nitrocelulose. A membrana foi colocada entre o compartimento doador e receptor de cada célula, sendo que este último compartimento foi preenchido com 15 mL de uma solução tampão fosfato pH 7,2 com 2% de Tween 80 mantida sob agitação (300 rpm) e sob temperatura de $32 \pm 2^\circ\text{C}$. A dispersão de nanocápsulas (1 mL) foi colocada no compartimento doador.

Amostras de 1 mL da solução receptora foram coletadas de tempos em tempos (20 min; 40 min; 60 min; 80 min; 100 min; 120 min; 150 min; 180 min; e 210 min) para análise por CLAE, sendo que após cada coleta um volume igual de solução receptora “limpa” foi sendo reposta ao compartimento receptor. As amostras foram quantificadas em HPLC e um gráfico relacionando-se porcentagem de fármaco liberado em função do tempo foi construído.

5.8. Estudos *in vitro* de permeação cutânea da latanoprosta a partir da dispersão de nanocápsulas

Células de difusão tipo Franz foram montadas com pele retirada de orelhas de porco separando os compartimentos doadores dos receptores. Este último foi preenchido com uma solução receptora (tampão fosfato pH 7,2 contendo 2% Tween 80), mantida sob agitação (300 rpm) e à temperatura de $32 \pm 2^\circ \text{C}$. No compartimento doador, foi adicionado 1 mL da dispersão de nanocápsulas de latanoprosta (contendo 666,7 $\mu\text{g/mL}$ de fármaco, pH 7,2), ou 1 mL de uma solução de latanoprosta na mesma concentração em tampão fosfato pH 7,2 contendo 2% Tween 80, utilizada aqui como controle do fármaco livre. O experimento teve duração de 8 h e foi realizado em quintuplicata para cada formulação.

Uma segunda série de experimentos foi realizada com as mesmas formulações e de maneira semelhante à descrita anteriormente; porém, antes de se começar o ensaio de permeação, uma alíquota (0,5 mL) da dispersão de nanocápsulas ou da solução controle foi colocada sob a pele e massageada com movimentos circulares do dedo indicador em um único sentido por 3 min (LEITE-SILVA *et al.*, 2012). Após, os fragmentos de pele foram montados nas células de difusão, o conteúdo de formulação completado para 1 mL e o experimento foi conduzido da mesma forma anteriormente descrita por 8 h.

Após a finalização de cada experimento, os fragmentos da pele de porco foram retirados da célula de difusão, limpos com água corrente, esticados e presos sobre um suporte de isopor com o estrato córneo voltado para cima. Em seguida foi aplicada a técnica de *diferencial tape stripping* (item 5.1.1) para separação do estrato córneo com o auxílio de 10 fitas adesivas, dos folículos pilosos com o auxílio de cola de cianoacrilato, e da pele remanescente picotada. O fármaco foi então extraído de cada camada da pele em 5 mL de metanol por 15 h, seguido por filtração em filtros de 0,45 μm , e quantificação do fármaco presente nas soluções extratoras por LC-MS. O fármaco presente na solução receptora foi também quantificado por LC-MS.

5.9. Avaliação *in vitro* do potencial irritativo das nanocápsulas

O potencial irritativo da dispersão de nanocápsulas de latanoprosta foi analisado por

meio do ensaio de HET-CAM, previamente descrito na literatura (KALWEIT *et al.*, 1990). Para isso, ovos de galinha fecundados em seu nono dia de incubação foram abertos em sua parte inferior para expor a membrana corioalantóica (CAM). Então, 300 µL da dispersão de nanocápsulas foi colocada sobre a membrana por 20 segundos. Após, a dispersão das nanocápsulas foi descartada e a CAM foi cuidadosamente lavada com uma solução de NaCl 0,9% (m/v) para garantir a remoção total da formulação. A CAM foi observada visualmente por 5 min (tempos 30 s, 3 min e 5 min) em relação ao aparecimento de qualquer um dos seguintes fenômenos: hiperemia, hemorragia e coagulação para os quais foi atribuída uma pontuação, segundo KALWEIT *et al.* (1990). O tempo necessário para causar qualquer um desses eventos foi totalizado para fornecer um valor numérico único, indicando o potencial de irritação da amostra em uma escala com um valor máximo de 21, em que pontuação de 0 a 0,9 classificam a formulação como não irritativa, de 1 a 4,9 como levemente irritativas, de 5 a 8,9 como moderadamente irritativas e de 9 a 21 como fortemente irritativas.

5.10. Análise dos dados

Para análise da regressão linear e desenvolvimento dos cromatogramas foi usado o *Software Microsoft Excel 2020* a partir dos dados obtidos pelas leituras cromatográficas. Para análise estatística dos dados foi também utilizado o *Software Prim Graphpad*, admitindo nível de significância $p < 0,05$. Diferenças significativas entre grupos de dados independentes foram verificadas por Teste t não pareado para variâncias populacionais diferentes.

6. RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1. Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com Detecção por DAD

6.1.1. Ajuste de parâmetros cromatográficos

Após realizados os testes descritos na seção 5.1, foi definido o comprimento de onda em que as leituras seriam feitas e observado o tempo de retenção do fármaco na coluna. A Figura 7 mostra o cromatograma obtido para a solução metanólica da latanoprost, em que o pico do fármaco foi mais bem detectado a 210 nm, 5,85 min após sua injeção.

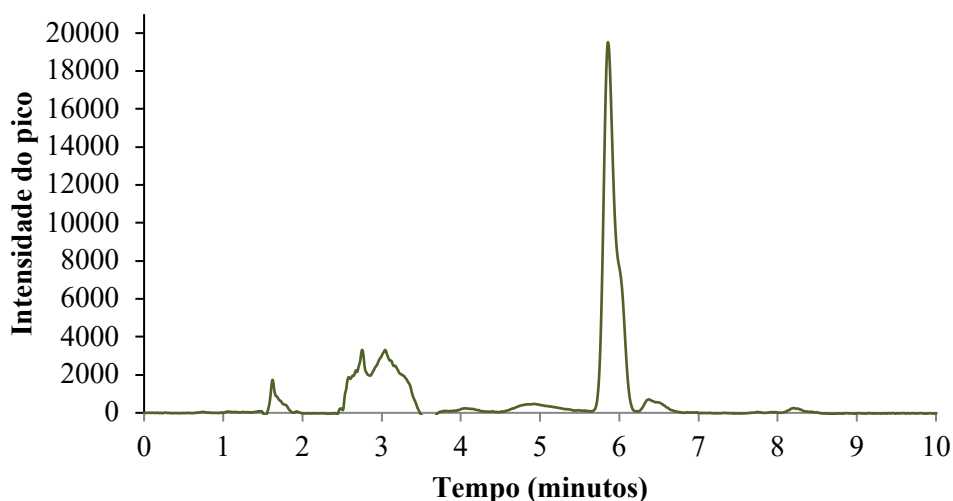


Figura 7: Cromatograma obtido para uma solução de latanoprost a 10 $\mu\text{g/mL}$ eluída seguindo-se o método proposto por cromatografia líquida de alta eficiência com detecção por DAD.

Como pode se observar, o pico correspondente à latanoprost apresentou-se simétrico e relativamente distante do início da corrida devido à menor afinidade com os solventes polares da fase móvel do que da coluna apolar utilizada como fase estacionária. Também se apresentou distante do sinal referente ao metanol (~ 3 min) o que é muito importante para que a análise da latanoprost não seja equivocada. Resultado semelhante de separação foi obtido no trabalho em que este se baseou para definição do método analítico (PATEL *et al.*, 2015).

6.1.2. Seletividade

A Figura 8 apresenta os cromatogramas para a latanoprostá em amostras contaminadas com os diferentes interferentes testados. Neste teste, amostras de 10 µg/mL do fármaco diluído em metanol foi contaminado com 100 µL de extrato metanólico das três camadas da pele e uma solução filtrada da dispersão das nanocápsulas vazias.

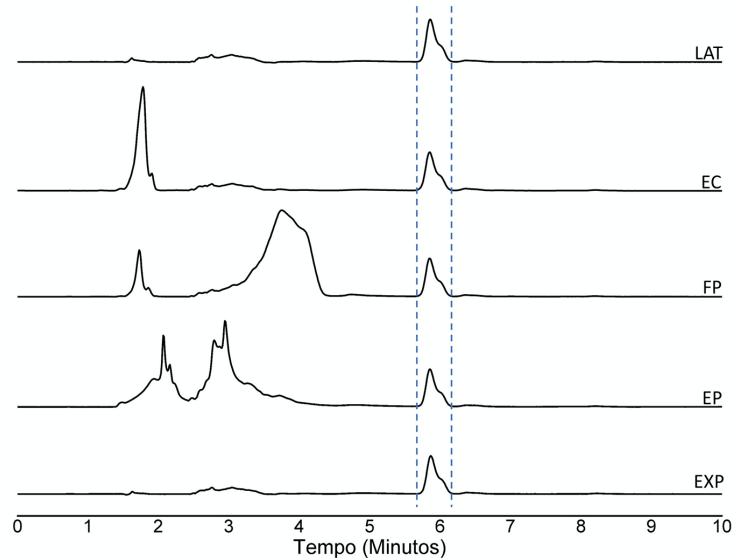


Figura 8: Cromatogramas das amostras contendo 10 µg/mL de latanoprostá (LAT) em metanol e na presença dos extratos metanólicos das camadas da pele (EC – estrato córneo; FP – foliculo piloso; PR – pele remanescente) e dos excipientes das nanocápsulas obtidos por cromatografia líquida de alta eficiência com detecção no DAD.

A partir dos cromatogramas apresentados na Figura 8, pode-se verificar que nenhum dos interferentes alteram o sinal da latanoprostá. Porém em testes de recuperação, onde a latanoprostá foi dissolvida em extrato metanólico de camadas da pele, verificou-se que o sinal para a latanoprostá foi significativamente alterado, suprimindo ou aumentando o sinal do fármaco, e alterando seu tempo de eluição em 5,85 min. Com isso, pode-se inferir que o método é seletivo para a análise da latanoprostá nas formulações e não seletivo para análise do fármaco extraído da pele, o que demandou o desenvolvimento de um novo método mais seletivo para análise das amostras dos experimentos que envolvem a pele (ensaios de permeação cutânea).

6.1.3. Linearidade

Para verificar a linearidade do método, analisou-se a resposta obtida para sete concentrações diferentes de latanoprosta. A Figura 9 mostra o resultado da curva analítica para a latanoprosta em metanol nas seguintes concentrações em triplicata: 0,5 µg/mL; 2 µg/mL; 5 µg/mL; 10 µg/mL; 15 µg/mL; 20 µg/mL e 25 µg/mL.

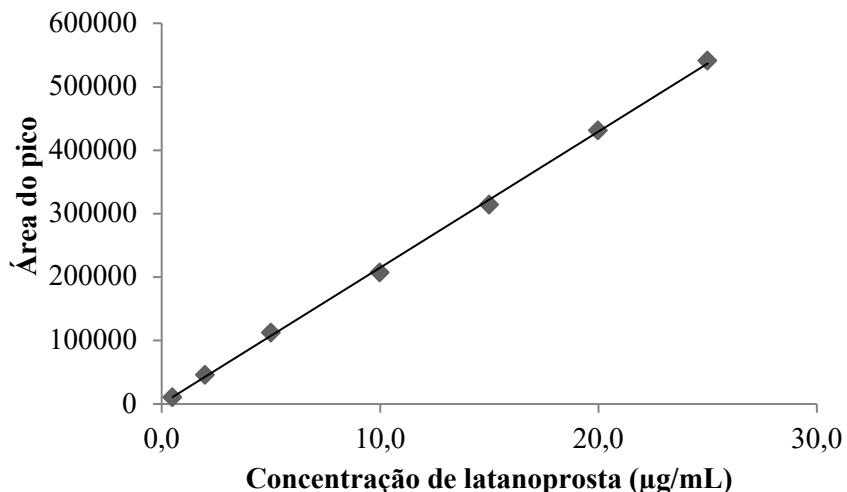


Figura 9: Curva analítica em metanol obtida de análises em triplicata. Faixa = 0,5 µg/mL a 25 µg/mL; equação da reta: $y = 21455x + 255,05$; $r^2 = 0,9993$

Pode-se observar que o método foi capaz de se obter um gráfico de tendência com respostas analíticas diretamente proporcionais às diferentes concentrações de latanoprosta. Tem-se também que o coeficiente de determinação (r^2) tem seu valor próximo a 1 (0,9993) e acima do mínimo recomendado (0,990), evidenciando a linearidade do método na faixa analítica proposta (ANVISA, 2017). Esse comportamento nos possibilita a análise do fármaco de estudo pelo método apresentado.

6.1.4. Precisão e Exatidão

Os dados de ensaios de precisão e exatidão realizados por dois analistas em dois dias diferentes para três concentrações distintas da curva analítica encontram-se apresentados na Tabela 1 abaixo.

Tabela 1: Precisão e exatidão verificada pelos analistas 1 e 2 nos dias 1 e 2 para amostras de latanoprostá nas concentrações de 2 µg/mL ;10 µg/mL e 20 µg/mL.

	Concentração teórica (µg/mL)	Concentração medida (µg/mL)	Precisão (%)	Exatidão (%)
Analista 1 Dia 1	2	1,96	4,9	97,8
	10	10,16	3,0	101,6
	20	20,72	0,7	103,6
Analista 2 Dia 1	2	2,09	0,3	104,7
	10	9,88	0,4	98,8
	20	20,23	2,2	101,1
Analista 1 Dia 2	2	1,95	3,3	97,6
	10	10,34	2,7	103,4
	20	20,87	1,0	104,3
Analista 2 Dia 2	2	2,10	0,6	104,9
	10	10,17	1,2	101,7
	20	20,48	2,0	102,4

Os resultados obtidos para precisão mostraram variações sempre abaixo de 5% e os para exatidão, valores compreendidos entre 95 e 105%, de acordo com os valores apontados pelas normas do *International Conference of Harmonisation* (ICH) e da RDC N°166, de 24 de julho de 2017 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) para validação de métodos analíticos. Conclui-se, portanto, que o presente método é preciso e exato considerando-se sua faixa de linearidade.

6.1.5. Limite de detecção (LD) e Limite de Quantificação (LQ)

Os limites de detecção e quantificação calculados de forma teórica por meio dos coeficientes angulares das retas das curvas analíticas e são apresentados na Tabela 2 abaixo.

Tabela 2: Limites de detecção e quantificação para método analítico em cromatografia líquida de alta eficiência.

Limite de detecção ($\mu\text{g/mL}$)	Limite de quantificação ($\mu\text{g/mL}$)
0,25	0,77

Os valores mínimos de detecção e quantificação da latanoprosta foram menores que $1 \mu\text{g/mL}$, limites suficientes para se quantificar o fármaco com precisão e exatidão nos experimentos subsequentes.

6.2. Cromatografia Líquida acoplada à Espectrometria de Massas

6.2.1. Seletividade e Linearidade

Após realizadas as análises, foi possível se extrair um espectro para latanoprosta baseado na sua razão massa-carga, de onde era possível distingui-la de outras substâncias presentes na amostra analisada. As Figuras 10 e 11 apresentam o cromatograma e o espectro de massa para a latanoprosta, respectivamente.

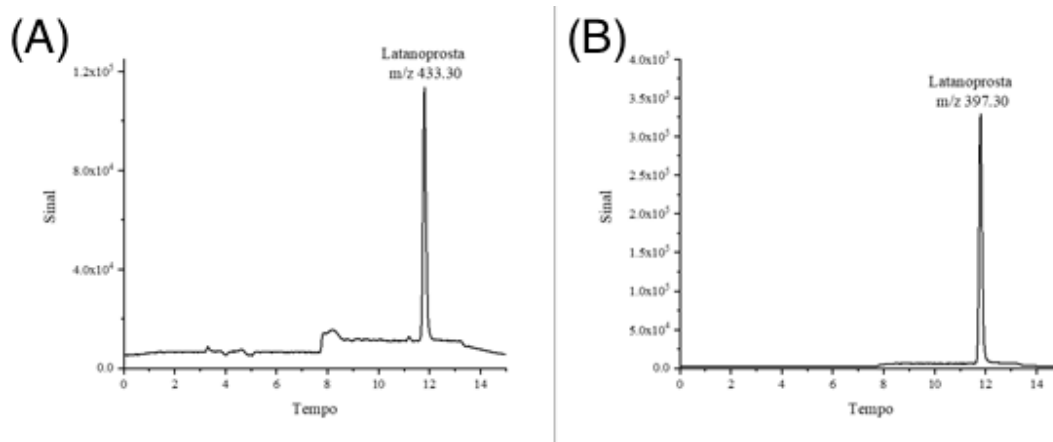


Figura 10: (A) Cromatograma da latanoprosta (m/z 433,3) e (B) do seu fragmento (m/z 397,3), respectivamente, com tempo de retenção em 11,8 minutos.

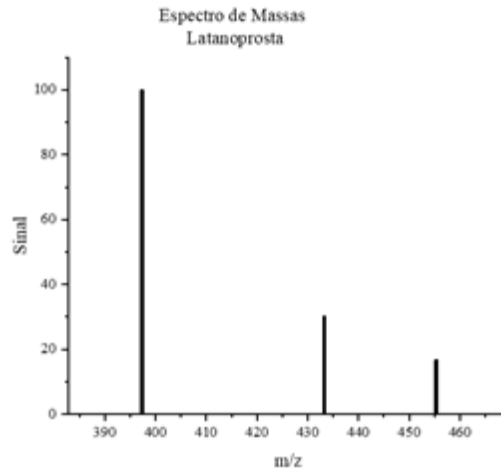


Figura 11: Espectro de massas da latanoprost

A Figura 12 mostra os resultados para a curva analítica da latanoprost em metanol em triplicata com seis pontos. A curva obtida mostrou-se linear, com coeficiente de correlação linear de 0,9994 – portanto, acima do recomendado - e com equação da reta = $172370x + 6637,1$.

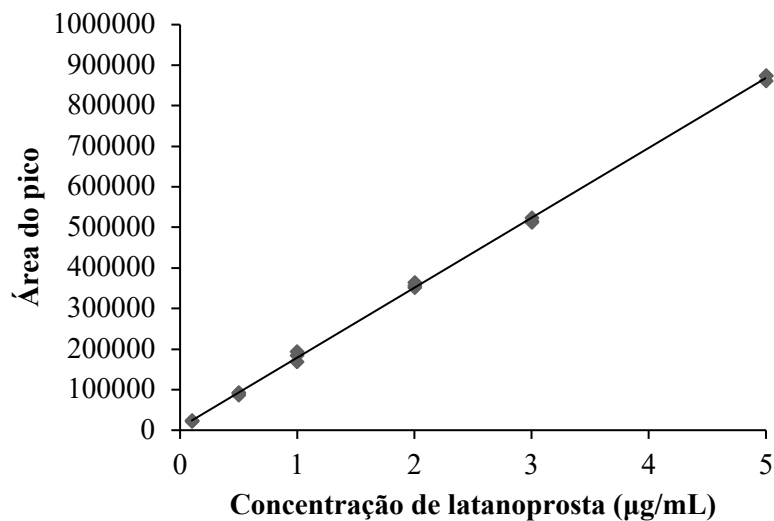


Figura 12: Curva analítica para latanoprost diluída em metanol, obtida em triplicata na faixa de concentração de 0,1 a 5,0 µg/mL seguindo-se o método por LC-MS. Equação da reta = $172370x + 6637,1$; $r^2 = 0,9994$.

Em métodos analíticos utilizando espectrometria de massas é muito comum que a matriz de onde o analito é extraído interfira em sua detecção e quantificação (WONG *et al.*, 2009) (ZHOU *et al.*, 2013; WILLE *et al.*, 2012). Esse “efeito matriz”, portanto, foi considerado na quantificação da latanoprosta. Assim, foram construídas curvas analíticas do fármaco dissolvido tanto em metanol quanto e em extratos metanólicos das três camadas de pele que serão analisadas (estrato córneo, folículo piloso e pele remanescente).

A verificação dos coeficientes angulares das curvas de calibração do analito em diferentes matrizes permitiu notar que houve erros sistemáticos proporcionais no sinal do analito, provocando um aumento com a inserção das diferentes matrizes em relação ao fármaco dissolvido apenas em metanol (Figura 13).

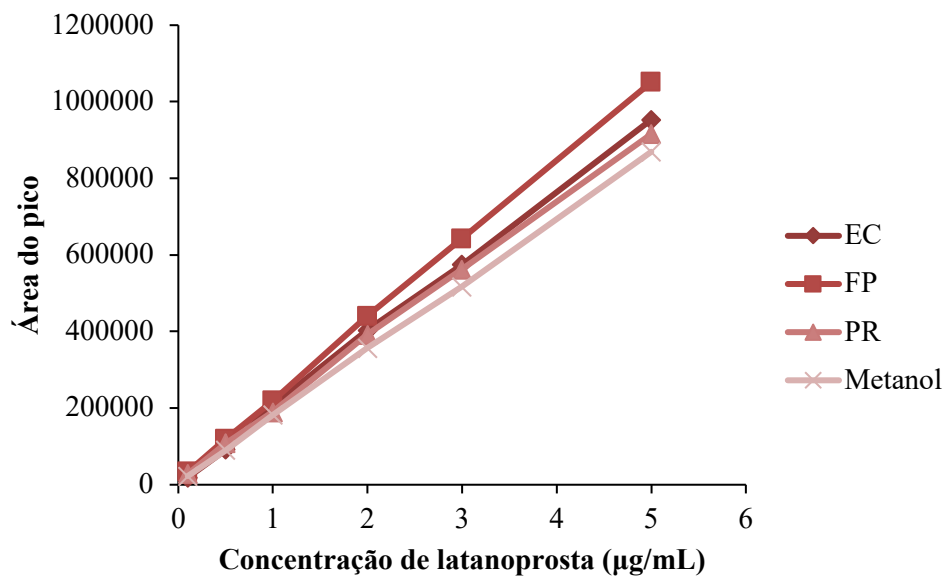


Figura 13: Correspondência entre as curvas em metanol e as curvas em solução metanólica contaminadas com as camadas da pele em triplicata. Equação da reta = $190358x + 6940,3$; $r^2 = 0,9978$ para o Estrato Córneo. Equação da reta = $208000x + 15736$; $r^2 = 0,9993$ para o Folículo Piloso. Equação da reta = $181124x + 16128$; $r^2 = 0,9969$ para o Pele Remanescente.

A Tabela 3 mostra os resultados do cálculo do efeito matriz observado para cada curva analítica contendo as diferentes matrizes biológicas em comparação à curva obtida apenas com o fármaco diluído no solvente.

Tabela 3: Dados obtidos do efeito matriz na presença de contaminantes (estrato córneo, folículo piloso e pele remanescente) para a latanoprostá nas diferentes matrizes.

Interferente	% Efeito Matriz
Estrato Córneo	10,43
Folículo Piloso	20,67
Pele Remanescente	5,07

De acordo com as normas estabelecidas pela ANVISA (2017), o efeito matriz deve apresentar um valor inferior a 15%, por se tratar de um método bioanalítico, para que o sinal de intensidade do fármaco não seja entendido como maior do que o existente. Pela Tabela 3, podemos perceber que nesse estudo, este parâmetro só é atendido para as matrizes estrato córneo e pele remanescente. Assim, para que a quantificação realizada a partir de fármaco extraído dos folículos pilosos, uma curva com a presença dessa matriz precisou ser considerada para garantir a seletividade do método. Também, optou-se por se preparar curvas com as outras matrizes da pele, a fim de assegurar maior confiabilidade em todas as análises dos ensaios de permeação cutânea.

6.2.2. Limite de Detecção (LD) e Limite de Quantificação (LQ)

A Tabela 4 apresenta os valores dos limites de detecção e quantificação para a latanoprostá nas diferentes matrizes analisadas.

Tabela 4: Limites de detecção e quantificação para a latanoprostá em metanol, estrato córneo, folículo piloso e pele remanescente.

	Metanol ($\mu\text{g/mL}$)	EC ($\mu\text{g/mL}$)	FP ($\mu\text{g/mL}$)	PR ($\mu\text{g/mL}$)
LD	0,044	0,124	0,046	0,141
LQ	0,135	0,376	0,138	0,426

Os valores obtidos para os limites de detecção e quantificação mostram a possibilidade de se detectar e quantificar baixas concentrações do fármaco nas diferentes matrizes, sempre abaixo de 0,5 µg/mL. Esses limites foram menores que os conseguidos anteriormente por cromatografia líquida por detecção em DAD, conforme era esperado, já o sistema com detecção em massas é mais sensível.

6.2.3. Precisão e Exatidão

A Tabela 5 a seguir apresenta os resultados para os testes de precisão e exatidão do método analítico para três pontos da curva analítica (0,5 µg/mL; 2,0 µg/mL e 5,0 µg/mL respectivamente), realizados em dois dias diferentes e por dois analistas diferentes.

Os valores obtidos para precisão inferiores a 15% e os para exatidão entre 85-115% se encontram dentro dos valores aceitos pela norma para métodos bioanalíticos (ANVISA, 2017). Assim, estes testes mostram que a quantificação de latanoprosta feita seguindo-se o método proposto se mostrará confiável por apresentar precisão e exatidão (ANVISA, 2017) (ICH, 2005).

Tabela 5: Valores de exatidão e precisão intra e inter-ensaio do método analítico para a latanoprostina nas concentrações de 0,5 µg/mL; 2,0 µg/mL e 5,0 µg/mL.

Matriz	Conc. teórica (µg/mL)	Concentração experimental (µg/mL)	Precisão (%)	Exatidão (%)
Metanol,	0,5	0,512 ± 238,5	2,1	102,4
Analista	2,0	2,253 ± 1847,8	0,5	112,6
1	5,0	5,174 ± 10128,7	1,1	103,5
EC,	0,5	0,534 ± 2045,2	1,9	106,7
Analista	2,0	2,066 ± 5454,8	1,4	103,3
1	5,0	5,038 ± 16605,8	1,7	100,8
FP,	0,5	0,49 ± 2490	2,1	98,0
Analista	2,0	1,965 ± 6591,4	1,5	98,2
1	5,0	4,661 ± 6624	0,7	93,2
PR,	0,5	0,547 ± 2472,3	2,2	109,4
Analista	2,0	2,090 ± 24878	4,9	104,5
1	5,0	5,38 ± 19333,5	1,9	107,6
Metanol,	0,5	0,516 ± 1825,3	1,576	103,136
Analista	2,0	2,078 ± 6575	1,647	103,923
2	5,0	5,629 ± 7655,1	0,794	112,588
EC,	0,5	0,51 ± 981,5	0,943	102,084
Analista	2,0	1,883 ± 10152,9	2,932	89,141
2	5,0	4,841 ± 18251,9	1,966	96,814
FP,	0,5	0,459 ± 1733,7	1,558	91,859
Analista	2,0	1,853 ± 12739,9	3,176	92,652
2	5,0	4,5538 ± 31365,7	3,268	90,77
PR,	0,5	0,558 ± 4221	3,602	101,59
Analista	2,0	2,052 ± 8296,2	2,139	102,603
2	5,0	5,375 ± 37307,8	3,77	106,505

6.2.4. Estudos de recuperação

A Tabela 6 mostra o teor de latanoprostá recuperada das três camadas da pele analisadas.

Tabela 6: valores de recuperação da latanoprostá quantificada nas diferentes camadas da pele por extração overnight em metanol.

Concentração teórica de LAT ($\mu\text{g/mL}$)	Estrato Córneo		Folículo Piloso		Pele Remanescente	
	<i>LAT</i>	<i>Concentração</i>	<i>LAT</i>	<i>Concentração</i>	<i>LAT</i>	<i>Concentração</i>
	<i>recuperada</i> (%)	<i>mensurada</i> ($\mu\text{g/mL}$)	<i>recuperada</i> (%)	<i>mensurada</i> ($\mu\text{g/mL}$)	<i>recuperada</i> (%)	<i>mensurada</i> ($\mu\text{g/mL}$)
0,5	80,236	0,401	87,647	0,438	90,538	0,453
2	83,389	1,668	81,238	1,625	90,499	1,81
5	78,709	3,935	79,23	3,961	82,07	4,103

Como pode-se observar na Tabela 6, o teor de latanoprostá recuperada das camadas da pele encontram-se entre 78,7% e 83,3% para o estrato córneo, entre 79,2% e 87,6% para o folículo piloso e entre 82,1% e 90,5% para a pele remanescente. Esses valores denotam uma eficiência no método extrativo em meio líquido utilizado para este tipo de análise.

6.3. Desenvolvimento de nanocápsulas poliméricas contendo latanoprostá

A latanoprostá é um fármaco lipofílico com coeficiente de partição equivalente a 4,28 (PUBCHEM, 2020) e massa molar de 432,6 g/mol (PUBCHEM, 2020). Seu aspecto é o de um óleo viscoso e, portanto, sua veiculação como uma formulação de base aquosa de fácil administração e espalhamento pelo couro cabeludo do paciente seria impossível. O objetivo desta etapa do trabalho foi o desenvolvimento de uma formulação baseada em nanocápsulas poliméricas para veiculação da latanoprostá. O polímero selecionado para este propósito foi a policaprolactona. Esta escolha foi feita por se tratar de um dos polímeros sintéticos biodegradáveis mais amplamente estudados em várias formulações para administração de medicamentos (MOYERS-MONTOYA *et al.*, 2016; LEMOINE *et al.*, 1996). Ela tem sido utilizada sozinha ou em combinação com outros polímeros pra

alterar o comportamento de biodegradação das nanopartículas formadas (ROLDÁN *et al.*, 2018). Além disso, a policaprolactona apresenta uma melhor estabilidade (PdI e potencial zeta) comparada a outros polímeros como o poli (ácido lático-co-ácido glicólico), que é o mais amplamente usado (PEÑA *et al.*, 2015).

Nesta etapa de desenvolvimento, o objetivo foi desenvolver nanocápsulas de policaprolactona contendo a latanoprostina com dimensões nanométricas para favorecer seu acúmulo nos folículos pilosos, uma vez que estudos recentes apontam que nanopartículas de dimensões inferiores a 250nm são mais propensas a se acomodarem nos folículos pilosos, direcionando a liberação do fármaco para essas estruturas, que são alvo de ação da latanoprostina (MATOS *et al.*, 2015; MOGENSEN *et al.*, 2018; DÖGE *et al.*, 2017; HATEM *et al.*, 2018). Para isso, foram feitos testes usando diferentes proporções de fármaco e polímero para se obter sistemas nanoparticulados em tamanhos pequenos e homogeneamente distribuídos (PdI mais baixos).

Como descrito anteriormente, foi usado o método de evaporação do solvente. A quantidade de latanoprostina para preparo das nanocápsulas foi fixada em 10 mg e a quantidade de polímero para cada lote preparado foi aumentado de 10 mg a 60 mg, em intervalos de 10 mg. Os resultados obtidos em termos de tamanho médio das nanocápsulas formadas, PdI e número de populações de partículas formadas estão mostrados na Tabela 7.

Tabela 7: Tamanho médio, número de populações formadas e PdI de dispersões de nanocápsulas formadas a partir de 10 mg de latanoprostina e quantidades variadas de policaprolactona.

Proporção PCL/LAT	Tamanho médio das cápsulas (nm)	Número de populações	PdI
1:1	212,3 ± 4,34	1	0,422
2:1	247,6 ± 3,25	1	0,387
3:1	312,9 ± 5,67	2	0,544
4:1	148,5 ± 4,25	3	0,457
5:1	*	*	*
6:1	*	*	*

Legenda: (*), não houve formação de nanocápsulas.

Pela análise dos resultados expressos na Tabela 7, optou-se por utilizar a proporção de policaprolactona e latanoprosta de 1:1 (m/m), em que se utilizou a menor quantidade de polímero e obteve-se uma única população de nanocápsulas com o menor diâmetro médio igual a $212,3 \pm 4,34$ nm. As proporções maiores de polímero em relação ao fármaco resultaram em mais de uma população de nanocápsulas (proporções 3:1 e 4:1, m/m), ou não proporcionaram a nanoestruturação do material (proporções 5:1 e 6:1, m/m). Dessa forma, deu-se prosseguimento aos estudos fixando essa proporção de fármaco em relação ao polímero.

Outros parâmetros estudados foram a adição de 5 mg álcool polivinílico como agente estabilizante (MILADI *et al.*, 2016) e a adição de um passo de homogeneização com o auxílio de um sonicador com o intuito de diminuição do tamanho de nanopartículas e redução em sua polidispersividade. Os resultados estão apresentados na Tabela 8.

Tabela 8: Tamanho médio (nm) e PDI de nanocápsulas de latanoprosta preparadas sem e com a adição de 5 mg de álcool polivinílico, e com ou sem sonicação.

Álcool polivinílico	Sonicação	Tamanho médio das nanocápsulas (nm)	PDI
-	-	$212,3 \pm 4,34$	0,422
+	-	$217,1 \pm 3,27$	0,403
-	+	$197,8 \pm 1,25$	0,147

Legenda: (-), não houve adição de álcool polivinílico ou uso de sonicador; (+) houve adição de álcool polivinílico ou uso de sonicador.

Pode-se observar que apesar da adição de álcool polivinílico sozinho não ter alterado significativamente tamanho e PDI das nanocápsulas formadas, a sonicação da dispersão reduziu de forma significativa ($p < 0,05$) tanto o tamanho médio quanto o PDI das nanopartículas formadas. A energia, portanto, fornecida para o sistema na forma de ultrassom deve ter auxiliado na formação de gotículas menores e de tamanho mais

homogêneo do fármaco oleoso na nanoemulsão inicial, tornando menores e mais homogêneas as nanocápsulas a que deram origem. Essa observação está de acordo com o descrito para outros sistemas semelhantes já descritos na literatura (MARTINS *et al.*, 2007). Assim, chegou-se a uma formulação de nanocápsulas que se julgou adequada para prosseguimento dos estudos.

6.4. Caracterização das nanocápsulas poliméricas contendo latanoprostá

A Tabela 9 apresenta dados de caracterização físico-química das nanocápsulas desenvolvidas em termos de tamanho médio, PdI, potencial zeta e eficiência de encapsulação.

Tabela 9: Resultados de tamanho médio, índice de polidispersividade e potencial zeta para nanocápsulas de latanoprostá em policaprolactona (1:1)

Tamanho Médio (nm)	Índice de polidispersividade	Potencial Zeta (mV)	Eficiência de encapsulação (%)
197,8 ± 2,3	0,15 ± 0,01	-30,1 ± 1,8	93,9 ± 0,4

As nanocápsulas obtidas apresentaram diâmetro em torno de 200 nm, tamanho que deve ser adequado para promover sua deposição nas aberturas foliculares após aplicação tópica (MATOS *et al.*, 2015; MOGENSEN, 2018; DÖGE, 2017). O PdI foi inferior a 0,2, indicando se tratar de um nanossistema monodisperso. Além disso, análise de espalhamento de luz dinâmico mostrou que foi formada apenas uma população de nanocápsulas. Quanto ao potencial zeta, a literatura mostra que valores iguais ou maiores que |30 mV| normalmente garante a estabilidade física de nanossistemas (RAMOS, 2018), evitando aglomeração das partículas com o passar do tempo. De fato, as nanocápsulas de latanoprostá apresentaram potencial zeta médio de -30,1 mV. A carga negativa desse sistema era esperada já que a policaprolactona adquire essa carga quando em pH próximo à neutralidade (CARRASCAL *et al.*, 2019; JESUS *et al.*, 2019).

A análise da morfologia das nanocápsulas, que foi realizada por fotomicrografias obtidas por microscopia eletrônica de varredura (Figura 14), mostrou se tratarem de estruturas predominantemente esféricas de dimensões inferiores a 500 nm, o que está de acordo com os dados de diâmetro médio obtido por espalhamento de luz dinâmico.

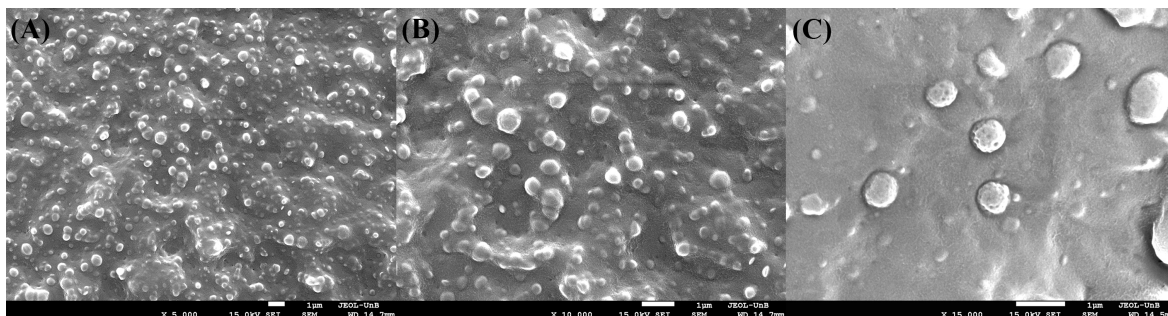


Figura 14: Fotomicrografias das nanocápsulas de latanoprost obtidas por microscopia eletrônica de varredura. (A) Aumento de 5.000 vezes; (B) aumento de 10.000 vezes e (C) aumento de 15.000 vezes.

Por fim, a eficiência de encapsulação da latanoprost foi determinada e o resultado está apresentado na Tabela 9 acima. As nanocápsulas desenvolvidas apresentaram eficiência de encapsulação de $93,9 \pm 0,4\%$. Este resultado é igual ou superior ao conseguido em outros trabalhos que nanoencapsularam outros ativos oleosos utilizando o mesmo polímero (NIEZABITOWSKA *et al.*, 2018; MALIKMAMMADOV *et al.*, 2018) e evidenciam o sucesso no desenvolvimento dessas nanoestruturas.

6.5. Avaliação da estabilidade das nanocápsulas poliméricas contendo latanoprost

A estabilidade das nanocápsulas foi avaliada considerando os parâmetros de tamanho médio, PDI, potencial zeta, e teor de latanoprost. O objetivo era avaliar o quanto essas nanoestruturas dispersas em água conservam suas características físico-químicas ao longo do tempo sendo armazenadas tanto a temperatura ambiente ($25 \pm 5^\circ\text{C}$) quanto a $6 \pm 2^\circ\text{C}$.

A Figura 15 mostra o comportamento das nanocápsulas em termos de tamanho médio (Figura 15A) e PDI (Figura 15B) ao longo dos 90 dias.

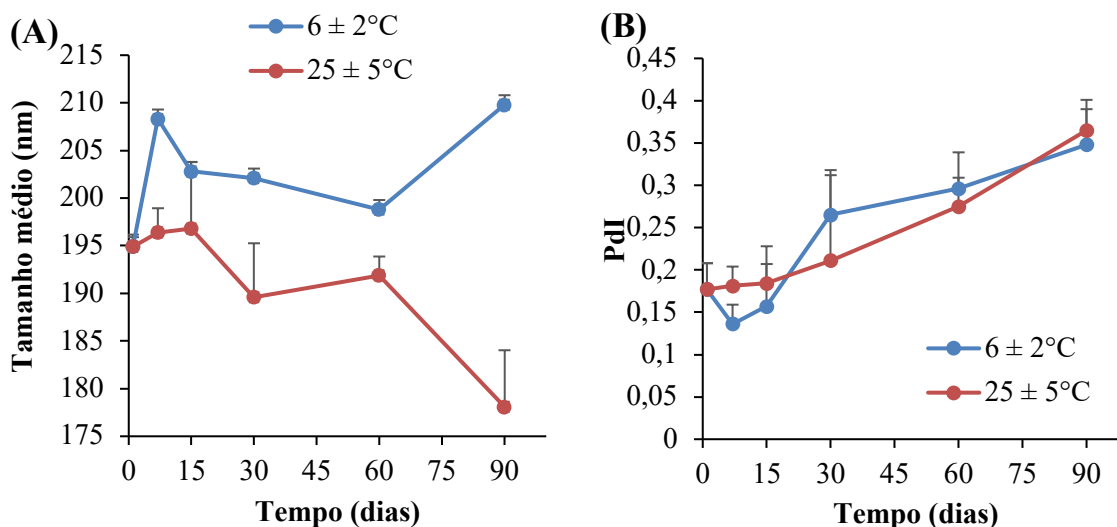


Figura 15: Variação de tamanho médio (A) e PDI (B) da dispersão das nanocápsulas de latanoprostá ao longo de 90 dias mantidas tanto a $25 \pm 5^\circ\text{C}$ quanto a $6 \pm 2^\circ\text{C}$.

Alterações no tamanho médio das nanocápsulas juntamente com o PDI dão indícios de perda de estabilidade física da nanoformulação pois indicam a coalescência das partículas que pode resultar em perda de homogeneidade das amostras e até sedimentação. No dia 1 as amostras se encontravam com o tamanho de $194,9 \pm 1,3$ nm e em ambas as condições testadas foi observado uma variação de mais ou menos 15 nm, que corresponde a menos de 10% de variação. Esse resultado indica baixa probabilidade de ter havido aglomeração significativa ao longo do período. Já o valor de PDI (Figura 13B) sofreu um aumento mais significativo (aumentando de 0,18 a aproximadamente 0,35 para ambas as temperaturas). No entanto, pelos valores deste índice ainda assim serem inferiores a 0,5, pode-se considerar que as nanocápsulas ainda se apresentam monodispersas.

O potencial zeta foi avaliado ao longo de 90 dias também visando observar a estabilidade física do nanossistema. A Figura 16 mostra os resultados.

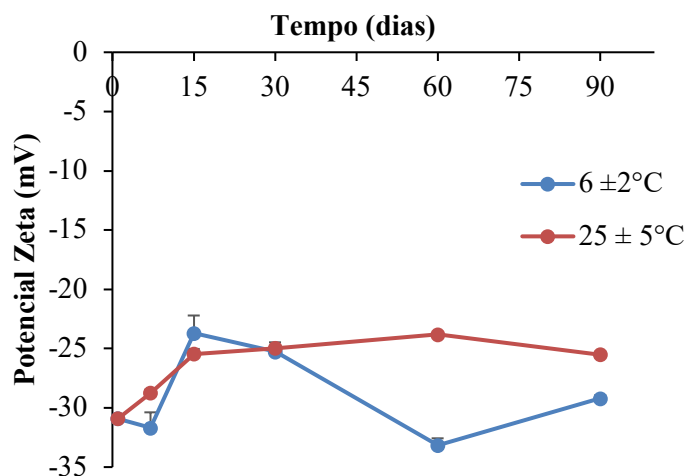


Figura 16: Variação do potencial zeta das nanocápsulas de latanoprostas mantidas a 25 ± 5°C e a 6 ± 2°C ao longo de 90 dias.

O potencial zeta de uma dispersão de nanocápsulas indica a tendência ou não dessas estruturas se aglomerarem uma vez que uma carga superficial consistente resulta em considerável força de repulsão entre elas (CALVO *et al.*, 1997). No dia 1, as amostras apresentaram potencial zeta de $-30,9 \pm 0,2$ mV e mesmo com variações ao longo dos 90 dias, no dia 90 as nanocápsulas estocadas a $6 \pm 2^\circ\text{C}$ mantiveram esse potencial em $-29,2 \pm 0,3$ mV ao passo que as estocadas em temperatura ambiente tiveram seu potencial zeta estabilizado em -25 ± 5 mV. Essas pequenas alterações no balanço de cargas, juntamente com a pouca variação de distribuição de tamanho, indicam que o nanossistema foi fisicamente estável por pelo menos 90 dias, mesmo quando armazenado em temperatura ambiente.

O teor de latanoprosta também foi monitorado e os resultados estão mostrados na Figura 17 abaixo.

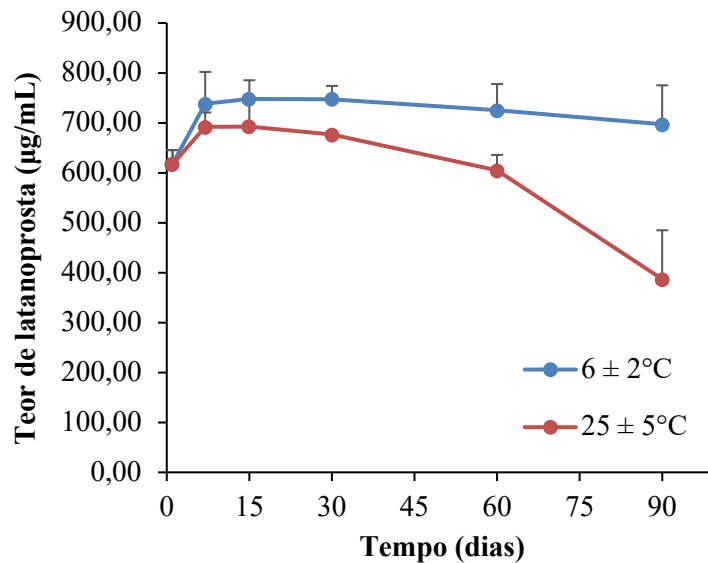


Figura 17: Teor de latanoprosta após as nanoformulações serem mantidas a $25 \pm 5^{\circ}\text{C}$ e a $6 \pm 2^{\circ}\text{C}$ por 90 dias.

Na Figura 17, pode-se observar uma diferença no comportamento das nanocápsulas conservadas a $6 \pm 2^{\circ}\text{C}$ comparado ao da nanoformulação conservada a $25 \pm 5^{\circ}\text{C}$. No início do estudo o teor de latanoprosta era igual a $616,8 \pm 28,5 \mu\text{g/mL}$ e quando mantida em temperatura ambiente esse teor caiu em aproximadamente 30% após os 90 dias. Já para as amostras armazenadas sob refrigeração, o teor de fármaco foi mantido durante todos os dias analisados.

Assim, as formulações contendo as nanocápsulas de latanoprosta quando armazenadas a $6 \pm 2^{\circ}\text{C}$ mantiveram suas características físico-químicas praticamente inalteradas, indicando estabilidade da formulação nesta temperatura.

6.6. Estudos de solubilidade da latanoprosta

Este estudo foi realizado com o intuito de se escolher a melhor solução receptora disponível para os testes de liberação e permeação. De acordo com a literatura, a

latanoprostá apresenta solubilidade de 50 µg/mL em solução tampão fosfato, pH 7,2 (CAYMAN, 2013). Fez-se então, testes para descobrir se a adição alguns co-solventes e agentes solubilizantes selecionados poderia aumentar a solubilidade do fármaco. Os dados obtidos estão mostrados na Tabela 10.

Tabela 10: Solubilidade da latanoprostá (g/L) nos diferentes meios tamponados testados.

Meio testado	Solubilidade (g/L)
Tampão pH 7,2	0,061
Tampão pH 7,2/etanol (6:4 v/v)	2,428
Tampão pH 7,2 + 2% de Tween 80	4,350
Tampão pH 7,2 + 2% de SDS	19,020

A solubilidade da latanoprostá em tampão fosfato em pH 7,2 foi semelhante ao descrito na literatura (CAYMAN, 2013) e muito baixo, como era esperado. Esse valor foi muito aumentado aproximadamente 40 vezes com a adição de 40% (v/v) de etanol, 70 vezes com a adição de 2% de Tween 80 e 310 vezes com a adição de 2% de SDS. No entanto, apesar dos testes mostrarem maior aumento de solubilidade de latanoprostá no meio com a adição do SDS, foi observado que esse agente promove a formação de muita espuma mesmo sob agitação moderada. Como a formação de bolhas na superfície do meio atrapalha os ensaios in vitro de liberação e permeação, a solução contendo Tween 80 foi selecionada como meio receptor para esses estudos.

Cabe ressaltar que a quantidade de latanoprostá colocada no meio doador das células de difusão é igual a 666,7 µg, de modo que a máxima concentração de fármaco nos 15 mL de meio receptor seria aproximadamente 45 µg/mL. Como a solubilidade de latanoprostá no meio selecionado é igual a 4350 µg/mL, os experimentos utilizando esse meio é quase 100 vezes maior, o que garante que os próximos experimentos, que envolvem passos de difusão, serão realizados em condições *sink*.

6.7. Estudos *in vitro* de liberação da latanoprosta a partir das nanocápsulas

A Figura 18 mostra o perfil de liberação da latanoprosta nanoencapsulada ao longo de 210 min de experimento.

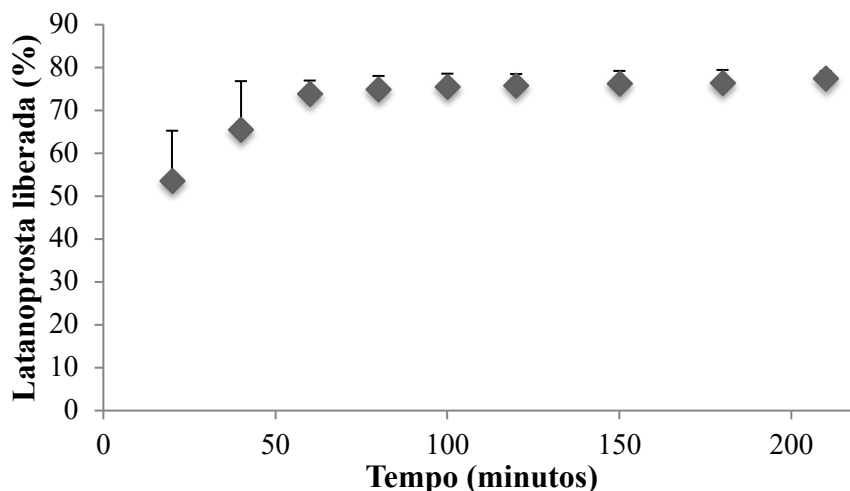


Figura 18: Perfil de liberação *in vitro* da latanoprosta encapsulada em nanocápsulas de policaprolactona.

Como pode se observar, o controle exercido pelas nanocápsulas na liberação da latanoprosta durou apenas 60 min, quando aproximadamente 74% do fármaco foi liberado. A partir de então, atingiu-se um *plateau*, ou seja, não houve mais liberação do fármaco, já que provavelmente houve um equilíbrio entre a porcentagem que permaneceu no compartimento doador e receptor da célula de difusão. Outro trabalho também mostrou nanocapsulas de policaprolactona se rompendo rapidamente e liberando em torno de 80% do fármaco em 100 minutos de experimento (PEÑA *et al.*, 2016). Foi realizado ainda um teste controle utilizando-se uma solução do fármaco livre no meio receptor. Porém, devido à alta lipofilicidade do fármaco, que provavelmente se liga à membrana lipofílica ao invés de atravessá-la, os resultados não se mostraram confiáveis e, portanto, não foram apresentados na Figura 18.

Apesar do controle exercido pelas nanocápsulas na liberação do fármaco ser pouco duradouro, não pode se afirmar que este comportamento seja inadequado para seu uso em formulações tópicas, uma vez que o mecanismo molecular de ação da latanoprosta nos

folículos pilosos não é conhecido. É necessário, assim, a ocorrência de testes clínicos em estudos posteriores utilizando estas nanocápsulas para que essa característica seja mais bem avaliada.

6.8. Estudos *in vitro* de permeação cutânea da latanoprosta a partir das nanocápsulas

A Figura 19 apresenta as quantidades de latanoprosta recuperadas de diferentes camadas da pele após 8 h de tratamento com a dispersão das nanocápsulas do fármaco ou de uma simples solução aquosa contendo a mesma concentração de fármaco.

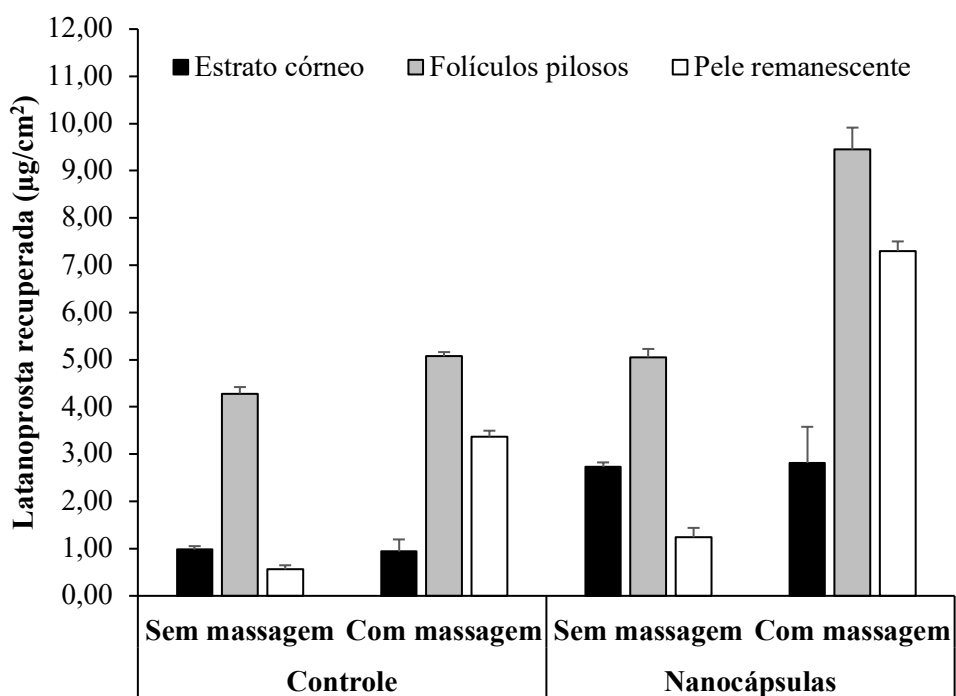


Figura 19: Recuperação da latanoprosta das camadas da pele. À esquerda, resultados para o teste controle sem e com massagem respectivamente. À direita, resultados para o teste com as nanocápsulas sem e com massagem respectivamente.

Quando o experimento foi realizado aplicando-se as formulações sobre a pele sem massagem, comparado ao controle, as nanocápsulas foram capazes de aumentar a

quantidade de latanoprosta que penetrou todas as camadas da pele analisadas, sendo que nos folículos pilosos esse aumento foi significativo ($p < 0,05$) e de aproximadamente 20%.

O massageamento das formulações sobre a pele impactou em alterações no perfil de penetração da latanoprosta nas camadas da pele. Enquanto para a solução controle, o massageamento alterou de maneira significativa apenas a quantidade de fármaco que atingiu a epiderme viável. Quando esse estímulo foi feito sobre a formulação contendo as nanocápsulas, houve um pronunciado aumento da quantidade de latanoprosta que se acumulou nos folículos pilosos, e esse aumento significativo foi de aproximadamente 2 vezes ($p < 0,05$) se comparado à condição sem massagem.

É interessante notar que esse efeito de aumentar o acúmulo de fármacos lipofílicos nanoencapsulados nos folículos pilosos com a aplicação de uma simples massagem manual foi recentemente notado em dois outros trabalhos científicos, tanto quando para nanocápsulas também poliméricas (USHIROBIRA *et al.*, 2020) quanto para nanocarreadores lipídicos (ANGELO *et al.*, 2020), revelando que esta tendência pode estar relacionada mais com o tamanho manométrico das partículas do que com a sua natureza polimérica ou lipídica.

O fator de direcionamento folicular da penetração de um fármaco é calculado através da razão da quantidade de fármaco que penetra os folículos pilosos pela quantidade total de fármaco que penetra a pele. Ao analisar o fator de direcionamento aos folículos pilosos nas quatro condições em que o teste foi realizado (com e sem massagem, nanocápsulas e formulação controle), este não aumenta nos testes em que foi feito o uso de nanocápsulas comparado aos testes controle. No entanto, a formulação controle (latanoprosta em solução tampão pH 7,2 com 2% de tween 80) não poderia ser usada em uma formulação tópica porque a presença de tensoativo pode ser altamente irritante para a pele. Assim, propor uma formulação de nanocápsulas neste caso é extremamente relevante.

Em todos os experimentos aqui apresentados também foi analisada a solução receptora das células de difusão para avaliar a quantidade de latanoprosta permeada através da pele. Em nenhum dos ensaios foi sequer detectada a presença do fármaco nessa solução, indicando não ter havido permeação transdérmica. Esse resultado é muito importante, uma

vez que garante que a latanoprost não deve alcançar a corrente sanguínea a partir de nenhuma das formulações e condições testadas, garantindo que seu efeito deve ser apenas tópico, conforme esperado.

Os resultados desta etapa do trabalho mostraram que, de fato, as nanocápsulas são uma alternativa interessante para entregar o fármaco aos folículos pilosos em formulações viáveis que não causam irritação a pele do paciente, por não conter solventes orgânicos ou tensoativos.

6.9. Avaliação in vitro do potencial irritativo das nanocápsulas

O ensaio HET-CAM foi utilizado para avaliar o potencial irritativo da nanoformulação desenvolvida através da comparação com um controle negativo (solução de NaCl 0,9%) e um controle positivo (solução NaOH 1 mol/L). O teste foi realizado durante 5 minutos e o resultado está exposto na Figura 20.

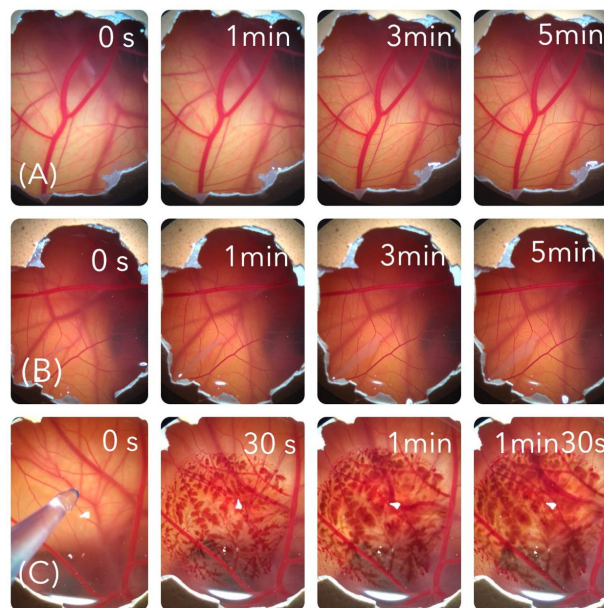


Figura 20: Imagens da interação dos controles e da solução de nanocápsulas de latanoprost com a membrana CAM. (A) Nanocápsulas de latanoprost. (B) Controle negativo – NaCl 0,9% (p/v). (C) Controle positivo – 1 mol/L de NaOH.

A formulação desenvolvida neste trabalho apresentou um índice de irritação igual a 0, idêntico ao efeito causado pela aplicação do controle negativo (igual a 0), ao passo que

o controle positivo apresentou um índice de irritabilidade igual a 12. Pela análise das imagens contidas na Figura 20 é possível se visualizar essa diferenciação dos efeitos causados pela formulação e controles, evidenciando o fato de a dispersão de nanocápsulas de latanoprosta ser considerada não irritante. Esse resultado está de acordo com o apresentado por outras partículas preparadas com o mesmo polímero (MAZZARINO *et al.*, 2015, ZHANG *et al.*, 2017) e demonstra a segurança da formulação desenvolvida neste trabalho para uma aplicação tópica por período prolongado.

7. CONCLUSÕES

As nanocápsulas de policaprolactona contendo latanoprosta desenvolvidas neste trabalho apresentaram tamanhos pequenos o suficiente para conseguirem penetrar os folículos pilosos da pele, e foram capazes de encapsular mais de 92% do fármaco. As amostras armazenadas a 6°C se apresentaram físico-quimicamente estáveis em relação ao seu tamanho médio, índice de polidispersividade, potencial zeta e teor de latanoprosta por 90 dias. O estudo de liberação mostrou que quase a totalidade da latanoprosta (76,12%) foi liberada logo na primeira hora de experimento. A veiculação da latanoprosta na pele por meio das nanocápsulas aumentou em 20% nos testes sem massagem e em 87% nos testes com massagem, comparando-se a formulação controle e apresentou um potencial irritante nulo para a pele. Assim, pode-se concluir que o sistema desenvolvido possui um alto potencial de uso como formulação tópica para o tratamento da alopecia androgênica.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABRIATA, J. P.; TURATTI, R. C.; LUIZ, M. T.; RASPANTINI, G. L.; TOFANI, L. B.; AMARAL, R. L. F.; SWIECH, K.; MARCATO, P. D.; MARCHETTI, J. M. Development, Characterization and biological in vitro assays of paclitaxel-loaded PCL polymeric nanoparticles. **Materials Science & Engineering**, C 96 (2019) 347-355.

ALJUFFALI IA, SUNG CT, SHEN FM, HUANG CT, FANG JY. Squarticles as a lipid nanocarrier for delivering diphencyprone and minoxidil to hair follicles and human dermal papilla cells. **AAPS J**,16 (2014) 140-50. <https://doi.org/10.1208/s12248-013-9550-y>.

ANGELO T, EL-SAYED N, JURISIC M, KOENNEKE A, GELFUSO GM, CUNHA-FILHO M, TAVEIRA SF, LEMOR R, SCHNEIDER M, GRATIERI T. Effect of physical stimuli on hair follicle deposition of clobetasol-loaded lipid nanocarriers. **Scientific Reports – Nature**, 10 (2020) 176. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-56760-w>.

AREEJ, A.; GODWIN, M. The effectiveness of treatments for androgenetic alopecia: A systematic review and meta-analysis. **Journal of the American Academy of Dermatology**, 2017 Jul;77(1):136-141.e5. doi: 10.1016/j.jaad.2017.02.054. Epub 2017 Apr 7.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA) - RE no 899, de 29 de maio de 2003; **Guia para Validação de Métodos Analíticos e Bioanalíticos**, 2003; <http://portal.anvisa.gov.br/documents/10181/2718376/RE_899_2003_COMP.pdf/ff6fdc6b-3ad1-4d0f-9af2-3625422e6f4b> - Acessado em 19 de junho de 2019.

AIZPURUA, L. F.; CHOUDHARY, S.; TOSTI, A. Emerging treatments in Alopecia. **Expert Opin. Emerging Drugs** 2014 Dec; 19(4):545-56. doi: 10.1517/14728214.2014.974550. Epub 2014 Oct 21.

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

AVSIEVICH, T.; POPOV, A.; BYKOV, A.; MEGLINSKI, I. In Situ Scanning

Transmission Electron Microscopy of Ni Nanoparticle Redispersion via the Reduction of Hollow NiO. **Chem. Mater.** 2018, 30, 197-203

BARONI A, BUOMMINO E, GREGORIO V DE, RUOCCO E, RUOCCO V, WOLF R. Structure and function of the epidermis related to barrier properties. **Clin Dermatol.** 2012;30:257–62.

BARRÓN-HERNÁNDEZ, Y. L.; TOSTI, A. Bimatoprost for the treatment of eyelash, eyebrow and scalp alopecia. **Expert Opinion on Investigational Drugs**, v. 26, n. 4, p. 515– 522, 3 abr. 2017.

BELOQUI, A. *et al.* Nanostructured lipid carriers: Promising drug delivery systems for future clinics. **Nanomedicine: nanotechnology, biology, and medicine**, p. 1–19, 2015

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

BLOCH, L.; ESCUDEIRO, C.; SARRUF, F.; VALENTE, N. Latanoprost e minoxidil: Estudo duplo- cego comparativo, placebo-controlado no tratamento da queda de cabelos. **Surg Cosmet Dermatol.** Rio de Janeiro v.10 n.1 jan-mar. 2018 p. 41-5

BLUME-PEYTAVI, U.; HILLMANN, K.; DIETZ, E.; CANFIELD, D.; GARCIA BARTELS, N. A randomized, single-blind trial of 5% minoxidil foam once daily versus 2% minoxidil solution twice daily in the treatment of androgenetic alopecia in women. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 65, n. 6, p. 1126–1134, 2011.

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

CALVO-SÁNCHEZ, M.; FERNÁNDEZ-MARTOS, S.; CARRASCO, E.; MORENO-BUENO, G.; BERNABÉU, C.; QUINTANILLA, M.; ESPADA, J. A role for the Tgf- β /Bmp co-receptor Endoglin in the molecular oscillator that regulates the hair follicle cycle. **Journal of Molecular Cell Biology**, Volume 11, Issue 1, January 2019, Pages 39–

CARRASCAL, J. J.; VILLEGAS, J. M.; BAENA-ARISTIZÁBAL, C. M.; BAENA, Y.; PEREZ, L. D. Nanoparticles based on a PEGylated methacrylate copolymer as vehicles for hydrophilic antimicrobial additives: a study on chemical interactions with a benzoic acid probe molecule. **Colloid and Polymer Science** (2019) 297:809–820

CAYMAN CHEMICAL. **Product Information**. 02/05/2013.

CORRÊA, M. A. **COSMETOLOGIA Ciência e Técnica**. 1a ed. [s.l.] Editora Medfarma, 2012

CHANDRASHEKAR, B.S.; NANDHINI, T.; VASANTH, V.; SRIRAM, R.; NAVALE, S. Topical minoxidil fortified with finasteride: An account of maintenance of hair density after replacing oral finasteride. **Indian Dermatol Online J**. 2015 Jan-Feb; 6(1): 17–20.

CHOI, Y. M.; DIEHL, J.; LEVINS, P. C. Promising alternative clinical uses of prostaglandin F2 α analogs: Beyond the eyelashes. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 72, n. 4, p. 712–716, abr. 2015.

CHU, D. H. Development and Structure of Skin. In: **Fitzpatrick's Dermatology in General Medicine**. [s.l: s.n.] p. 93–131. 2012

DADWAL, A.; BALDI, A.; NARANG, R. Nanoparticles as carriers for drug delivery in cancer. **Artificial cells, nanomedicine, and biotechnology** 2018, VOL. 46, NO. S2, S295–S305

DEY-RAO, R.; SINHA, A. A. Genome-wide gene expression dataset used to identify potential therapeutic targets in androgenetic. **Elsevier, Data in Brief** 13 (2017) p. 85-87.

DIMER, F.; FRIEDRICH, R.; BECK, R.; GUTERRES, S. IMPACTOS DA NANOTECNOLOGIA NA SAÚDE: PRODUÇÃO DE MEDICAMENTOS. **Quim. Nova**, Vol. 36, No. 10, 1520-1526, 2013

DÖGE, N.; HADAM, S.; VOLZ, P.; WOLF, A.; SCHÖNBORN, K-H.; BLUME-

PEYTAVI, U.; ULRIKE ALEXIEV, U.; VOGT, A. Identification of polystyrene nanoparticle penetration across intact skin barrier as rare event at sites of focal particle aggregations. **Journal Biophotonics**. 2018;11:e201700169.

DUNCAN, K.; FANG, R.; YUAN, J.; CHU, R.; DEY,S.; LANEKOOFF, I. Quantitative Mass Spectrometry Imaging of Prostaglandins as Silver Ion Adducts with Nanospray Desorption Electrospray Ionization. **Analytical. Chemistry**. 2018, 90, 7246-7252

C.L. FANG, I.A. ALJUFFALI, Y.C. LI, J.Y. FANG, **Therapeutic Delivery**. 5 (2014) 991–1006.

FAHMY, H.; SAAD, E.; SABRA, N.; MOHAMED, F.; GABER, M. Treatment merits of Latanoprost/ Thymoquinone – Encapsulated liposome for glaucomatus rabbits. **International Journal of Pharmaceutics** 548 (2018) 597-608.

FIREMAN, S.; TOLEDANO, O.; NEIMANN, K.; LOBODA, N.; DAYAN, N. A look at emerging delivery systems for topical drug products. **Dermatologic Therapy**, v. 24, p. 477–488, 2011.

FORMIGA, F.; ANSORENA, E.; ESTELLA-HERMOSO DE MENDOZA, A.; MBULUZQUETA, E.; GONZÁLEZ, D.; BLANCO PRIETO, M.. Nanosistemas a base de poliésteres. Disponível em: <https://www.researchgate.net/publication/259800239_2_Nanosistemas_a_base_de_poliesteres> - Acessado em 19 de maio de 2020

GAMONAL, S.; GAMONAL, A. Tricologia. **Revista Médica Oficial do Hospital Universitário da Universidade Federal de Juiz de Fora** – Vol 25 – N° 2- Maio/Agosto 1999

GARTNER, L. P.; HIATT, J. L. Tratado de Histologia em cores. 3.ed. Rio de Janeiro: **Elsevier**, 2007. pp. 333-335.

GELFUSO, G. M. Desenvolvimento de sistemas de liberação para a administração tópica passiva e iontoforética do minoxidil no tratamento da alopecia androgênica. **Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas)** - Universidade de São Paulo, São Paulo 2009.

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

GOMES, M. J. B. T. Lipid nanoparticles for topical and transdermal application for alopecia treatment. **Dissertação (Ciências Farmacêuticas)** - Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto. Julho de 2012

GOULART, S.M.; ALVES, R.D.; ASSIS, T.C.; SALVADOR, G.V.; QUEIROZ, M.E.L.R.; NEVES, A.A.; QUEIROZ, J.H.; PAULA, W.X. AVALIAÇÃO DO EFEITO DE MATRIZ NA ANÁLISE DE CARBAMATOS EM BEBIDAS DE INTERESSE FORENSE. **52º Congresso Brasileiro de Química**. Out 2012

GUPTA, A. K.; CARVIEL, J.; ABRAMOVITS, W. Treating Alopecia Areata: Current Practices Versus New Directions. **American Journal Clinical Dermatol**. DOI 10.1007/s40257-016-0230-4

GUTERRES, S.; ALVES, M.; POHLMANN, A. Polymeric Nanoparticles, Nanospheres and Nanocapsules, for Cutaneous Applications. **Drug Target Insights** 2007: 2 147–157

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

HATEM, S.; NASR, M.; MOFTAH, N.; RAGAI, M.; GENEIDI, A.; ELKHESHEN, S, A. Melatonin vitamin C-based nanovesicles for treatment of androgenic alopecia: Design, characterization and clinical appraisal. **European Journal of Pharmaceutical Sciences** 122 (2018) 246-253

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

HWANG, Y.; LEE, J-K.; JEONG, Y-M.; CHEONG, S-I.; AHN, Y-C.; KIM, S. Production and dispersion stability of nanoparticles in nanofluids. **Powder Technology** 186 (2008) 145–153

ICH. ICH Topic Q2 (R1) Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology. **International Conference on Harmonization**, v. 1994, n. November 1996, p. 17, 2005.

IGLESIAS, A. Introdução ao Acoplamento Cromatografia Líquida – Espectrometria de Massas. Disponível em: <<http://www.cnpsa.embrapa.br/met/images/arquivos/17MET/minicursos/introducao%20a%20acoplamento%20cromatografia%20liquida%20-%20espectrometria%20de%20massas.pdf>> Acessado em 8 de abril de 2020

JAY, C. VARY, J. Selected disorders of skin appendages – Acne, Alopecia, Hyperhidrosis. **Med Clin N Am** 99 (2015) 1195-1211

JESUS, S.; SCHMUTZ, M.; SOM, C.; BORCHARD, G.; WICK, P.; BORGES, O. Hazard Assessment of Polymeric Nanobiomaterials for Drug Delivery: What Can We Learn From Literature So Far. **Polymeric Nanobiomaterials: Hazard Assessment**. October 2019 | Volume 7 | Article 261

JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. **Histologia básica: texto e atlas**. 12.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2013. p. 354.

KHAVKIN, J.; ELLIS, DAF. Aging Skin: Histology, Physiology, and Pathology. **Facial Plast Surg Clin North Am**. 2011;19(2):229–34.

KWACK, M.H.; KANG, B.M.; KIM, M.K.; KIM, J.C.; SUNG, Y.K. **Journal of Dermatological Science**, 62 (2011) 154–159.

KALWEIT *et al.*, **Toxicol in vitro** 1990;4:702–704 doi: 10.1016/0887-2333(90)90147-1

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

LAGROW, A.P.; LLOYD, D.C.; GAI, P. L.; BOYES, E.D. IN SITU SCANNING TRANSMISSION Electron Microscopy of Ni Nanoparticle Redispersion Via The

Reduction Of Hollow NiO. **Chem. Mater.** 2018, 30, 197-203

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

LEMOINE, D.; FRANÇOIS, C.; PREAT, V.; HOFFMAN, M. Stability study of nanoparticles of poly(E-caprolactone), poly(D,L-lactide) and poly(D,L-lactide-co-glycolide). **Biomaterial** 17(1996) 2191-2197

LIANG, W.; SONG, L.; PENG, Z.; ZOU, Y.; DAI, S. Possible association between androgenic alopecia and risk of prostate cancer and testicular germ cell tumor: a systematic review and meta-analysis. **BMC Cancer** (2018) 18:279

LIYANAGE, D.; SINCLAIR, R. Telogen Effluvium. **Cosmetics** 2016, 3, 13

LOWE, J. S.; ANDERSON, P. G. Stevens & Lowe's Human Histology. 4.ed. Philadelphia: **Elsevier**, Mosby, 2015. pp. 49, 363.

LUO, C.; OKUBO, T.; NANGREJO, M.; EDIRISINGHE, M. Preparation of polymeric nanoparticles by novel electrospray nanoprecipitation. **Polymer International**, Volume 64, Issue 2, February 2015. Pg 183-187

MADISON, K. C.; Barrier Function of the Skin: “La Raison d’Être” of the Epidermis. **Journal of Investigative Dermatology**, 2003 Aug;121(2):231-41.doi: 10.1046/j.1523-1747.2003.12359.x.

MARTINS, M. H. ENCAPSULAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE LIPOSSOMAS CONTENDO ISOTRETINOÍNA PARA APLICAÇÃO DERMATOLÓGICA. Disponível em:http://repositorio.unicamp.br/jspui/bitstream/REPOSIP/250351/1/Martins_MileneHelioisa_D.pdf > acessado em 14 de maio de 2020.

MALIKMAMMADOV, E.; TANIR, T. E.; KIZILTAY, A.; HASIRCI, V.; HASIRCI, N. PCL and PCL-based materials in biomedical applications. **Journal of Biomaterials Science**, Polymer Edition: Special Issue: FBPS 2017 Conference, 13 June 2018, Vol 29(7-

9) pp 863-893.

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

MATOS, B. N.; OLIVEIRA, P. M.; AREDA, C. A.; CUNHA-FILHO, M. S.S.; GRATIERI, T.; GELFUSO, G. M. Preparações farmacêuticas e cosméticas com uso de nanotecnologia. **Revista Brasília Médica** Vol 52 Número 1/2015.

MAZZARINO, L.; LOCH-NECKEL, G.; BUBNIAK, L.S.; OURIQUE, F.; OTSUKA, I.; HALILA, S.; PEDROSA, R. C.; SANTOS-SILVA, M. C.; LEMOS-SENNA, E.; MUNIZ, E.C.; BORSALI, R. Nanoparticles made from xyloglucan-block-polycaprolactone Copolymers: Safety Assessment for Drug delivery. **Toxicological Sciences**, 147(1), 2015, 104–115

MENON, G. K.; New insights into skin structure: scratching the surface. **Adv Drug Delivery Rev.** 2002;54(1):S3–7

MHLWATIKA, Z.; ADERIBIGBE B. A.; Polymeric nanocarriers for the delivery of Antimalarials. **Molecules** 2018 Oct; 23(10): 2527

MILADI, K.; SFAR, S.; FESSI, H.; ELAISSARI, A. Nanoprecipitation Process: From Particle Preparation to In Vivo Applications. **Springer International Publishing Switzerland** 2016. C. Vauthier and G. Ponchel (eds.), Polymer Nanoparticles for Nanomedicines.

MOGENSEN, M.; BOJESSEN, S.; ISRAELSEN, N.; MARIA, M.; JENSEN, M.; PODOLEANU, A.; BANG, O.; HÆDERSDAL, M. Two Optical Coherence Tomography Systems detect Topical Gold Nanoparticles in Hair follicles, Sweat Ducts and Measure Epidermis. **J. Biophotonics**. 2018;11: e201700348.

MOUSSA, W. G. E. H.; FARHAT, R. G.; NEHME, J. C.; SAHYOUN, M. A. S., SCHAKAL, A. R.; JALKH, A. E.; ABI KARAM, M. P. A.; AZAR, G. G. Comparison of Efficacy and Ocular Surface Disease Index Score between Bimatoprost, Latanoprost,

Travoprost, and Tafluprost in Glaucoma Patients. **Journal of Ophthalmology** Volume 2018, Article ID 1319628

MOYERS-MONTOYA, E.; GARCÍA-CASILLAS, P.; VARGAS-REQUENA, C.; ESCOBEDO-GONZÁLEZ, R.; MARTEL-ESTRADA, S.; MARTÍNEZ-PÉREZ, C. Polycaprolactone/Amino- β -Cyclodextrin Inclusion Complex Prepared by an Electrospinning Technique. **Polymers** 2016, 8, 395; doi:10.3390/polym8110395

MÜLLER, A.; HEINRICH, T.; TOUGAARD, S.; WERNER, W. S. M.; HRONEK, M.; KUNZ, VALENTIN; RADNIK, J.; STOCKMANN, J.; HODOROABA, V.; BENEMANN, S.; NIRMALANANTHAN-BUDAU, N.; GEIBLER, D.; SPARNACCI, K.; UNGER, W. E. S. Determining the Thickness and Completeness of the Shell of Polymer Core–Shell Nanoparticles by X-ray Photoelectron Spectroscopy, Secondary Ion Mass Spectrometry, and Transmission Scanning Electron Microscopy. **Journal of Physical Chemistry. C** 2019, 123, 29765-29775

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

NATARAJAN, J.; ANG, M.; DARWITAN, A.; CHATTOPADHYAY, S.; WONG, T.; VENKATRAMAN, S. Nanomedicine for glaucoma: liposomes provide sustained release of latanoprost in the eye. **International Journal of Nanomedicine** 2012:7 123-131

NIEZABITOSKA, E.; SMITH, J.; PRESTLY, M. R.; AKHTAR, R.; AULOCK; F.W.V.; LAVALLÉE, Y.; ALI-BOUCETTA, H.; MCDONALD, T. O. Facile production of nanocomposites of carbon nanotubes and polycaprolactone with high aspect ratios with potential applications in drug delivery. **RSC Advances** issue 30, 2018

OLIVEIRA, P.; SAMPAIO, T.; FRANÇA, L.; GRATIERI, T.; CUNHA-FILHO, M.; GELFUSO, G. LC–MS bioanalytical method for simultaneous determination of latanoprost and minoxidil in the skin. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis** (2020) 113373

OVALLE, W. K.; NAHIRNEY, P. C. Netter Bases da Histologia. Rio de Janeiro: Elsevier, 2008. p. 244.

PADOIS, K.; CANTIÉNI, C.; BERTHOLLE, V.; BARDEL, C.; PIROT, F.; FALSON, F. Solid lipid nanoparticles suspension versus commercial solutions for dermal delivery of minoxidil. **International Journal of Pharmaceutics**, n. 416, p. 300–304, 2011.

PARK, A. M.; KHAN, S.; RAWNSLEY, J. Hair Biology Growth and Pigmentation. **Facial Plastic Surgery Clin N Am** 26 (2018) 415–424

PATEL, P.; PATEL P.; GIRAM, P. Bioanalytical method development and validation for latanoprost quantification in pharmaceutical ophthalmic microemulsion formulation by RP-HPLC. **Journal of Analytical & Bioanalytical Techniques**, Vol 6 – Issue 6 - 1000284

PEÑA, J.; GUTIÉRREZ, S.; VILLAMIL, J. Polycaprolactone/ polyvinylpyrrolidone/ siloxane hybrid materials: Synthesis and in vitro delivery of diclofenac and biocompatibility with periodontal ligament fibroblasts. **Materials Science Engineering C** 58 (2016) 60-69

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

PINAL, R.; PALACIO, L. M. H. Production of polycaprolactone nanoparticles with low polydispersity index in a tubular recirculating system by using a multifactorial design of experiments. **Journal of Nanoparticle Research** (2018) 20: 68

PIRES, F. Q.; DA SILVA, J. K. R.; SA-BARRETO, L. L.; GRATIERI, T.; GELFUSO, G. M.; CUNHA-FILHO, M. Lipid nanoparticles as carriers of cyclodextrin inclusion complexes: a promising approach for cutaneous delivery of a volatile essential oil. **Colloids and Surfaces B - Biointerfaces**, v. 182, p. 110382, 2019.

PUBCHEM. Latanoprost – Compound summary. Disponível em: <<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Latanoprost>>, acessado em 10 de maio de 2020

REIS, S. *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**, p. 1231, 2014.

RESTREPO, R. Anatomía microscópica del folículo piloso. **Rev Asoc Colomb Dermatol.** 2010;18: 123-38.

ROGERS, N. E.; AVRAM, M. R. Medical treatments for male and female pattern hair loss. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 59, n. 4, p. 547–566, 2008.

ROLDÁN, G. J. C.; GOMEZ, L. M. A.; CORNELIO, J. A. C.; RODRIGUEZ, L. F. R.; Production of bioabsorbible nanoparticles of polycaprolactone by using a tubular recirculating system. **Revista DYNA**, 85(204), pp. 277-282, March, 2018.

ROWLAND, D.; MOTOFEI, I.; PAUNICA, I.; BANU, P.; NISTOR, M.; PAUNICA, S.; CONSTANTIN. Androgenic alopecia; the risk-benefit ratio of finasteride. **J Med Sci.** 2018; 5(1):1-6

SAMPAIO, S.A.P.; RIVITTI, E.A. **Dermatologia.** 3. ed. Porto Alegre: Artes Médicas, 2007.

SAYED, K. M.; MOSTAFA, E. M.; MOUNIR, A.; ELHALIEM, N. G. A.; ALSMMAN, A. H. Analysis of Bimatoprost-Induced changes on Rabbits eyelash Follicle: Clinical and Electron microscopic study. **Clinical Ophthalmology** 2019;13 2421–2426

SEPÚLVEDA, R.; VALENTE, F.; REIS, E. ARAUJO, F.; ELEOTERIO, R.; QUEIROZ, P.; BORGES, A. Bacterial cellulose and bacterial cellulose/polycaprolactone composite as tissue substitutes in rabbits cornea. **Pesq. Vet. Bras.** 36(10):986-992, outubro 2016.

SHAMMA, R. N.; ABURAHMA, M. H. Follicular delivery of spironolactone via nanostructured lipid carriers for management of alopecia. **Int J Nanomedicine**, v. 9, p. 5449–5460. 2014.

SILVA, S. M. M.; COSTA, C. R. R.; GELFUSO, G. M.; GUERRA, E. N. S.; NOBREGA, Y. K. M.; GOMES, S. M.; PIC-TAYLOR, A.; FONSECA-BAZZO, Y. M.; SILVEIRA,

D.; MAGALHAES, P. O. Wound Healing Effect of Essential Oil Extracted from *Eugenia dysenterica* DC (Myrtaceae) Leaves. **Molecules.**, v. 24, p. 2, 2019.

SKOOG, D. A. *et al.* Fundamentos de Química Analítica. **Fundamentos de Química Analítica**, 2005.

SMITH, K.; WINSTANLEY, J.; BOYLE, F.; O'REILLY, A.; WHITE, M.; ANTILL, Y. C. Madarosis: a qualitative study to assess perceptions and experience of Australian patients with early breast cancer treated with taxane-based chemotherapy. **Support Care Cancer** (2018) 26:483–489

TANG, W.; BHUSHAN, B. Adhesion, friction and wear characterization of skin and skin cream using atomic force microscope. **Colloids Surfaces B Biointerfaces**. 2010;76(1):1–15.

THOM, E. Pregnancy and the hair growth cycle: anagen induction against hair growth disruption using Nourkrin" with Marilex", a proteoglycan replacement therapy. **Journal of Cosmetic Dermatology**, 16, 421-427

USHIROBIRA, C.Y.; ALFIUNE, L.A.F., PEREIRA, M. N., CUNHA-FILHO, M.; GELFUSO, G. M.; GRATIERI, T. Dudasteride nanocapsules for hair follicle targeting: Effect of chitosan-coating and physical stimulus. **International journal of Biological macromolecules**

VAÑO-GALVÁN, S. CAMACHO, F. New Treatments for Hair Loss. **Actas Dermato-Sifiliográficas**, Volume 108, Issue 3, April 2017, 221-228

VYAS, A.; SONKER, A. K.; GIDWANI, B. Carrier-Based Drug Delivery System for Treatment of Acne. **The Scientific World Journal**. 2014.

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

WONG, C.S.; MACLEOD, S.L. JEM Spotlight: Recent advances in analysis of

pharmaceuticals in the aquatic environment, *J. Environ. Monit.* 11 (2009) 923–936. Disponível em: <<https://doi.org/10.1039/b819464e>>. Acessado em: 20 de março de 2020 .

WILLE, K.; DE BRABANDER, H.F.; VANHAECKE, L.; DE WULF, E.; VAN CAETER, P.; JANSSEN, C.R. Coupled chromatographic and mass-spectrometric techniques for the analysis of emerging pollutants in the aquatic environment. **TrAC - Trends Anal. Chem.** 35 (2012) 87–108. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.trac.2011.12.003>>. Acessado em: 15 de abril de 2020.

XU, J.; GE, Y.; BU, R.; ZHANG, A.; FENG, S.; WANG, J.; GOU, J.; YIN, T.; HE, H.; ZHANG, Y. TANG, X. Co-delivery of latanoprost and timolol from micelles-laden contact lenses for the treatment of glaucoma. **Journal of Controlled Release** 305 (2019) 18-28.

YOUNUS, M.; SCHACHAR, R.; ZHANG, M.; SULTAN, M.; TRESSLER, C.; HUANG, K.; XU, W.; KLEIN, M.; PLATT, R.; MUKHERJEE, N.; HAENEL, E.; FREEDMAN, S. A Long-term Safety Study of Latanoprost in Pediatric Patients With Glaucoma and Ocular Hypertension: A Prospective Cohort Study. **American journal of ophthalmology**. December 2018

ZHANG, S.; LI, H.; YUAN, M.; YUAN, M.; CHEN, H. Poly(Lactic Acid) blends with Poly(Trimethylene Carbonate) as Biodegradable Medical Adhesive Material. **International Journal Mol. Science**. 2017, 18(10), 2041.

ZHOU, W.; WANG, P.G.; OGUNSOLA, O.A. M.E.K. Kraeling, Rapid determination of hexapeptides by hydrophilic interaction LC-MS/MS for in vitro skin-penetration studies. **Bioanalysis**. 5 (2013) 1353–1362. Disponível em: <<https://doi.org/10.4155/bio.13.60>>. Acessado em 13 de março de 2020.