



**UNICAMP**

**JEANIFER CAVERZAN DA SILVA**

**DESENVOLVIMENTO DE FORMULAÇÃO LIPÍDICA NANOESTRUTURADA UTILIZANDO  
MIRISTATO DE MIRISTILA E CERAMIDAS NO CARREAMENTO DE ESTRADIOL:  
AVALIAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA E BIOLÓGICA**

**CAMPINAS**

**2014**





**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS  
INSTITUTO DE QUÍMICA**

**JEANIFER CAVERZAN DA SILVA**

**DESENVOLVIMENTO DE FORMULAÇÃO LIPÍDICA NANOESTRUTURADA UTILIZANDO  
MIRISTATO DE MIRISTILA E CERAMIDAS NO CARREAMENTO DE ESTRADIOL:  
AVALIAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA E BIOLÓGICA**

**ORIENTADOR: PROF. DR. NELSON EDUARDO DURÁN CABALLERO**

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO APRESENTADA  
AO INSTITUTO DE QUÍMICA DA UNICAMP PARA  
OBTENÇÃO DO TÍTULO DE MESTRA EM QUÍMICA  
NA ÁREA DE FÍSICO-QUÍMICA.**

**ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À VERSÃO FINAL DA DISSERTAÇÃO DEFENDIDA POR JEANIFER  
CAVERZAN DA SILVA, E ORIENTADA PELO PROF. DR. NELSON EDUARDO DURÁN CABALLERO**

---

**Assinatura do Orientador**

**CAMPINAS**

**2014**

Ficha catalográfica  
Universidade Estadual de Campinas  
Biblioteca do Instituto de Química  
Simone Lucas Gonçalves de Oliveira - CRB 8/8144

Si38d Silva, Jeanifer Caverzan, 1985-  
Desenvolvimento de formulação lipídica nanoestruturada utilizando miristato de miristila no carreamento de estradiol : avaliação físico-química e biológica / Jeanifer Caverzan da Silva. – Campinas, SP : [s.n.], 2014.

Orientador: Nelson Eduardo Durán Caballero.  
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Química.

1. Estradiol. 2. Nanopartículas. I. Durán, Nelson Eduardo Caballero. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Química. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

**Título em outro idioma:** Development of nanostructured lipid formulation using myristyl myristate and ceramides in carrying of estradiol : physical-chemical e biological evaluation

**Palavras-chave em inglês:**

Estradiol

Nanoparticles

**Área de concentração:** Físico-Química

**Titulação:** Mestra em Química na área de Físico-Química

**Banca examinadora:**

Nelson Eduardo Durán Caballero [Orientador]

Lucimara Gaziola de la Torre

Renato Atílio Jorge

**Data de defesa:** 30-05-2014

**Programa de Pós-Graduação:** Química



## **Dedicatória**

Dedico esta conquista as pessoas mais importantes na minha vida:

A Deus em primeiro lugar, pois ele é a força que há em mim, ele é quem me sustenta, é meu escudo, é minha glória, é o provedor de tudo em minha vida. Agradeço por mais essa maravilhosa oportunidade.

Aos meus pais Roselaine e Laercio e meu irmão Deyvid, os quais sempre me apoiaram e incentivaram. Agradeço por todo carinho, amor e compreensão, obrigada por seu papel fundamental na formação do meu caráter.

Ao meu grande amor Klesner, por sempre me apoiar e acreditar em mim. Agradeço por toda paciência nos momentos difíceis, por ser meu porto seguro e por me incentivar e amar.



## **Agradecimentos**

Ao Prof. Dr. Nelson Eduardo Durán Caballero, por me proporcionar muitas oportunidades que contribuíram para a minha vida profissional. Obrigada por me ensinar e por confiar no meu trabalho.

À Prof<sup>a</sup>. Priscyla Marcato, por me ajudar e me ensinar desde a iniciação científica, sou muito grata por sua dedicação, compreensão e amizade.

Agradeço também aos amigos Ana Maria Moretti, Auandro, Rafael, Bruna Alice, Bruna Garcia, Milene, por todo apoio, risadas e tempo que passamos juntos.

Meus agradecimentos, também, aos companheiros de laboratório: Chico, Buba, Fabián, João Guilherme, Dani Pott, Dani Ridolffi, Dani, Lilian, Gabriel, Bany, Roney, Flávia, Almas, Ana Paula, Elias, Camila, Ana Claudia, Renata, Paula pelos cafés filosóficos, pela troca de informações e principalmente pela amizade.

Aos amigos de outros laboratórios, Rafaela, Luís, Diego, Paulo, Leandro, Ana, Milene, Daniella, Patrícia, pela troca de informações e amizade.

Agradeço a todos os funcionários, em especial ao Daniel, Priscila, Rita, Ricardo, Bel, Lora e Iveraldo por sua dedicação e ensinamentos.

Agradeço à FAPESP pelo apoio financeiro (Processo FAPESP no. 2012/09931-4).

Agradeço imensamente ao Dr. Marcelo Bispo de Jesus, por sua ajuda em microscopia confocal e ensaios de citotoxicidade. Além disso, agradeço por tudo que aprendi nessa parceria.

Por último, mas não menos especial, agradeço ao Prof<sup>a</sup>. Wagner e seus alunos Letícia e Patrick, por sua contribuição nos experimentos de permeação cutânea.



## CURRICULUM VITAE

JEANIFER CAVERZAN DA SILVA

e-mail: caverzan@gmail.com.br

### 1. FORMAÇÃO ACADÊMICA

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS (UNICAMP)

Graduação em Química.

Conclusão: Dez/2011

### 2. PRODUÇÃO CIENTÍFICA

#### 2.1 Resumos de trabalhos apresentados em congressos

- Marcato, P.D.; Adami, L.F.; Caverzan, J.; Huber, S.C.; Misset, T.; den Hertog, J.; Ferreira, C.V.; Durán, N. "Solid lipid nanoparticles as sunscreen carrier system and its toxicity in zebrafish embryos". The IASTED International Conference on Nanotechnology and Applications (NANA 2008), 29 de Setembro- 01 de Outubro 2008 Creta-Grécia.
- Marcato, P.D.; Caverzan, J.; Duran, N. "Encapsulation of skin free radical suppressor in PHBV microparticles". XXXVII SBBq maio de 2008 Águas de Lindóia-SP.
- Caverzan, J.; Marcato, P.D.; Durán, N. "The encapsulation of sunscreen benzophenone-3 in microparticles of poly(hydroxybutirate-co-3-hydroxyvalerate)". 7th International Congress of Pharmaceutical Sciences (CIFARP 2009), setembro de 2009 Ribeirão Preto-SP.
- Caverzan, J.; Marcato, P.D.; Durán, N. "Polymeric nanoparticles and microparticles sunscreens" Workshop International on Nanomaterials and Functional Materials held at State University of Campinas, UNICAMP, agosto de 2009 Campinas-SP.
- Caverzan, J.; Marcato, P.D.; Durán, N. "Development of nanostructured lipid formulation using myristyl myristate and ceramides in carrying of steroids: physicochemical characterization". 9th International Congress of Pharmaceutical Sciences (CIFARP 2013), novembro de 2013 Ribeirão Preto-SP.

## 2.2 ARTIGO PUBLICADO

- Marcato, P. D.; Caverzan, J.; Rossi-Bergmann, B.; Pinto, E. F. ; Machado, D.; Silva, R. A.; Justo, G. Z. ; Ferreira, C. V.; Durán , N.” Nanostructured Polymer and Lipid Carriers for Sunscreen. Biological Effects and Skin Permeation” J. Nanosci. Nanotechnol. 11, 1880-1886 (2011)

## 2.3 PATENTE REQUERIDA

- Duran, N.; Caverzan, J.; Marcato, P.D. “Nanopartícula Lipídica Carreadora e Seu Uso”. Processo número: BR 10 2013 033412 0, requerida em 19/12/2013.

## RESUMO

### **DESENVOLVIMENTO DE FORMULAÇÃO LIPÍDICA NANOESTRUTURADA UTILIZANDO MIRISTATO DE MIRISTILA E CERAMIDAS NO CARREAMENTO DE ESTRADIOL: AVALIAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA E BIOLÓGICA.**

A alopecia é uma doença caracterizada pela diminuição ou ausência de cabelos e/ou pelos, que gera estresse emocional para milhões de homens e mulheres no mundo. O tratamento da alopecia é realizado, em geral, com aplicação tópica de medicamentos como o 17-alfa-estradiol, que é um estereoisômero do hormônio sexual 17-beta-estradiol. Entretanto este fármaco, assim como outros utilizados no tratamento de alopecia, apresentam baixa eficácia. Para tentar reverter essa situação, a associação deste fármaco com sistemas de liberação sustentada pode aumentar a sua eficácia e reduzir os efeitos colaterais. Desta forma, o objetivo deste trabalho foi o desenvolvimento e a caracterização físico-química e biológica de carreadores lipídicos nanoestruturados (CLN) no encapsulamento de estradiol visando aumentar a eficácia deste fármaco no tratamento de alopecia. Os CLN foram preparados pelo método de microemulsão à quente/sonicação, e foram caracterizados quanto ao diâmetro e potencial Zeta, utilizando-se as técnicas de espectroscopia de correlação de fótons e mobilidade eletroforética respectivamente, sendo o diâmetro médio obtido no valor de  $96 \pm 15$  nm e o potencial zeta médio foi de  $-16 \pm 6$  mV. A eficiência de encapsulamento (EE) do 17-alfa-estradiol avaliada por cromatografia líquida/fluorescência foi de  $99,6 \pm 0,3\%$ . No estudo de estabilidade física dos CLN armazenados em temperatura ambiente foi observado que após dois meses os parâmetros de diâmetro, potencial Zeta, pH, EE e índice de recristalização não sofreram alterações significativas, demonstrando que a formulação de CLN desenvolvida neste projeto tem grande potencial como sistema de liberação do 17-alfa-estradiol. O poder de penetração cutânea dos CLN foi avaliado em célula de difusão de Franz e microscopia confocal, sendo que os resultados indicam que há acúmulo dos CLN nas porções mais externas da epiderme, o que sugere que esta formulação está dentro dos padrões de biosegurança, principalmente no folículo piloso, sítio de ação do fármaco. Além disso, as avaliações de internalização dos CLN em células de queratinócitos demonstraram que os nanocarreadores foram internalizados e acumularam-se principalmente em seu citoplasma.



## **ABSTRACT**

### **DEVELOPMENT OF NANOSTRUCTURED LIPID FORMULATION USING MYRISTATE MIRISTILA AND CERAMIDES IN CARRYING OF ESTRADIOL: ASSESSING PHYSICAL CHEMICAL AND BIOLOGICAL.**

Alopecia is a disease characterized by decreased or absent hair, which creates emotional stress for millions of men and women worldwide. The treatment of alopecia is accomplished, in general, topical application of drugs such as 17- $\alpha$ - estradiol , which is a stereoisomer of sex hormone 17 - $\beta$ - estradiol. However , this drug as well as others used in the treatment of alopecia, present low efficacy. To try to reverse this situation , the association of this drug with sustained release systems can increase their effectiveness and reduce side effects .

Thus, the aim of this work was the development and physico-chemical and biological characterization of nanostructured lipid carriers (NLC) in the encapsulation of estradiol to increase the effectiveness of this drug in the treatment of alopecia . The NLC were prepared by the microemulsion method to hot/sonication , and were analyzed for diameter and zeta potential using the techniques of photon correlation spectroscopy and electrophoretic mobility respectively, and the average diameter obtained from the value of  $96 \pm 15$  nm and the average zeta potential was  $-16 \pm 6$  mV. The encapsulation efficiency (EE) of 17- $\alpha$ -estradiol assessed by HPLC / fluorescence was  $99.6 \pm 0.3\%$ . In the study of physical stability of NLC stored at room temperature was observed that after two months the parameters diameter , zeta potential , pH , EE and recrystallization index did not change significantly , demonstrating that this project has developed NLC great potential as a delivery system of 17- $\alpha$ - estradiol. The power dermal penetration of NLC was evaluated in Franz diffusion cell and confocal microscopy , and the results indicate that there is accumulation of NLC in the outer portions of the epidermis, especially the hair follicle, suggesting that this formulation is within the standards of biosecurity. Furthermore , evaluations of internalization of NLC on keratinocytes cells demonstrated that nanocarriers were internalized and accumulated mainly in the cytoplasm .



## SUMÁRIO:

LISTA DE ABREVIATURAS.....	XIX
LISTA DE TABELAS.....	XXI
LISTA DE FIGURAS.....	XXII
1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1. Alopecia.....	1
1.2. Tratamentos da alopecia.....	2
1.3. Estradiol.....	4
1.4 Penetração dérmica.....	5
1.5. Sistemas de liberação sustentada de fármacos .....	8
1.6. Carreadores lipídicos nanoestruturados (CLN).....	10
1.7. Composição dos CLN.....	13
1.8. Óleo de Buriti .....	13
1.9. Ceramidas.....	14
2. OBJETIVOS .....	16
2.1. Geral .....	16
2.2. Específico .....	16
3. PARTE EXPERIMENTAL.....	17
3.1. Preparação das Partículas.....	17
3.2. Diâmetro médio (Z-average) e potencial zeta .....	18
3.3. Eficiência de encapsulamento.....	18
3.4. Calorimetria diferencial de varredura .....	18
3.5. Estabilidade física.....	19
3.6. Avaliação da toxicidade in vitro dos CLN e do 17-alfa-estradiol .....	19
3.7. Estudo de internalização dos CLN em queratinócitos humanos (HaCaT).....	20
3.8. Avaliação da permeação cutânea.....	20
3.9. Análise estatística.....	21
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	23
4.1. Teste solubilidade do 17-alfa-estradiol em diferentes sistemas:.....	21
4.2. Diâmetro médio, Potencial Zeta e EE.....	25
4.3. Calorimetria Diferencial de Varredura (DSC) .....	26
4.4. Estabilidade física.....	27

4.4.1. Estabilidade dos CLN com respeito ao pH.....	27
4.4.2. Estabilidade física com respeito à eficiência de encapsulamento (EE).....	28
4.4.3. Estabilidade física com respeito ao diâmetro e distribuição de tamanho.....	29
4.4.4. Estabilidade física com respeito ao potencial zeta .....	31
4.4.5. Estabilidade física com respeito ao índice de recristalização IR.....	32
4.5. Citotoxicidade.....	33
4.6. Estudos de interação das nanopartículas e queratinócitos humanos (HaCaT) .....	35
4.7. Estudos de interação das nanopartículas e pele humana .....	37
5. CONCLUSÕES.....	39
6. REFERÊNCIAS .....	40

## **LISTA DE ABREVIATURAS**

AGA: Alopecia androgenética

ANOVA – Analysis of Variance

CERs: Ceramidas

CLN: Carreador(es) lipídico(s) nanoestruturado(s)

DCT: Docetaxel

DHT: Dihidrotestosterona

DMSO: Dimetilsulfóxido

DPCP: Difenilciprona

DSC: Differential scanning calorimeter

EE: Eficiência de encapsulamento

E2: 17-beta-estradiol

IC50: Half maximal inhibitory concentration

MM: Miristato de miristila

MTT: 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-brometo de difeniltetrazólio

NLS: Nanopartículas lipídicas sólidas

PBS: Phosphate buffered saline

PI: Índice de polidispersidade

Rodamina PE: sal amônio de (N-(lissamina rodamina B sulfonil)-fosfatidiletanolamina)



## **LISTA DE TABELAS**

Tabela 1: Solubilidade do 17-alfaestradiol

Tabela 2: Diâmetro médio, PI, potencial Zeta e EE das dispersões de CLN.

Tabela 3: Variação da EE em função do tempo para CLN armazenados em geladeira (de 2 a 8 °C) e à temperatura ambiente.



## LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Exemplos da AGA em diferentes estágios (Sinclair e col.)

Figura 2: Estrutura do: a) minoxidil; b) finasterida; c) 17-alfa-estradiol

Figura 3: Vias de penetração de drogas através da pele (Morrow e col., 2007).

Figura 4: Representação esquemática da estrutura de NLS e NLC (adaptado de Souto e col., 2004)

Figura 5: Estrutura do Miristato de Miristila

Figura 6: A) Estrutura da esfingosina , B) Estrutura genérica da ceramida.

Figura 7: Estrutura da rodamina-PE

Figura 8: Redução do MTT a formazan

Figura 9: Termograma do 17-alfa-estradiol puro, dos CLN com e sem ativo, e da mistura física de seus componentes (miristato de miristila, ceramidas, Tween 80, óleo de buriti, 17-alfa-estradiol e pluronic F68).

Figura 10: Gráfico da variação do pH dos CLN armazenados em geladeira (de 2 a 8 °C) e à temperatura ambiente em função do tempo. A diferença estatística foi de ( $p > 0,05$ ) dada em relação ao ponto inicial (1º dia) para CLN armazenados a temperatura ambiente e em geladeira (de 2 a 8 °C), com e sem ativo. Resultados apresentados em forma de média e desvio padrão de 3 experimentos independentes ( $n=3$ ).

Figura 11: Gráfico do diâmetro e distribuição de tamanho (PI) dos CLN com e sem ativo (armazenados em geladeira) em função do tempo. (b) corresponde à diferença estatística ( $p < 0,01$ ) dada em relação ao ponto inicial (1º dia). Resultados apresentados em forma de média e desvio padrão de 3 experimentos independentes ( $n=3$ ).

Figura 12: Gráfico do diâmetro e distribuição de tamanho (PI) dos CLN (armazenados à temperatura ambiente) em função do tempo. (a) corresponde a diferença estatística ( $p < 0,05$ ) e (b) corresponde à diferença estatística ( $p < 0,01$ ) dadas em relação ao ponto inicial (1º dia). Resultados apresentados em forma de média e desvio padrão de 3 experimentos independentes ( $n=3$ ).

Figura 13: Gráfico da variação do potencial Zeta em função do tempo para CLN armazenados em geladeira (de 2 a 8 °C) e armazenados à temperatura ambiente. (a) corresponde a diferença estatística ( $p < 0,05$ ) e (b) corresponde à diferença estatística ( $p < 0,01$ ) dadas em relação ao ponto inicial (1º dia). Resultados apresentados em forma de média e desvio padrão de 3 experimentos independentes ( $n=3$ ).

Figura 14: Gráfico do índice de recristalização (IR) em função do tempo. A diferença estatística foi de ( $p > 0,05$ ) dada em relação ao ponto inicial (1º dia) para CLN armazenados a temperatura ambiente e em geladeira (de 2 a 8 °C), com e sem ativo. Resultados apresentados em forma de média e desvio padrão de 3 experimentos independentes ( $n=3$ ).

Figura 15: Viabilidade celular em função da porcentagem de formulação adicionada.

Figura 16: Viabilidade celular em função da concentração de 17-alfa-estradiol

Figura 17: Imagens de microscopia confocal dos CLN

Figura 18: Imagens de microscopia confocal das células tratadas com CLN

Figura 19: Imagem (microscopia confocal) dos cortes de pele tratados apenas com o fluoróforo. a) rodamina-PE (sinal vermelho); b) Actina marcada com faloidina ligada ao fluoróforo Alexa Fluor 488 (sinal verde); c) Núcleo marcado com TOPRO-3 (sinal azul); d) Campo claro; e) Sobreposição das imagens a, b e c.

Figura 20: Imagem (microscopia confocal) dos cortes de pele tratados apenas com o fluoróforo. a) rodamina-PE (sinal vermelho); b) Actina marcada com faloidina ligada ao fluoróforo Alexa Fluor 488 (sinal verde); c) Núcleo marcado com TOPRO-3 (sinal azul); d) Campo claro; e) Sobreposição das imagens a, b e c.

Figura 21: Imagem (microscopia confocal) dos cortes de pele tratados com CLN marcados: a) CLN marcado com rodamina-PE (sinal vermelho); b) Actina marcada com faloidina ligada ao fluoróforo Alexa Fluor 488 (sinal verde); c) Núcleo marcado com Tropo-3 (sinal azul); d) Campo claro; e) Sobreposição das imagens a, b e c.

Figura 22: Imagem (microscopia confocal) dos cortes de pele tratados com CLN marcados: a) CLN marcado com rodamina-PE (sinal vermelho); b) Actina marcada com faloidina ligada ao fluoróforo Alexa Fluor 488 (sinal verde); c) Núcleo marcado com Tropo-3 (sinal azul); d) Campo claro; e) Sobreposição das imagens a, b e c.

# 1. INTRODUÇÃO

## 1.1. Alopecia

A alopecia androgenética (AGA) é hereditária e identificada pelo afinamento progressivo dos fios de cabelo (figura 1) que segue uma padrão definido, ela é caracterizada pelo encurtamento progressivo da duração da fase anágena nos ciclos sucessivos de cabelo , levando à diminuição do número de fios de cabelo (Rogers e Avram, 2008).

Normalmente , a maioria dos fios de cabelo do couro cabeludo está na fase anágena, ou fase de crescimento , com uma pequena porcentagem de cabelos na fase de repouso ou telógena, sendo perdido diariamente de 100 a 200 fios de cabelo. Uma maior porcentagem de cabelos na fase de repouso é suficiente para se notar um início da perda de cabelo. O exame geralmente revela "normal" a densidade do cabelo no couro cabeludo, isso porque mais de 50 % do cabelo deve ser perdida antes que a perda de cabelo seja clinicamente aparente (Mirmirani, 2013).

A alopecia androgenética (AGA) é a causa mais frequente de perda contínua e progressiva de cabelo. Apesar de ser condição benigna e tão comum, tem impacto psicossocial acentuado nos doentes, principalmente do sexo feminino, uma vez que a perda de cabelo influencia negativamente os relacionamentos pessoais e sociais. (Lobo e col., 2008). Estudos revelam que o impacto da queda de cabelo sobre a qualidade de vida assemelha-se aos quadros de psoríase entre as mulheres, fundamentalmente pela piora em sua auto-estima (Poot, 2004).

Estima-se que mais de 30% das mulheres brancas apresentem quadros de alopecia androgenética antes dos 50 anos de idade (Mortimer e col., 1984), Norwood (2001) observou que o padrão feminino de alopecia é relativamente comum, iniciando-se ao final da terceira década e atingindo praticamente 30% das mulheres acima dos 30 anos de idade. A alopecia androgenética e o eflúvio telógeno crônico respondem por quase 90% das queixas relacionadas a perdas de cabelos. Incluem-se, nas causas restantes, as disfunções tireoideanas, a alopecia areata e as alopecias cicatriciais (Rushton, 1993).

Dada a relevância do tratamento dessa doença, muitas pesquisas buscam entender suas causas. A etiologia da doença é bastante complexa e não está claramente definida, algumas causas propostas para perda de cabelos são: a inflamação folicular microscópica e o metabolismo androgênico (Rivitti, 2005; Trueb, 2002).

O metabolismo androgênico é sugerido como causa da alopecia há muito tempo e tem sido bastante investigado. Aristóteles foi o primeiro que observou que 'masculinidade' e maturidade sexual eram necessárias para a calvície, pesquisas levam a crer que andrógenos, na forma de testosterona ou seus metabólitos, são indispensáveis para o desenvolvimento de calvície comum. Estudos mostram que os homens que foram castrados antes da puberdade não desenvolveram AGA, e que esta pode ser acionada em homens castrados por injetar testosterona (Kaufman, 1996). Outra evidência da testosterona como um fator etiológico em calvície de padrão masculino é mostrado pela ausência dessa condição em homens com uma deficiência congênita do tipo 2 de 5 $\alpha$  -reductase (Olsen e col., 2006).

O complexo pilo-sebáceo é uma estrutura com capacidade de síntese e metabolização de andrógenos bem como constitui um tecido-alvo para a ação dos mesmos. No citoplasma, a testosterona é convertida a dihidrotestosterona (DHT) pela 5- alfa- reductase. A DHT se liga ao receptor androgênico e, posteriormente, este dímero migra para o interior do núcleo da célula. O complexo ativado receptor-hormônio age na regulação da transcrição de genes, por meio de sua ligação aos elementos responsivos presentes na região reguladora dos genes-alvo (Richet, 2011).

Embora haja muitos estudos sobre o mecanismo da AGA este ainda é pouco compreendido, por se tratar de um mecanismo complexo, o que pode ser notado também pelo grande número de agentes terapêuticos de baixa eficácia.



Figura 1: Exemplos da AGA em diferentes estágios (Sinclair e col.):

## 1.2. Tratamento da alopecia

De acordo com a complexidade da etiologia da AGA, há varias formas de tratamento. Um dos medicamentos usados é a finasterida (figura 2 b), trata-se de um medicamento de uso oral que é um inibidor competitivo do tipo 2 da 5 $\alpha$ -redutase, que inibe a conversão de testosterona em DHT . A justificativa para o uso de finasterida no tratamento da AGA em homens é baseada na ausência de AGA em homens com deficiência congênita do tipo 2 da 5 $\alpha$ -redutase , e a presença de aumento da atividade 5 $\alpha$ -redutase e dos níveis de DHT no couro cabeludo calvo ( Kaufman e col., 1998). Finasterida é contra-indicada em mulheres que estão ou podem ficar grávidas , porque inibidores da 5 $\alpha$ -redutase podem causar malformação da genitália de fetos do sexo masculino; alguns estudos apontam para outros efeitos indesejáveis como diminuição da libido e impotência sexual (Rogers e Avram, 2008).

Devido aos efeitos colaterais, medicamentos de uso oral são menos priorizados em relação aos de uso tópico, tais como Minoxidil (figura 2 a)., que atua como abridor do canal de potássio e vasodilatador (Lachgar e col., 1998), e estrógenos que assim como a Finasterida, atuam como inibidores da 5 $\alpha$ -redutase.

Estrógenos são conhecidos há mais de 70 anos, por desempenharem um papel importante no controle do crescimento do cabelo. Na década de 30, foi relatado pela primeira vez que o crescimento do cabelo e hormônios sexuais em animais estão intimamente ligados. No final dos anos 50, foi publicado um trabalho pioneiro no campo, mostrando que estrógenos aumentam a taxa mitótica na epiderme de roedores e de homens, e reduz a atividade das glândulas sebáceas. Estas pesquisas estimularam a crença de que hormônios femininos (estrógenos, prolactina, progesterona) influenciam o ciclo de crescimento do cabelo (Movérare e col., 2002). Um dos hormônios que é utilizado no tratamento de alopecia é o estradiol (Figura 2 c). Estudos *in vivo* demonstraram que o uso tópico de estradiol promove, a longo prazo, o crescimento de pelos em ratos (Bodó e col., 2000) sendo que, já existem algumas patentes sobre formulações contendo estradiol para tratar a alopecia. Um exemplo, é a patente de Kanebo (2008), que propõe tônicos capilares que contêm estradiol extraído da planta Fushi (espécies de *Aconitum Ranunculaceae*).

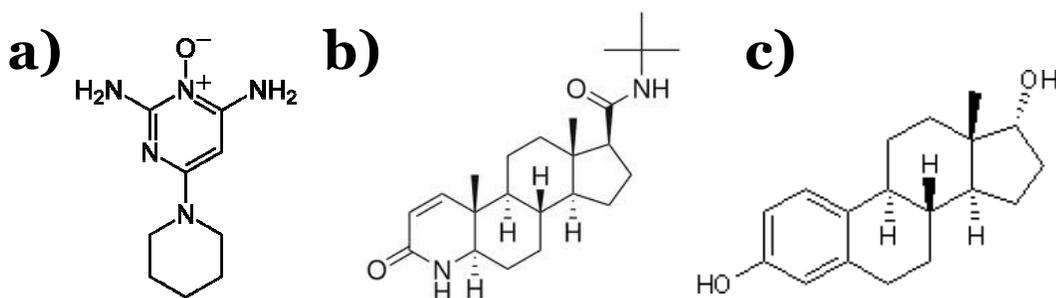


Figura 2: Estrutura do: a) minoxidil; b) finasterida; c) 17-alfa-estradiol

### 1.3. Estradiol

17-beta-estradiol (E2) é um hormônio esteroide produzido nos ovários, testículos, e pela glândula adrenal. Como outros esteroides, E2 passa pela membrana celular e se combina com um receptor intranuclear formando um dímero, que ativa determinados genes, estimulando a produção de proteínas (Nakamagoe e col., 2010).

A principal função fisiológica de E2 é a maturação sexual das mulheres, mas recentes pesquisas mostram que E2 também atua como um neuroesteróide, protegendo os neurônios contra degeneração e morte. Além disso, E2 tem efeitos protetores contra lesão cardiovascular isquêmica, insuficiência renal e disfunção hepática (Nakamagoe e col., 2010).

Na pele, E2 desempenha várias funções, como, por exemplo, manter a umidade, aumentando glicosaminoglicanos como ácido hialurônico (Brincat, 2000). O estrogênio, em conjunto com a progesterona, impede ou repara a atrofia da pele, rugas e ressecamento associados com fotoenvelhecimento. Isto porque, o E2 ocasiona melhoria da orientação das fibras elásticas na derme. Além disso, E2 aumenta a espessura da pele, bem como sua vascularização (Ohnemus e col., 2006).

E2 apresenta várias funções fisiológicas, e é também muito utilizado em terapias de reposição hormonal. Atualmente, tem sido usado no tratamento tópico da alopecia androgenética (Hoffmann e col., 2002).

Orfanos (1980) mostrou que em 63% dos pacientes tratados com loção contendo 17-alfa-estradiol houve uma redução da quantidade de cabelos na fase telógena, que é a fase onde não há crescimento do cabelo. Estes resultados indicam que as loções capilares

contendo este fármaco podem ter valor terapêutico na redução da perda de cabelo, se aplicado topicamente durante um longo período de tempo. Além disso, este estudo mostrou que o fármaco não apresentou efeitos adversos.

Estudos demonstraram que o uso tópico de solução de 17-alfa-estradiol de 0,025% é seguro e eficaz para mulheres no tratamento da perda de cabelo (Kim e col., 2012), no entanto, apresentou baixa eficiência, assim como outros fármacos de uso tópico. A baixa eficiência pode estar relacionada à dificuldade do ativo em atingir as células que dão origem ao pelo, visto que a pele tem função de barreira contra agentes externos. Considerando que o tamanho e composição de partículas são parâmetros que influenciam na sua penetração em pele, recentes pesquisas retratam que o encapsulamento de agentes terapêuticos em sistemas de liberação sustentada é uma alternativa para se melhorar a permeação dérmica e consequentemente a eficácia de fármacos de uso tópico (Tomoda e col., 2012; Morrow e col., 2007).

#### **1.4. Penetração Dérmica**

Os fármacos podem ser administrados por diversas vias como, por exemplo, oral, tópica, intravenosa entre outras. O uso tópico de medicamentos quando comparado ao uso intravenoso é mais vantajoso, pois ameniza os efeitos colaterais. Em contrapartida, a eficiência do medicamento se torna dependente da penetração do ativo na pele. (Morrow e col., 2007).

A principal barreira para a penetração da maioria das moléculas na pele é o estrato córneo, que é a camada mais externa da pele. A espessura desta camada é tipicamente 10 µm. O estrato córneo consiste de 10-25 linhas de queratinócitos (corneócitos) mortos embebidos numa matriz lipídica. Os corneócitos são células achatadas, alongadas e sem núcleos e outras organelas. Os principais lipídeos localizados no estrato córneo são ceramidas, ácidos graxos, o sulfato de colesterol, colesterol etc. Estes lipídeos são dispostos em múltiplas bicamadas chamadas lamelas. As ceramidas são o maior grupo de lipídios no estrato córneo (cerca de metade da massa de lipídios totais) e são cruciais para a organização dos lipídeos do estrato córneo. A propriedade de barreira do estrato córneo tem sido atribuída às múltiplas bicamadas lipídicas, que evitam a dessecação dos tecidos

subjacentes por perda de água e limitam a penetração de substâncias a partir do ambiente externo (Morrow e col., 2007).

Existem três maneiras em que uma molécula pode atravessar o estrato córneo intacta: via anexos cutâneos (glândulas sebáceas e sudorípara); através dos domínios lipídicos intercelulares, ou por uma rota transcelular (Figura 3). É provável que as substâncias permeiem por uma combinação destas vias, dependendo das propriedades físico-químicas da molécula (Morrow e col., 2007). Apesar destas 3 vias de entrada de moléculas na pele, a maioria não consegue penetrar sendo um grande desafio para o desenvolvimento de fármacos administrados topicamente. Nesta linha, algumas estratégias tem sido desenvolvidas como, por exemplo, o encapsulamento de fármacos em nanoestruturas (Marcato e col., 2011, Ridolfi e col., 2012). Os lipossomas e as nanopartículas lipídicas sólidas (NLS) são exemplos de nanoestruturas usadas como sistemas de liberação controlada de fármacos. A penetração dérmica destas partículas foi estudada e verificou-se que a penetração dérmica dos fármacos veiculados a estes sistemas é maior em comparação com a penetração dérmica do ativo livre. Este aumento de penetração pode estar relacionado com as interações dos lipídeos da nanoestrutura com os lipídeos da pele aliados ao reduzido tamanho das partículas (Morrow e col., 2007).

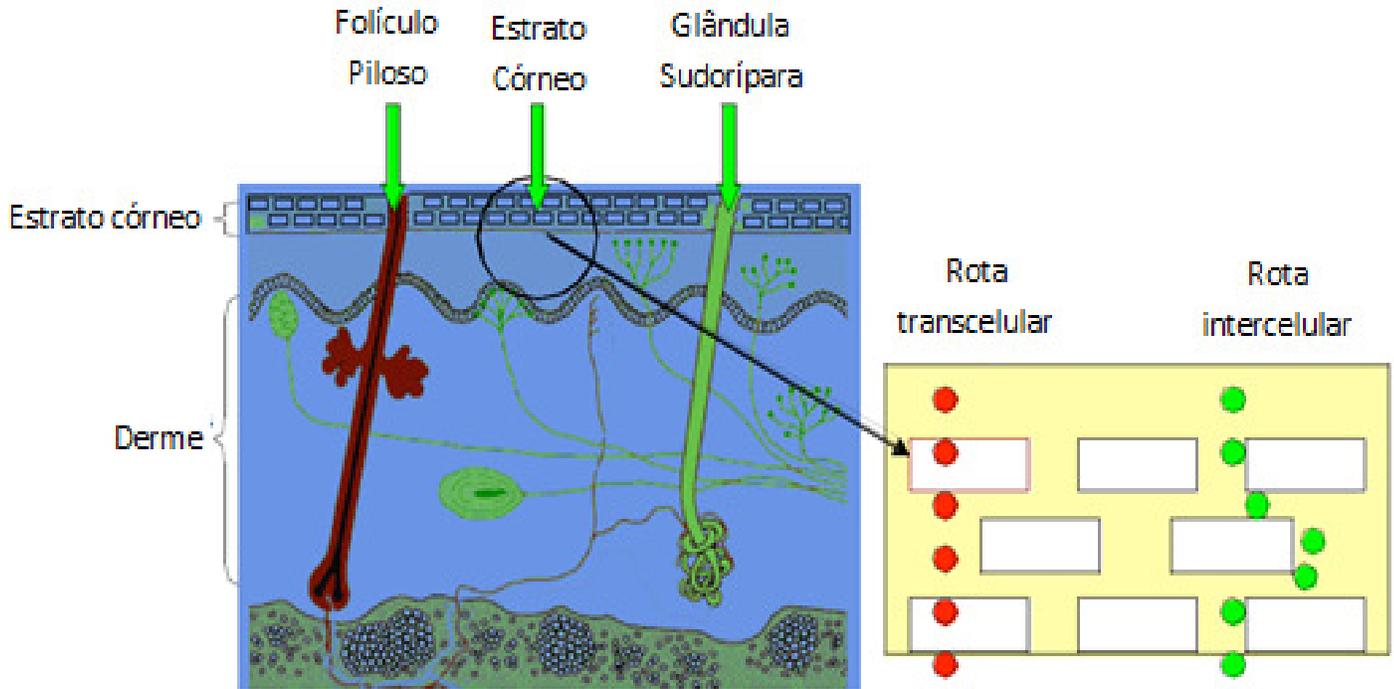


Figura 3: Vias de penetração de drogas através da pele (Morrow e col., 2007).

As micelas (Hendradi e col. 2003) ou nanopartículas de lípidos sólidas (Pardeik e col. 2009; Muller e col. 2000) foram eficientes como material de transporte em pele. O trabalho de Kim e col (2014) indica que nanoemulsões carregadas com capsaicina têm um grande potencial como sistema de libertação transdérmica para a eficaz penetração através de todas as camadas da pele.

Lu e col. (2014) demonstraram que a permeação do D-limoneno foi maior com nanoemulsão do que micro-emulsão e controles, eles fornecem a evidência inicial da entrega transdérmica de nanoemulsões de D-limoneno. No estudo de Nam e col. (2013), carreadores lipídicos nanoestruturados (CLN) carregados de tacrolimus tiveram sucesso na penetração cutânea, a taxa de permeação destes CLN através da pele de um rato calvo foi maior do que a versão comercial Protopic®, que é uma pomada dérmica contendo tacrolimus. Estes resultados sugerem que CLN carregados de tacrolimus têm significativo potencial para utilização como uma formulação tópica.

Nanopartículas ou outros transportadores de drogas podem triunfar sobre a barreira da pele de várias maneiras, como por exemplo, alguns dos componentes de nanopartículas, especialmente surfactantes são conhecidos por serem ativadores de permeação da pele. Pode-se constatar essa teoria através do trabalho de Akhtar e col. (2011), onde o fluxo de fármaco e o coeficiente de permeabilidade da pele foram aumentados na presença de Tween 80 e Tween 20 por 3.9 e 5 vezes respectivamente, em comparação com o controle, sem provedor de permeação (surfactantes). À medida que a polaridade de um microambiente varia, micelas normais de surfactantes podem ser transformadas em micelas reversas e vice-versa, esta propriedade dos surfactantes está relacionada aos mecanismos de sua ação como ativador de permeação. ( Cevce e col., 2010; Morrow e col., 2007).)

Segundo Schwarz (2013) o aumento de permeabilidade não é só um efeito do tamanho de partículas, mas também é influenciada pelo estado físico da matriz lipídica de partículas (líquido ou sólido) e as propriedades relacionadas com este estado (propriedades de formação de filme, a extensão da oclusão, composição química e liberação do fármaco a partir da matriz).

## **1.5. Sistema de liberação sustentada de fármacos**

Em geral, estes sistemas apresentam um diâmetro abaixo de 1  $\mu\text{m}$  e são compostos de lipídeos ou polímeros estabilizados por agentes tensoativos (Marcato e Durán, 2008; Mehnert e Mader, 2001). Eles podem ser utilizados para melhorar propriedades farmacocinéticas de diversos fármacos e ativos, dentre os principais mecanismos podemos destacar sua capacidade de manter o efeito do ativo no tecido alvo, solubilizar ativos, melhorar a estabilidade física e química de agentes terapêuticos, minimizar os efeitos colaterais e reduzir a toxicidade, sendo que em alguns casos apresentam a vantajosa capacidade de atravessar barreiras como, por exemplo, membrana (Marcato e Durán, 2008; Miyazaki e col., 2003).

Devido a esta habilidade, nanopartículas estão sendo cada vez mais utilizadas para facilitar a entrada de partículas que podem interagir com a pele em nível celular. Essa interação de nanopartículas com a pele permitiu o uso desta estratégia para melhorar a

reatividade imune para aplicações tópicas de vacinas, assim como a produção de nanopartículas de prata – usada como agentes antimicrobianos (Prow e col., 2011). A doxorrubicina é um medicamento muito utilizado no tratamento de tumores de pele porém este fármaco apresenta baixa penetração cutânea e instabilidade. Por este motivo a doxorrubicina foi incorporada em NLSs aumentando significativamente a permeação e retenção do fármaco na pele (Taveira, 2009).

Dentre os sistemas de liberação controlada as nanopartículas lipídicas se destacam por apresentarem as seguintes vantagens: podem ser produzidas em larga escala, não utilizam solventes orgânicos em sua composição e são biocompatíveis.

Nanopartículas lipídicas sólidas ( NLSs ) foram introduzidas pela primeira vez em 1990 como um transportador alternativo a transportadores coloidais tradicionais , tais como emulsões , lipossomas e nanopartículas poliméricas. NLSs são compostas principalmente de lipídeos sólidos, que assim lhes transmitem algumas das propriedades fundamentais destes lipídeos, incluindo biocompatibilidade , biodegradabilidade e baixa toxicidade. Sendo similar na composição , as NLSs assumem algumas das vantagens de transportadores de drogas como emulsões e lipossomas , que são benignas para o corpo e menos tóxicas devido às semelhanças das suas composições para substâncias fisiológicas . (Qi e col., 2012)

A estrutura de matriz de NLSs fornece a elas características de liberação controlada bem semelhantes as nanopartículas poliméricas. Outras vantagens da NLSs dizem respeito aos métodos de obtenção, que são fáceis e escalonáveis, o baixo ponto de fusão de lipídeos sólidos , normalmente menos do que 70 ° C influencia positivamente o processo de fabricação destas, particularmente , NLS pode ser preparada por meio de homogeneização a alta pressão, sob temperatura acima do ponto de fusão dos lipídeos , seguido por congelamento a uma temperatura relativamente baixa . Outra vantagem é a exclusão de solventes tóxicos voláteis do processo. Como a maioria dos outros tipos de nanopartículas, NLSs podem ser obtidas com tamanho muito pequeno, de algumas dezenas a algumas centenas de nanômetros. Até agora , têm sido estudadas NLSs para aplicação por meio de uma variedade de vias de administração , tais como o por via oral , transdérmica , ocular , intravenosa , rectal , bucal e pulmonar (Qi e col., 2012) . No entanto , o desenvolvimento de NLSs é impedida por algumas barreiras: A mais importante é a baixa capacidade de carga

de fármaco , geralmente dentro do intervalo de 1 a 10 %, a eficiência de carregamento de fármacos hidrofílicos é extremamente baixa. Em segundo lugar , a estabilidade de armazenamento de longo prazo de NLSs não é boa o suficiente por causa do estado polimórfico dos lipídeos , o que torna o desenvolvimento de formulações de NLSs muito difícil. Para superar os problemas associados com NLSs outros tipos de partículas surgiram, tais como os carreadores lipídicos nanoestruturados (CLN) , bem como conjugados de medicamentos lipídicos, estas são estratégias promissoras para alcançar estabilidade suficiente durante o armazenamento e melhorar a encapsulação de moléculas hidrofílicas (Qi e col. 2012).

Os CLN são mais vantajosos em relação às demais estruturas citadas, pois pode minimizar a expulsão do fármaco durante o armazenamento, como esquematizado na Figura 4, isso ocorre porque ele é composto de uma mistura de lipídeos sólidos e líquidos (óleos), o óleo misturado com o lipídio sólido gera partículas em um estado sólido amorfo, reduz a rigidez e a estrutura ordenada da matriz lipídica, (Üner e col., 2007; Jennings e col., 2000; Muller e col., 2002).

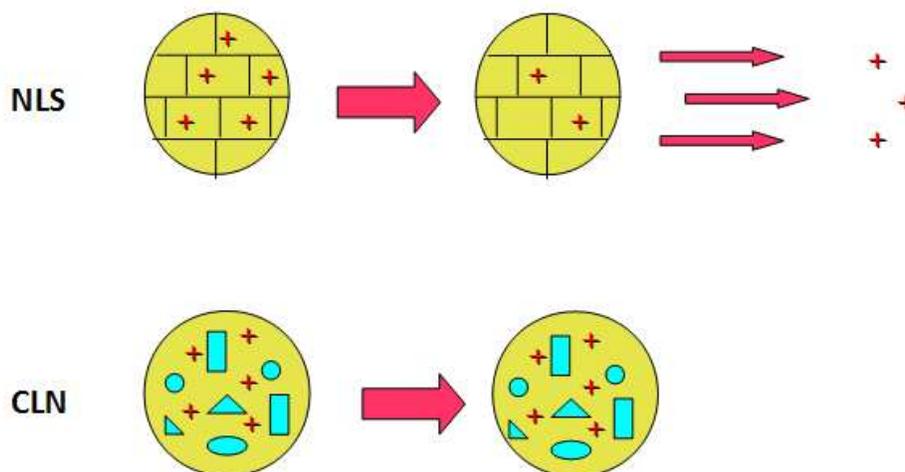


Figura 4: Representação esquemática da estrutura de NLS e CLN (adaptado de Souto e col., 2004).

## 1.6. Carreadores lipídicos nanoestruturados (CLN)

O sucesso de um sistema de entrega pode ser julgado em primeiro lugar, pelo tempo decorrido entre a descoberta (depósito / patente) e a introdução dos primeiros produtos no mercado e, em segundo lugar, pelo número total de produtos que aparecem no mercado nos anos seguintes. Desde a descrição de lipossomas por Bangham em 1968 passaram-se cerca de 18 anos até entrar no mercado de cosméticos, levou mais de 20 anos antes de entrar no mercado farmacêutico (cerca de 1990). Os CLN foram desenvolvidos em 1999, os primeiros produtos entraram no mercado em 2005, apenas 6 anos depois. Os CLN tiveram um começo muito promissor; o número de produtos que virão poderão mostrar se os CLN são a geração de nanocarreadores mais bem-sucedida após os lipossomas (Muller, 2007).

Um dos produtos que contém CLN é o NanoLipid Restaurar CLR ( Chemisches Laboratorium Dr. Kurt Richter, Berlim, Alemanha) que é um produto cosmético semi - acabado . O óleo de semente de groselha negra é facilmente oxidado por isso foi incorporado em CLN, estes são capazes de proteger o ativo contra a oxidação, o que aumenta a estabilidade do produto final. Isso foi comprovado através da realização de um teste de estresse oxidativo comparando NanoLipid Restaurar CLR com uma nanoemulsão de referência (contendo Miglyol 812 ). A estabilidade de coenzima Q10 em NanoLipid Restaurar CLR também foi avaliada e os resultados mostraram que CLN promove uma maior estabilidade da coenzima Q10. NanoLipid Restaurar CLR foi usado na prestigiada linha de produtos cosméticos IOPE ( Amore Pacific , Seul, Coréia do Sul) introduzido no mercado em Setembro de 2006 (Muller e col., 2007).

Esses produtos demonstram uma das grandes vantagens de se encapsular ativos em CLN, que é a proteção do mesmo contra a degradação, que é também relatada no trabalho de Shah e col. (2007), eles mostraram que nanopartículas podem ser uma boa opção para dar fotoestabilidade em comparação com os veículos vesiculares, este trabalho foi realizado para tretinoína, mas pode ainda ser extrapolado para várias outras drogas similares.

Além da fotoestabilidade outro parâmetro importante a se discutir é a estabilidade dos CLN ao longo do período de estocagem da formulação. Boa estabilidade ao longo de um período de armazenamento de três meses foi relatado para clotrimazol encapsulado em CLN (Souto et al. , 2004) . No estudo de Bose e col. (2013), uma parte do lipídeo sólido foi substituído por um lipídeo no estado líquido (ácido oleico) para produzir sistemas CLN no

encapsulamento de quercetina, este demonstrou que as medidas de tamanho das partículas e os valores de potencial zeta não sofreram alterações significativas ao longo do tempo, a estabilidade foi mantida por mais de 3 meses.

Outra das vantagens do encapsulamento de ativos é a liberação sustentada deste no local de ação, isso pode ser constatado no trabalho de Ricci e col. (2005), eles encapsularam em CLN a Indometacina, um dos mais potentes anti-inflamatórios utilizados para o tratamento de dermatites e doenças reumáticas. Eles mostraram que o efeito anti-inflamatório foi prolongado quando a indometacina estava encapsulada em CLN.

Além de prolongar o efeito dos agentes terapêuticos, os CLN podem ainda potencializá-los, como relata Agrawal e col. (2010), os resultados desta investigação demonstram o quão promissor é o gel de Acitretina encapsulada em CLN no tratamento de pacientes com psoríase, este trabalho comprova clinicamente que o uso de CLN melhorara a resposta terapêutica; mais benefícios do gel de acitretina-CLN foram observados em termos de redução de efeitos adversos da terapia. Resultados similares foram obtidos por Mendes e col. (2013), neste trabalho miconazol, fármaco antifúngico, foi incorporado em CLN permitindo uma liberação controlada e a melhoria da sua atividade antifúngica, o que resulta numa redução da dose necessária em cada administração, enquanto minimizam os efeitos colaterais.

Este efeito potencializador pode estar relacionado com a maior permeabilidade do ativos, neste sentido Han e col. (2008) encapsularam Flurbiprofeno, anti-inflamatório, este é usado no tratamento de osteoartrite, artrite reumatoide e queimadura de sol. Eles encontraram que a permeação do flurbiprofeno através da pele de ratos é maior quando encapsulado em CLN, comparado ao ativo livre em tampão fosfato.

A investigação de (Aljuffati, 2013) avaliou o possível direcionamento de difenilciprona DPCP e minoxidil na pele e folículos pilosos a partir do encapsulamento desses em CLN composto de esqualeno. Os resultados experimentais mostraram que as partículas poderiam melhorar a deposição de DPCP e minoxidil na pele quando comparado com a solução de propilenoglicol a 30%. Verificou-se que partículas com minoxidil regulam a expressão de fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) de células da papila dérmica humana, indicando uma eficiência na função destas células. Os resultados deste estudo indicam que é viável

usar partículas de esqualeno para melhorar a acumulação do fármaco na pele e folículos e assim otimizar o tratamento de doenças relacionadas com o folículo, tais como alopecia, foliculite, rosácea, e acne. Este estudo também sugere que a composição dos CLN é um fator importante para melhoria de penetração dérmica.

## 1.7. Composição dos CLN

Tendo em vista que a composição do carreador é muito importante para que se possa obter um bom sistema de entrega de agentes terapêuticos, escolheu-se para obtenção dos CLN o lipídeo sólido sintético Miristato de Miristila (Croda), cuja estrutura está representada na Figura 5. Segundo Fronza (2006) este já é utilizado em produtos cosméticos devido ao seu ponto de fusão baixo (37-39 °C). Além disso este lipídeo já foi empregado em nanopartículas lipídicas com sucesso (Ridolffi e col., 2012); Os lipídeos líquidos, ceramidas e óleo de buriti foram escolhidos pelas suas adequadas propriedades e por seu consagrado emprego na indústria cosmética.

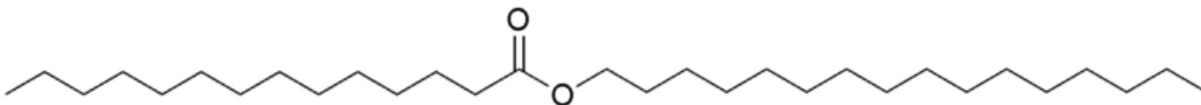


Figura 5: Estrutura do Miristato de Miristila

## 1.8. Óleo de buriti

O óleo de *Mauritia flexuosa*, mais conhecida como buriti, é extraído da polpa deste fruto, e apresenta composição rica em ácidos graxos insaturados (ácido palmítico e oléico) e alto teor de carotenóides, comportando-se como uma das fontes de pró-vitamina A; a alta concentração de tocoferóis resulta em uma excelente atividade antioxidante e alta estabilidade oxidativa (Mariath e col., 1989).

Devido a essas importantes propriedades esse óleo é muito utilizado na indústria cosmética, e isso também indica que bons resultados podem ser alcançados na associação deste à nanopartículas lipídicas, como descrito no artigo de Zanatta e col. (2010), neste

trabalho foi verificado que as emulsões de óleo Buriti poderiam ser consideradas potenciais veículos para transportar fármacos.

No presente trabalho tivemos como objetivo o encapsulamento do ativo em nanopartículas lipídicas, sendo assim, a composição das partículas favorece sua interação com a pele devido à biocompatibilidade dos lipídeos.

Além das biocompatibilidade dos lipídeos, o óleo de buriti pode ainda funcionar como ativo, pois extratos naturais de várias plantas têm sido utilizados para a promoção do crescimento do cabelo, como *Asiasari radix*, *Eclipta alba* e óleo essencial de *Chamaecyparis obtusa*, *Zizyphus jujuba* e *Sophora flavescens* (Ruksiriwanich e col., 2011). Os ácidos graxos insaturados, tais como o ácido linoleico e ácido oléico, demonstraram ter atividade contra queda de cabelo por inibição da enzima 5-alfa-redutase. Estes ácidos graxos podem ser encontrados em quantidades variáveis em algumas plantas comestíveis, tais como *Carthamus tinctorius* L. (Açafrão), *Helianthus annuus* L. (girassol), *Linum usitatissimum* L. (linhaça), *Sorghum bicolor* (L.) Moench (sorgo) e farelo de *Sativa L. of oryza* (arroz) (Ruksiriwanich e col., 2011).

McDaniel (2009) relatou o uso de ácido linoleico (2%) no tratamento de alopecia, já que esta pode ser causada por microinflamações promovidas por *Propionibacterium acnes*, cujos metabólitos levam à miniaturização dos folículos. Nesta linha, já existe patente com o uso de ácido linoléico em formulações de xampu que impede a perda de cabelo e promove seu crescimento (KITANO, 1985)

## **1.9. Ceramidas**

As ceramidas (CERs) pertencem ao grupo dos esfingolipídeos, constituem uma classe de lipídeos polares estruturais presentes no complexo da membrana celular. Sua “espinha dorsal” é a esfingosina (Figura 6A), um amino álcool de 18 carbonos que é acilada com um ácido graxo de cadeia longa, como esquematizado na Figura 6B. Ceramidas podem ser isoladas das fibras capilares em sua forma livre, ou seja, não são covalentemente ligadas ao complexo da membrana celular (Sant'anna , 2000).

CERs são partes integrantes das lamelas de lipídeos intercelulares do estrato córneo (SC), que é responsável pela função de barreira na pele dos mamíferos. Diversas doenças como psoríase, dermatite atópica e dermatite alérgica estão associadas com a depleção ou perturbação do nível de CERs no SC. Assim, a administração apropriada de CER (s) pode ajudar a prevenir e tratar doenças da pele (Sahle e col., 2012).

Muitas formulações cosméticas com o uso de CERs estão disponíveis comercialmente na forma de creme, pomada, loção, emulsão, gel, spray, óleo cosmético ou lipossomas. Todos estes produtos são úteis para o tratamento de dermatite atópica, pele seca, eczema disidrótico, dermatite irritante crônica cumulativa, envelhecimento da pele, danos à pele por exposição à luz UV ou relacionada com a diabetes (Wolf, 2009).

Devido a esta compatibilidade das ceramidas com a pele, demonstrado pela quantidade de produtos cosméticos disponíveis no mercado, torna-se relevante a preparação de nanopartículas com CERs, assim como no caso do trabalho de Hyun-Jong e col. (2011). Eles demonstraram que nanopartículas de ácido hialurônico, ceramida estabilizadas com Pluronic foram usadas no encapsulamento do medicamento docetaxel (DCT), mostrando que as nanopartículas desenvolvidas aumentaram a absorção intracelular do DCT.

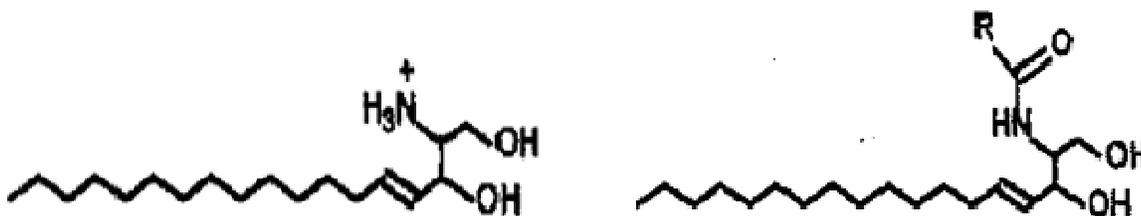


Figura 6: A) Estrutura da esfingosina , B) Estrutura genérica da ceramida

## 2. OBJETIVOS

### 2.1. Geral

Preparar e caracterizar carreadores lipídicos nanoestruturados (CLN) no encapsulamento de 17-alfa-estradiol visando o seu uso tópico no tratamento de queda de cabelo.

### 2.2. Específicos

- Preparação de formulações de CLN utilizando como lipídeo sólido: miristato de miristila; e como lipídeos líquidos: óleo de buriti e ceramidas.
- Caracterização dos CLN quanto ao diâmetro e potencial Zeta pela técnica de espectroscopia de correlação de fótons e mobilidade eletroforética respectivamente;
- Caracterização dos CLN quanto ao índice de recristalização e ponto de fusão pela técnica de calorimetria diferencial de varredura.
- Quantificação da eficiência de encapsulamento
- Avaliação da estabilidade física das dispersões de CLN armazenadas em geladeira (2 a 8 °C) e a temperatura ambiente pelo monitoramento das variáveis: diâmetro, potencial Zeta, índice de recristalização, pH e eficiência de encapsulamento, ao longo do tempo.
- Avaliação da permeação cutânea *in vitro* em células de Franz.
- Avaliação da toxicidade *in vitro* das formulações de CLN com e sem 17-alfa-estradiol.
- Avaliação da internalização dos CLN em queratinócitos humanos (HaCaT).



### **3.2. Diâmetro médio (Z-average) e o potencial Zeta**

A dispersão de nanopartículas foi diluída em água deionizada (1:10 v/v), então o diâmetro médio (Z-average) e o potencial Zeta foram medidos pela técnica de espectroscopia de correlação de fótons e mobilidade eletroforética respectivamente, utilizando o equipamento Nano ZS Zetasizer Malvern®, com ângulo fixo de 173° e temperatura de 25°C (Melo e col., 2011).

### **3.3. Eficiência de Encapsulamento**

A eficiência de encapsulamento (EE) foi obtida medindo-se a concentração de 17-alfa-estradiol livre no meio de dispersão. Para isso, uma alíquota de 500 µL da dispersão de CLN foi transferida para tubos de centrifugação acoplados a filtros Microcon contendo uma membrana de ultrafiltração (MWCO 10.000, Millipore®) para a retenção das partículas. Os tubos foram centrifugados a 6526 rpm em uma centrífuga 5424 Eppendorf® por 5 minutos, 30 µL do filtrado foi diluído em 200 µL de água deionizada e a concentração de 17-alfa-estradiol no filtrado diluído foi analisada por cromatografia líquida como descrito abaixo:

Para a avaliação da EE foi realizado, inicialmente, uma curva de calibração do ativo. Para isto, preparou-se uma solução estoque de 27,5 ng/L de 17-alfa-estradiol em acetonitrila e água e, por diluições sucessivas, preparou-se 5 concentrações do ativo na faixa de 2,75 a 27,5 ng/L. Para leitura foi usado o cromatógrafo líquido de ultra-performance Waters Acquity com detectores de arranjo de diodos e fluorescência. A análise foi realizada a 25°C em uma coluna C18 (2,1 milímetros × 50 milímetros, Acquity UPLC- Waters) com um pré-filtro. A fase móvel utilizada foi água:acetonitrila (70:30), filtrada através de uma membrana de 0,22 µm (Millipore), o fluxo foi isocrático de 0,2 mL/min, e o detector foi fixado no comprimento de onda de 312 nm para emissão, e excitação em 280 nm (Gatti e col., 1998).

### **3.4. Calorimetria Diferencial de Varredura**

Os termogramas dos CLN liofilizados assim como o da mistura dos componentes utilizados para sua preparação (miristato de miristila, ceramidas e óleo de buriti) foram obtidos por DSC (differential scanning calorimeter) (DSC Q100 V9.9 Build 303, TA instruments) utilizando porta-amostras de alumínio do tipo selado. As análises foram feitas

sob fluxo gasoso de nitrogênio (50.0 mL/min) e taxa de aquecimento de 5°C/min. O índice de recristalização foi calculado de acordo com a equação a seguir:

$$\text{IR (\%)} = \frac{(\Delta H \text{ dos CLN} \times 100)}{(\Delta H \text{ dos lipídeos} \times \text{Concentração dos lipídeos[\%]})}$$

Onde IR é o índice de recristalização,  $\Delta H$  dos CLN é a entalpia de fusão dos CLN,  $\Delta H$  dos lipídios é a entalpia de fusão da mistura de lipídeos, ambos expressos em (J/g) (Teeranachaideekul e col., 2008).

### 3.5. Estabilidade Física

A estabilidade física dos CLN foi avaliada por medidas do diâmetro médio, potencial Zeta, pH, índice de recristalização e eficiência de encapsulamento das dispersões armazenadas sob refrigeração (4°C) e armazenadas em temperatura ambiente, sendo que às últimas foi acrescentado metilparabeno (0,15%) e propilparabeno (0,05%) para evitar contaminação por micro-organismos.

### 3.6. Avaliação da toxicidade *in vitro* dos CLN e do 17-alfa-estradiol

Esta parte do projeto foi desenvolvida com a colaboração do Dr. Marcelo Bispo de Jesus do Instituto de Biologia da Unicamp.

Para avaliação da citotoxicidade *in vitro*, utilizou-se o teste de MTT, 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-brometo de difeniltetrazólio, cujo princípio consiste na captação desta substância e sua redução à um composto púrpura, o formazan, pelas desidrogenases mitocondriais, resultando em acúmulo desse composto em células viáveis (Figura 8) (Mosmann, 1983).

As células HaCat foram tratadas com: soluções do ativo e com dispersões de CLN (com e sem ativo) ambos em meio DEMEM sem soro. O meio de cultura com ativo ou com partículas foi removido e trocado por outro sem soro contendo MTT (1 mg/mL), e as células foram incubadas durante 4h, tempo necessário para a redução acontecer. O meio foi retirado

cuidadosamente e adicionado 100  $\mu$ L de DMSO para solubilização do formazan. As placas foram agitadas por 5 min em um agitador de placas e a absorbância das soluções foram lidas a 570 nm em um Espectrofotômetro de Microplacas Epoch (Biotek, EUA). Os valores foram expressos em porcentagem do controle (células não tratadas).

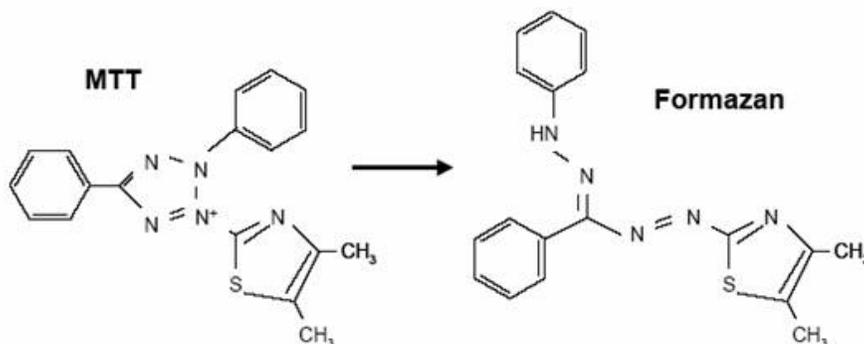


Figura 8: Redução do MTT a formazan.

### 3.7. Estudo de internalização dos CLN em queratinócitos humanos (HaCaT)

Esta parte do projeto foi desenvolvida com a colaboração do Dr. Marcelo Bispo de Jesus do Instituto de Biologia da Unicamp.

A internalização em queratinócitos humanos (HaCaT) foi verificada através da técnica de microscopia confocal. Após o tratamento por 3 h, as células foram fixadas a temperatura ambiente com uma solução de formaldeído (4% em PBS) por 20 min. Em seguida, os lisossomos foram marcados por imunofluorescência com marcação para a proteína associada à membrana lisossomal 1 (Lamp1), e o núcleo com marcador TO-PRO<sup>®</sup>-3 (Invitrogen). As amostras foram analisadas utilizando o microscópio confocal Leica TCS SP5 (Leica Microsystems, Wetzlar, Alemanha) com programa de captura e processamento de imagem Las AF 2.6.0 7266 Leica Microsystems CMS GmbH.

### 3.8. Avaliação da permeação cutânea

Esta parte do projeto foi desenvolvida com a colaboração do Dr. Marcelo Bispo de Jesus, Prof. Dr. Wagner José Favaro, Dr. Patrick Vianna Garcia e Ma. Letícia Montanholi Apolinário, do Instituto de Biologia da Unicamp.

Para este estudo as dispersões de CLN foram misturadas em gel de Carbopol (0,1%). Para a obtenção do gel, 0,1 g de carbopol foi dissolvido em 9,9 mL de água destilada, após homogeneização o pH foi ajustado para 7.0 com trietanolamina. Após a formação do gel, foi adicionado 0,5 % (m/m) de propilenoglicol como agente umectante.

Para a avaliação da permeação *in vitro*, células de difusão de Franz foram preparadas com pele humana, retiradas do abdômen de mulheres com idade entre 29 e 40 anos, doadas após cirurgias plásticas. A célula receptora foi preenchida com tampão fosfato (0,05 mol/L pH 7,4) com 5% de Tween 80. A pele foi cortada, colada sobre a cela receptora e fechada com a cela doadora. Sobre a pele foi aplicada uma formulação do gel de carbopol com os CLN marcados com rodamina-PE, sendo também realizado teste com gel com rodamina-PE, e gel puro. As células de Franz foram colocadas em uma cuba com água a 32 °C sob agitação. Após 1 h, as células de Franz foram retiradas, e foi realizado o emblocamento do tecido em *tissue-tek e tragacanth*, estes blocos foram congelados e posteriormente cortados em criostato (Leica CM1860), os cortes foram de 8 µm. Estes cortes foram recolhidos em lâmina e fixados com metanol e acetona.

Após a fixação, os cortes foram lavados por 3 vezes com tampão PBS. Em seguida, os cortes foram permeabilizados com Triton X-100 (0.2% em PBS) por 5 min. Actina foi marcada com faloidina ligada ao fluoróforo Alexa Fluor 488 e o núcleo com o corante TOPRO3, ambos incubados a temperatura ambiente por 20 minutos. O excesso de corante foi removido após 3 lavagens com PBS. As amostras foram analisadas utilizando o microscópio confocal Leica TCS SP5 (Leica Microsystems, Wetzlar, Alemanha) com programa de captura e processamento de imagem Las AF 2.6.0 7266Leica Microsystems CMS GmbH.

### **3.9. Análise Estatística**

Os resultados apresentados foram analisados pelo software Graphpad InStat (GraphPad Softwares, EUA) com significância de 95% de confiança ( $p < 0,05$ )

Os testes de Diâmetro, PI e Potencial Zeta das partículas foram reportados com média de 6 experimentos independentes (n=6), com respectivos desvio-padrões e comparadas através da análise de variância (ANOVA) com os dados de CLN sem ativo.

Para avaliação de estabilidade das nanopartículas foram analisados os parâmetros: pH, índice de recristalização, eficiência de encapsulamento, Diâmetro, índice de polidispersidade e Potencial Zeta das partículas, os dados são reportados com média de 3 experimentos (n=3), com respectivos desvio-padrões e comparadas com os respectivos dados iniciais (1º dia), através da análise de variância (ANOVA) com pós análise através do Teste de Dunnett.

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÕES

### 4.1. Teste solubilidade do 17-alfa-estradiol em diferentes sistemas:

Segundo Jain e Banga (2013) a cristalização de moléculas ativas usadas em tratamento tópico é um grande problema da indústria farmacêutica atualmente. Pensando nisto e na eficiência de encapsulamento do fármaco, grande esforço foi realizado a fim de encontrar um lipídeo que solubilizasse o 17-alfa-estradiol. De acordo com a tabela 1 foi escolhido o lipídeo com maior afinidade pelo ativo, miristato de miristila, que já foi utilizado com êxito na preparação de nanopartículas para uso tópico (Ridolfi e col., 2012).

A partir do estudo de solubilidade definiu-se que o uso de miristato de miristila a 2% e tween 80 a 1% é viável para carregar 0,025% de 17-alfa-estradiol, então para estabilizar a emulsão formada com esta porcentagem de lipídeo foi necessário uma concentração de pluronic de 1,5%.

Tabela 1: Avaliação da solubilidade do 17-alfaestradiol em diferentes sistemas

<b>Cupuaçu (mg)</b>	<b>Lanolina (mg)</b>	<b>Ceramidas (mg)</b>	<b>Outros Componentes</b>	<b>MM (mg)</b>	<b>17-alfa- estradiol (mg)</b>	<b>Solubilidade do 17-alfa- estradiol</b>
100,6	39,9	59,6			2,43	Insolúvel
203,1	81,9	120,1			2,43	Insolúvel
203,1	81,9	120,1	390 mg de etanol		2,43	Insolúvel
47,6	15,8	15,4	240 mg de etanol		1,02	Insolúvel
85,2	32,8	44,3	21,79 mg de Tween 80		1,05	Insolúvel
32,3					1,11	Insolúvel
34	27,7				0,90	Insolúvel
			22,93 mg de Tween 80		0,94	Insolúvel
			22,93 mg de Tween 80 e 4303 mg de Glicerina		0,94	Insolúvel
			30,98 mg e Ácido oleico		0,98	Insolúvel
			42,41 mg de Silicone		0,54	Insolúvel
			171,3 mg de Cetil Palmitato		0,6	Insolúvel
				38,5	1,04	Insolúvel
			22 mg de Tween 80	213	1,04	Solúvel
			267,5 mg de Tween 80	400	4,75	Solúvel

## 4.2. Diâmetro médio, Potencial Zeta e EE

Como discutido no item 2.1, uma das mais importantes características da formulação desenvolvida nesse trabalho é o tamanho das partículas, sendo assim valores de diâmetro médio foram obtidos após a preparação dos CLN e estão apresentados na Tabela 2 juntamente com os valores de índice de polidispersidade (PI), potencial Zeta e eficiência de encapsulamento (EE). Os CLN apresentaram diâmetro ao redor de 100 nm com uma distribuição estreita de tamanhos (baixo PI, aproximadamente 0,3), potencial Zeta negativo (-17 mV) e EE alta (99%).

Tabela 2: Diâmetro médio, PI, potencial Zeta e EE das dispersões de CLN. A diferença estatística entre CLN com e sem ativo foi de ( $p > 0,05$ ) para diâmetro, PI e Potencial Zeta. Resultados apresentados em forma de média e desvio padrão de 6 experimentos independentes ( $n=6$ ).

CLN	Diâmetro médio (nm)	PI	Potencial Zeta (mV)	EE (%)
Com Ativo*	96 ± 15	0,31 ± 0,05	-17 ± 6	99,6 ± 0,3
Sem ativo	104 ± 14	0,31 ± 0,05	-16 ± 2	-

\*A concentração de ativo é de 0,025%

Os valores de diâmetro dos CLN obtidos aqui estão de acordo com o desejado, visto que CLN de diâmetro em torno de 200 nm podem atingir o folículo piloso a partir de aplicação tópica, como relatado por Lin e col. (2013). Segundo Schwarz e col. (2013) CLN com 80 nm possuem melhor penetração dérmica se comparado à CLN de 230 nm.

O PI se refere à distribuição de tamanho dos CLN, o baixo valor de PI encontrado indica que o método produz partículas de tamanho pouco polidisperso, o que significa que o tempo de sonicação utilizado foi adequado para obter partículas com diâmetro nanométrico (100 nm) e homogêneas. Esta homogeneidade em termos de distribuição de tamanho pode contribuir para estabilidade das dispersões, pois evita o envelhecimento de Ostwald.

O potencial Zeta reflete a carga de superfície das partículas, sendo que este parâmetro pode ser influenciado pela composição da partícula, meio dispersante, pH e força

iônica presentes na solução (Melo e col., 2011). Neste caso a carga superficial das partículas pode ser explicada pela densidade de cargas negativas do lipídeo Miristato de miristila (Figura 2), valores de potencial Zeta similares já foram descritos para partículas produzidas com este componente (Barbosa e col., 2013; Ridolfi e col. 2012). A carga negativa pode ser útil no aumento da penetração cutânea, pois de acordo com o trabalho de Redziniak (2003) vesículas lipossômicas carregadas negativamente apresentam maior penetração do que as carregadas positivamente. (KOHLI e ALPAR, 2004) sugerem que esta permeabilidade de partículas negativas é devida à força repulsiva entre os lipídios aniônicos na pele e as partículas com carga negativa. Tais forças podem resultar na formação de canais temporários na pele permitindo a permeação das nanopartículas.

A alta EE está relacionada à hidrofobicidade do 17-alfa-estradiol que apresenta alta afinidade pelos lipídeos utilizados, além disso, a incorporação de óleo na matriz lipídica sólida aumenta o espaço situado entre as cadeias dos lipídeos, diminuindo assim a expulsão do fármaco durante o processo de recristalização (Freitas e Müller, 1999).

### **4.3. Calorimetria Diferencial de Varredura (DSC)**

Para garantir a integridade das partículas durante a aplicação tópica da formulação é preciso que o ponto de fusão destas esteja acima da temperatura da pele (32°C), então foram realizadas análises de calorimetria diferencial de varredura, pelas quais foi possível observar (Figura 9) que tanto a mistura de lipídeos utilizada nos CLN como os CLN satisfazem esta condição, sendo que para ambos a faixa de temperatura de fusão é de 32 a 49 °C.

Na Figura 9 observa-se um pico em aproximadamente 220 °C referente à fusão do estradiol, o que não ocorre nos termogramas dos CLN com e sem ativo, isso poderia constatar uma distribuição homogênea do fármaco na matriz lipídica, no entanto, os cristais de 17-alfa-estradiol estão abaixo do limite de detecção do equipamento de análise térmica, o que pode ser observado pelo fato do pico de estradiol não aparecer também no termograma da mistura física dos componentes dos CLN. Portanto esta análise isolada não fornece informação precisa sobre a distribuição do 17-alfaestradiol nos CLN. Entretanto, nos confirma que a formulação desenvolvida apresenta ponto de fusão acima da temperatura da pele sendo indicado para a aplicação proposta neste trabalho.

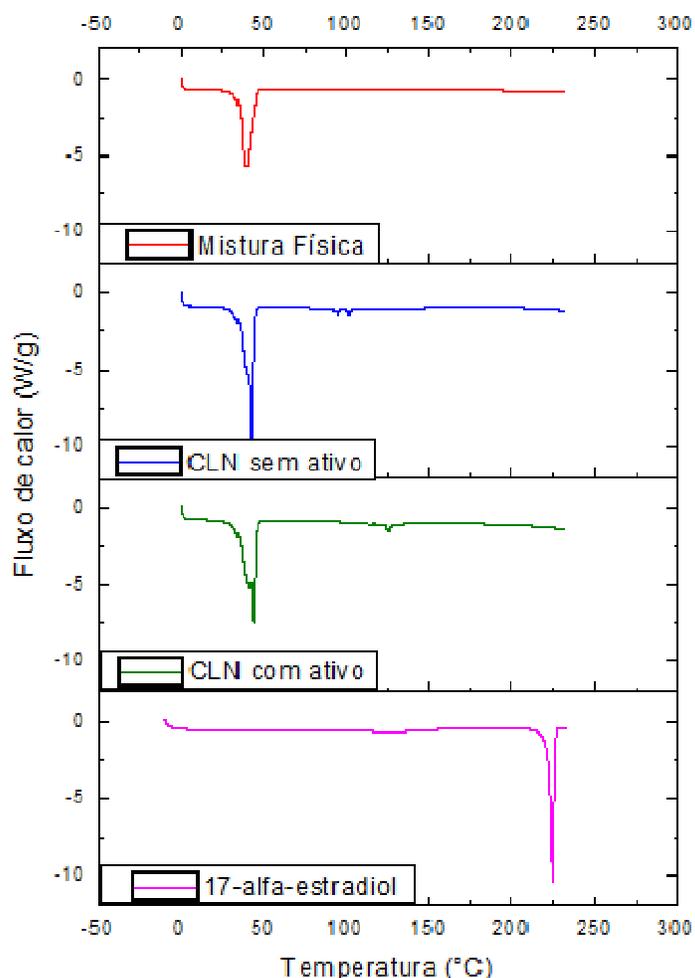


Figura 9: Termograma do 17-alfa-estradiol puro, dos CLN com e sem ativo, e da mistura física de seus componentes (miristato de miristila, ceramidas, Tween 80, óleo de buriti, 17-alfa-estradiol e pluronic F68).

#### 4.4. Estabilidade física dos CLN

É de grande importância o estudo da estabilidade físico-química de nanopartículas dispersas em meio aquoso, pois durante o período de armazenamento ela pode ser limitada, o que pode inviabilizar sua comercialização. As principais limitações são a agregação das partículas, a estabilidade química do fármaco ou de outras matérias-primas e, ainda, a liberação prematura da substância ativa (Schaffazick e col., 2003).

##### 4.4.1. Estabilidade dos CLN com respeito ao pH

Na Figura 10 nota-se que tanto as amostras armazenadas em temperatura ambiente quanto as mantidas em geladeira (de 2 a 8 °C) não mostraram alteração significativa de pH, sendo que por 42 dias o pH se manteve em torno de 6 para formulações com e sem ativo, mostrando que a presença do ativo não alterou o pH das dispersões. Este valor de pH é desejável visto que o pH da pele é levemente ácido (4,2-5,6) (Prow e col., 2011).

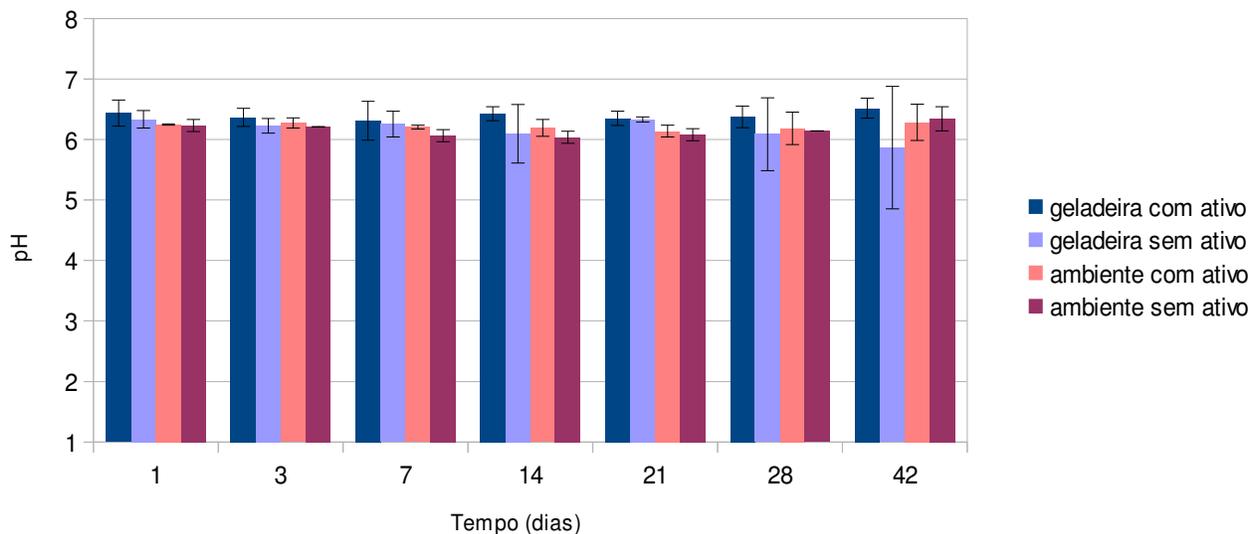


Figura 10: Gráfico da variação do pH dos CLN armazenados em geladeira (de 2 a 8 °C) e à temperatura ambiente em função do tempo. A diferença estatística foi de ( $p > 0,05$ ) dada em relação ao ponto inicial (1º dia) para CLN armazenados a temperatura ambiente e em geladeira (de 2 a 8 °C), com e sem ativo. Resultados apresentados em forma de média e desvio padrão de 3 experimentos independentes ( $n=3$ ).

#### 4.4.2. Estabilidade física com respeito à eficiência de encapsulamento (EE)

À partir da Tabela 3 nota-se que ao longo de 30 dias os CLN permanecem sem alterações significativas em sua EE, ainda que armazenados à temperatura ambiente. Isso pode ser uma evidência de que não ocorre liberação do fármaco na dispersão ao longo do tempo, sendo assim, este sistema se mostrou estável no período avaliado, o que torna passível a sua comercialização futuramente. Esse resultado reforça a ideia de que a inserção de lipídeos líquidos pode ajudar a manter o fármaco na partícula, assim como o trabalho de Elnaggar e col. (2011) que revela que o CLN promove maior EE do que NLS.

Tabela 3: Variação da EE em função do tempo para CLN armazenados em geladeira (de 2 a 8 °C) e à temperatura ambiente. A diferença estatística foi de ( $p>0,05$ ) dada em relação ao ponto inicial (1º dia) para CLN armazenados a temperatura ambiente e em geladeira (de 2 a 8 °C). Resultados apresentados em forma de média e desvio padrão de 3 experimentos independentes ( $n=3$ ).

Dias	EE Geladeira	EE Ambiente
1	99,6±0,2	99,6±0,4
30	99,6±0,5	99,5±0,1

#### 4.4.3. Estabilidade física com respeito ao diâmetro e distribuição de tamanho

Os CLN armazenados em geladeira (de 2 a 8°C) não tiveram a adição de parabenos, por isso após 42 dias não foi possível realizar medidas de diâmetro e potencial Zeta devido à presença de micro-organismos. Estes resultados sugerem que o aumento da estabilidade biológica pode ser obtido pela adição de parabenos e não pela temperatura de armazenamento.

Observa-se na Figura 11 que, apesar do sutil aumento de diâmetro (de 107 para 123 nm, e de 99 para 116 nm para partículas com e sem ativo respectivamente), até o 42º dia não há variações de diâmetro que justifiquem possíveis agregações de partículas, tanto para partículas com ativo quanto para partículas sem ativo, este sutil aumento pode ainda ser justificado pela presença dos microorganismos, estes podem ter sido detectados tardiamente visto que foram detectados apenas visualmente. Ainda no gráfico da Figura 11 é possível notar que o PI dos CLN também não sofre variação significativa, permanecendo muito próximo à faixa que define um sistema pouco polidisperso (0-0,2) (Melo e col., 2011).

Os CLN armazenados à temperatura ambiente foram estáveis até o 56º dia, entre este dia e o 85º ocorreu agregação das partículas, como demonstrado no gráfico da Figura 12 pelo aumento do diâmetro tanto das partículas com ativo quanto sem ativo. O diâmetro das partículas passou de aproximadamente 100 nm para 180 e 250 nm respectivamente para os CLN sem e com ativo. Além disso, observa-se um aumento do PI, que durante o período de estabilidade também se manteve próximo à faixa que define um sistema pouco polidisperso,

mas aumentou após 56 dias de armazenamento, este aumento é justificado pela aglomeração de partículas que gera uma maior distribuição de diâmetro.

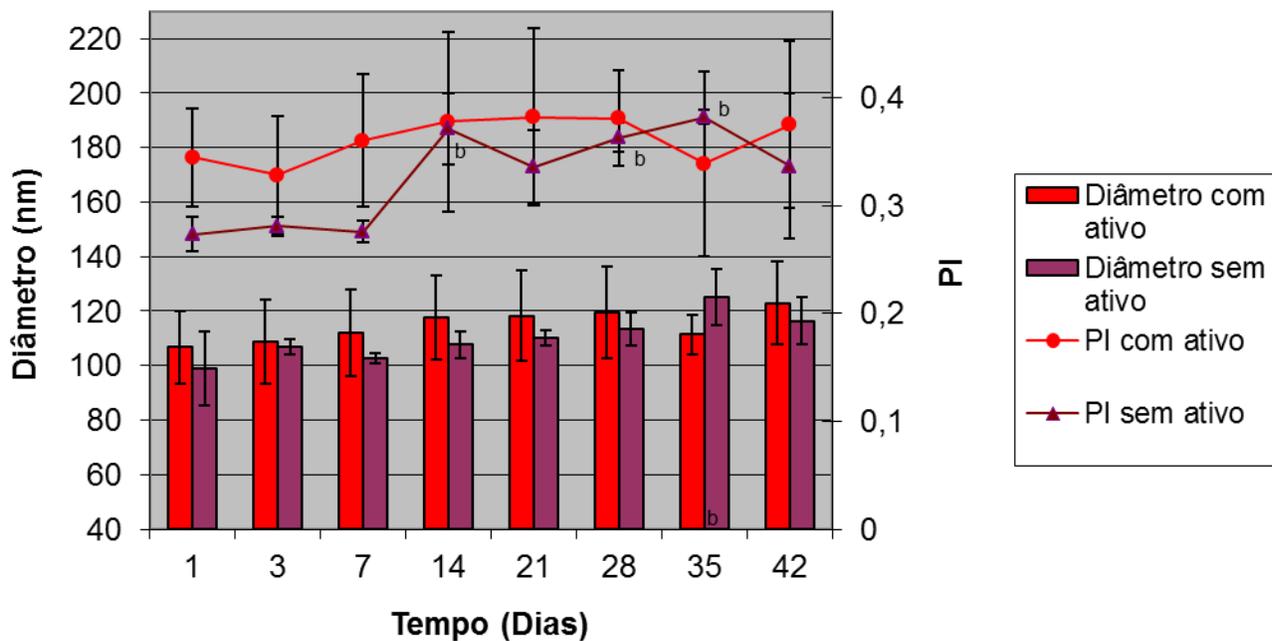


Figura 11: Gráfico do diâmetro e distribuição de tamanho (PI) dos CLN com e sem ativo (armazenados em geladeira) em função do tempo. (b) corresponde à diferença estatística ( $p < 0.01$ ) dada em relação ao ponto inicial (1º dia). Resultados apresentados em forma de média e desvio padrão de 3 experimentos independentes ( $n=3$ ).

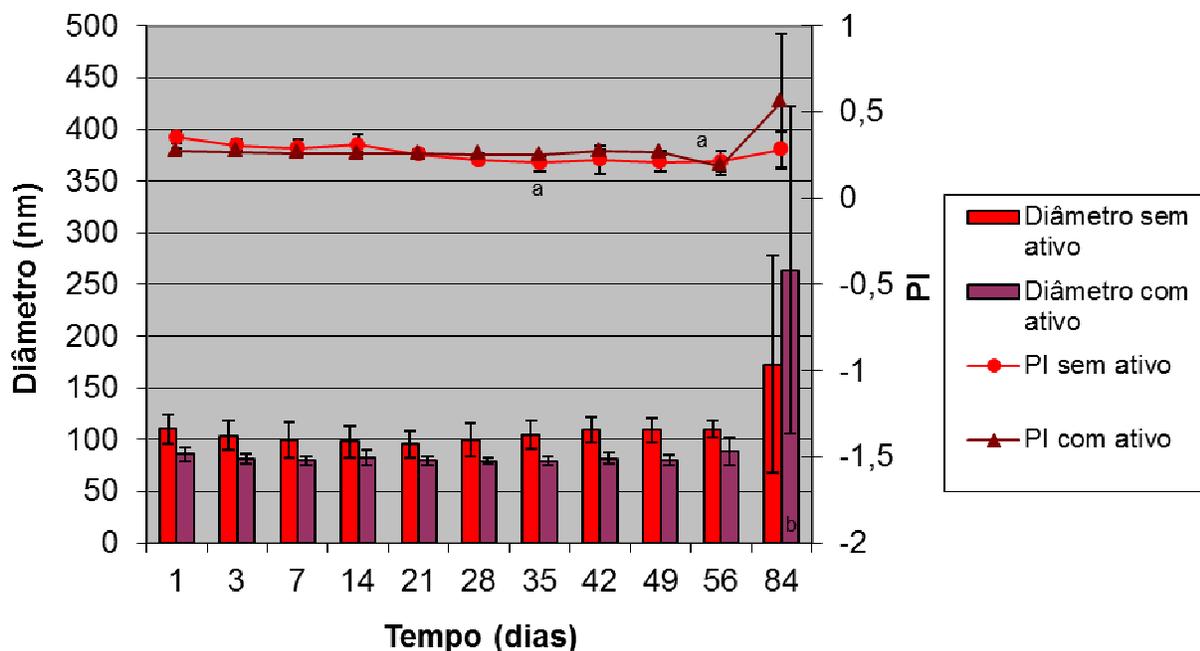


Figura 12: Gráfico do diâmetro e distribuição de tamanho (PI) dos CLN (armazenados à temperatura ambiente) em função do tempo. (a) corresponde a diferença estatística ( $p < 0,05$ ) e (b) corresponde à diferença estatística ( $p < 0,01$ ) dadas em relação ao ponto inicial (1º dia). Resultados apresentados em forma de média e desvio padrão de 3 experimentos independentes ( $n=3$ ).

#### 4.4.4. Estabilidade física com respeito ao potencial Zeta

Como mostrado na Figura 13 o potencial Zeta dos CLN armazenados em geladeira (de 2 a 8 °C) e, a temperatura ambiente, sofreu um aumento de valor em módulo (tornando os CLN mais negativamente carregados) ao longo do tempo, esta variação pode ser avaliada de maneira positiva, visto que quanto maior o módulo da carga, maior é a repulsão entre partículas e menor a agregação destas (Camargo 2009). Estes resultados corroboram com os obtidos nas medidas do diâmetro das partículas, já que o diâmetro não se alterou significativamente por até 56 dias de armazenamento.

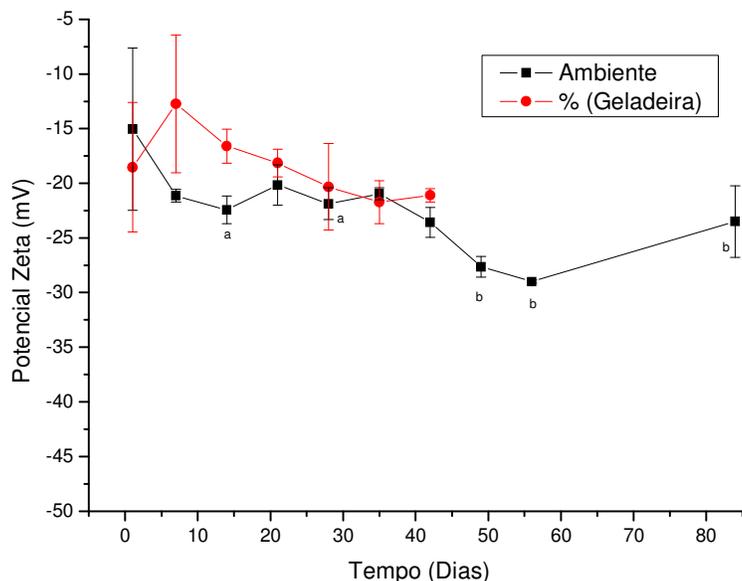


Figura 13: Gráfico da variação do potencial Zeta em função do tempo para CLN armazenados em geladeira (de 2 a 8 °C) e armazenados à temperatura ambiente. (a) corresponde a diferença estatística ( $p < 0.05$ ) e (b) corresponde à diferença estatística ( $p < 0.01$ ) dadas em relação ao ponto inicial (1º dia). Resultados apresentados em forma de média e desvio padrão de 3 experimentos independentes ( $n=3$ ).

#### 4.4.5. Estabilidade física com respeito ao índice de recristalização IR:

O IR é um indicador de estabilidade, quanto menor o IR maior será a estabilidade das partículas (Freitas e Müller, 1999). Os resultados mostram que o IR dos CLN é inferior a 100%, indicando que uma fração do lipídio não está completamente cristalizada o que pode evitar o crescimento do diâmetro das partículas com o tempo.

Observando a Figura 14 nota-se que ao longo de 30 dias não houve variação significativa no IR, independentemente do tipo de armazenamento ou da presença de ativo. Este resultado corrobora com os obtidos na eficiência de encapsulamento (EE), pois um aumento do índice de recristalização expulsaria o fármaco das partículas diminuindo a EE (Selvamuthukumar e Velmurugan, 2012). Entretanto, como não houve um aumento da cristalinidade das partículas e a EE se manteve constante no período avaliado, este resultado indica que os CLN desenvolvidos neste projeto são interessantes sistemas carreadores de moléculas.

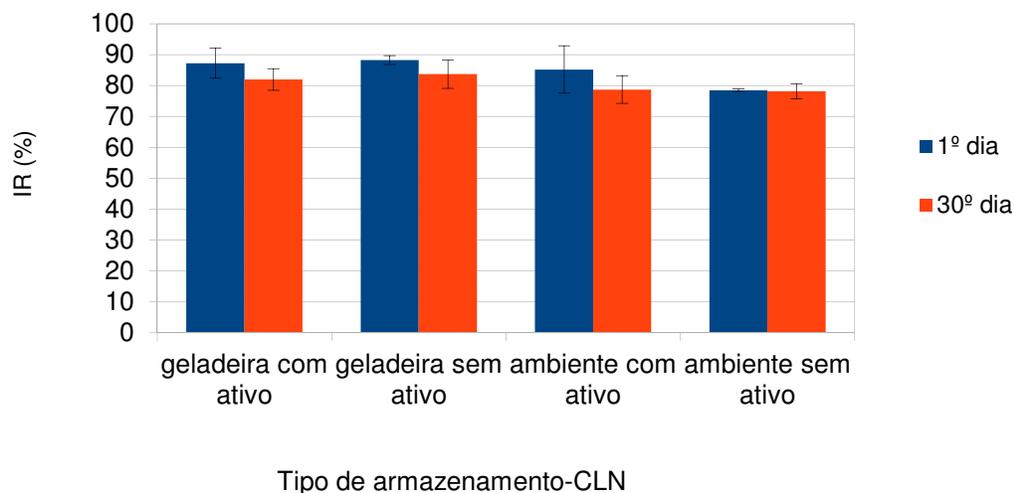


Figura 14: Gráfico do índice de recristalização (IR) em função do tempo. A diferença estatística foi de ( $p > 0,05$ ) dada em relação ao ponto inicial (1º dia) para CLN armazenados a temperatura ambiente e em geladeira (de 2 a 8 °C), com e sem ativo. Resultados apresentados em forma de média e desvio padrão de 3 experimentos independentes ( $n=3$ ).

#### 4.5. Citotoxicidade

Um importante parâmetro a ser analisado para novas formulações nanométricas é a sua toxicidade frente a células eucarióticas. Para a determinação da citotoxicidade dos NCL desenvolvidos aqui utilizamos queratinócitos humanos (Hacat), pensando em uma possível aplicação tópica da formulação. A Figura 15 mostra que 17-alfa-estradiol livre não apresenta citotoxicidade nas concentrações testadas, observamos que na máxima concentração testada, que é usada comercialmente, obtivemos uma redução da viabilidade em apenas 20%. As formulações de CLN apresentam aparente citotoxicidade em concentrações de 17-alfa-estradiol superiores à 250 uM. Essa redução da viabilidade pode estar associada à privação de nutrientes, visto que para atingir concentrações mais elevadas do ativo, há substituição de grande parte ou total do meio de cultura que garante a condição da sobrevivência das células pelas formulações onde as nanopartículas estão dispersas em água. Para testar essa hipótese, substituímos o meio proporcionalmente às substituições dos tratamentos por PBS, como mostrado no gráfico da Figura 16. Uma alternativa seria determinar o  $IC_{50}$  dos CLN se estes fossem liofilizados, entretanto isso deveria acontecer sem que suas características físico-químicas fossem alteradas. Infelizmente, durante o

processo de liofilização houve a aglomeração de partículas, alterando assim uma das mais importantes características desta formulação que é o tamanho de partícula.

Uma vez que não foi possível determinar a citotoxicidade do CLN através do método convencional, ensaio de viabilidade, optou-se por avaliar a interação das nanopartículas com as células Hacat através da microscopia confocal.

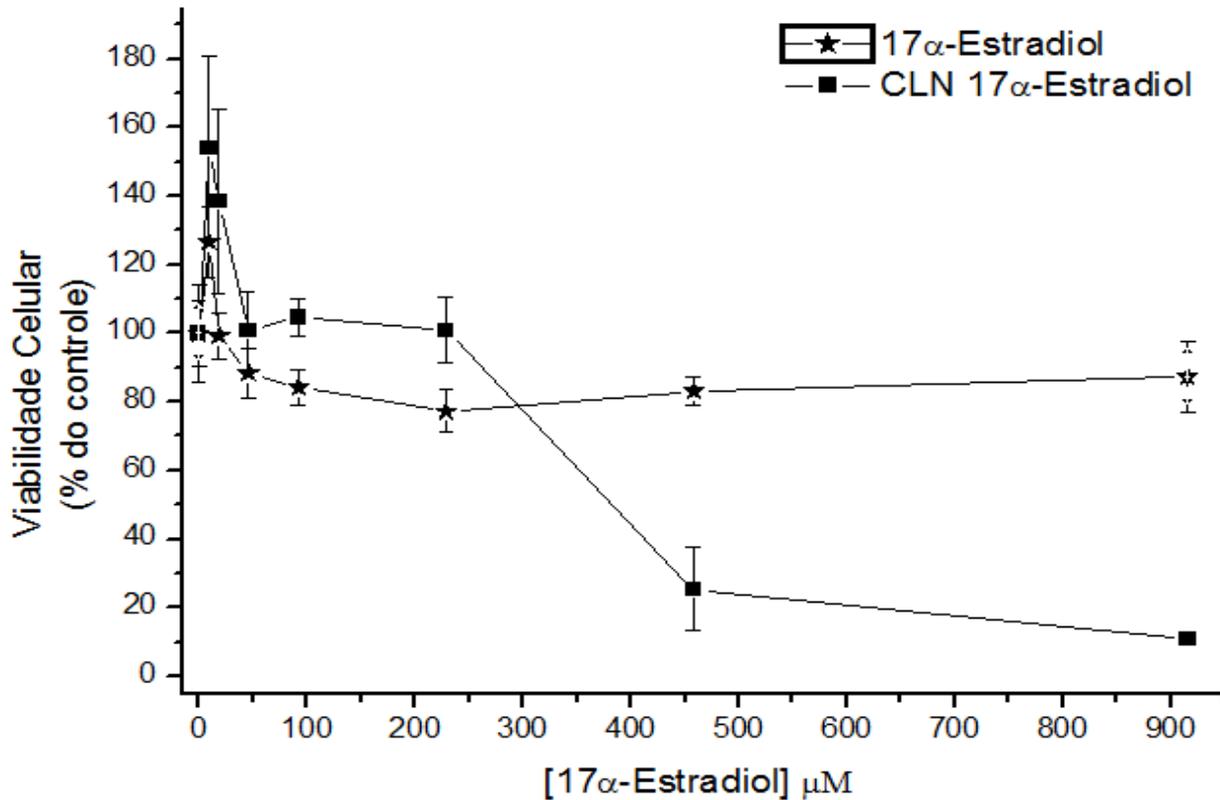


Figura 15: Viabilidade celular em função da concentração de 17-alfa-estradiol

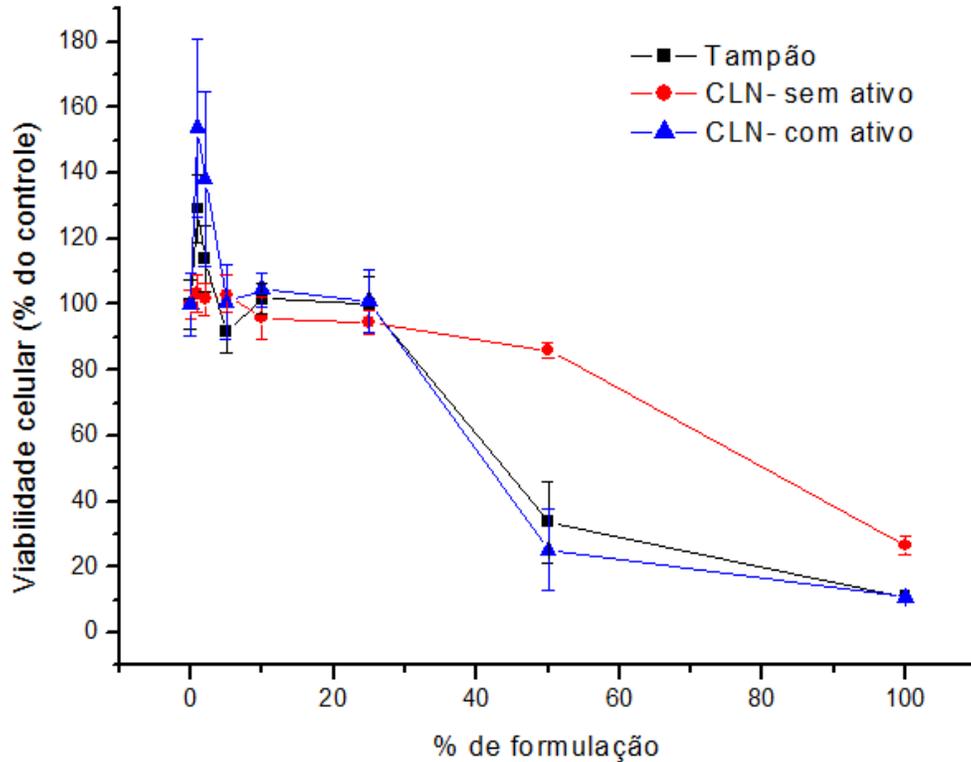


Figura 16: Viabilidade celular em função da porcentagem de formulação.

#### 4.6. Estudos de interação das nanopartículas e queratinócitos humanos (HaCaT)

O estudo da interação de nanopartículas com células eucarióticas é de vital importância tanto para entender como as partículas desempenham seu papel biológico, como para antecipação de possíveis efeitos citotóxicos (Sahay e col., 2010). Com isso em mente, decidimos investigar a interação dos CLN e células de queratinócitos humanos HaCaT através da microscopia confocal.

Para o uso dessa técnica os CLN foram marcados com fluoróforo, como descrito anteriormente, sendo que o diâmetro médio deles foi de 91,92 nm, que é um valor similar ao dos CLN não marcados, isso significa que a marcação dos CLN foi bem sucedida podendo ser usada no estudo de interação com queratinócitos e permeação in vitro; a eficiência da marcação também pode ser constatada pela imagem dos CLN adquirida por microscopia

confocal, que esta apresentada na Figura 17, a imagem é pontual, e há a formação pequenos agregados de partículas.

Vemos na Figura 18 que os CLN marcados com o fluoróforo rodamina-PE (vermelho) se encontram no citoplasma da células. Além disso, é possível observar que mesmo após 3 h de interação os CLNs não se encontram nos lisossomos, como sugere a baixa frequência de sobreposição do sinal (amarelo) para a proteína Lamp1 (em verde) e dos CLN (vermelhos).

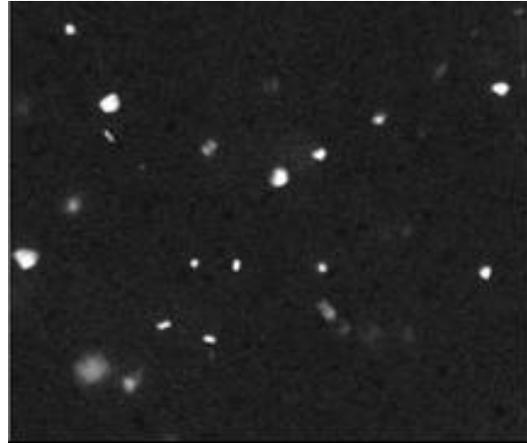


Figura 17: Imagens de microscopia confocal dos CLN

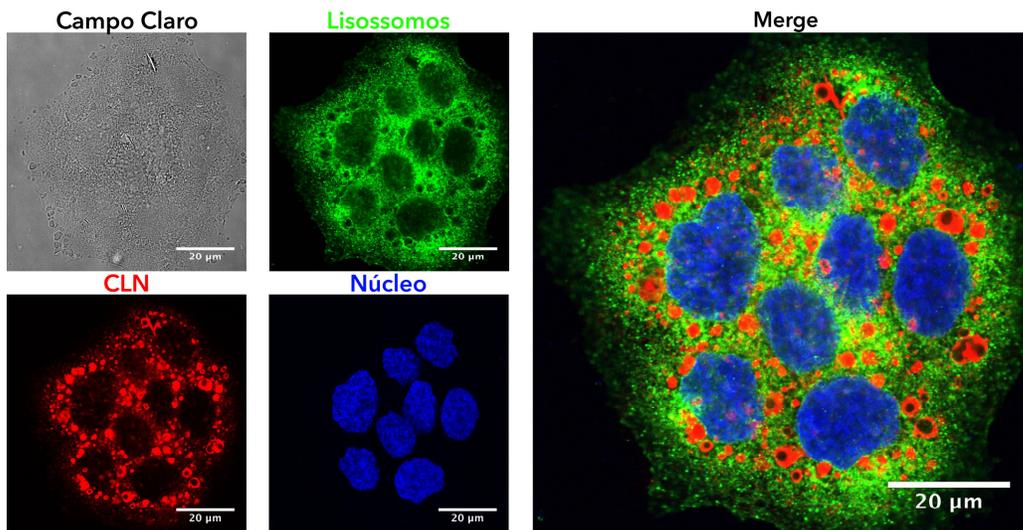


Figura 18: Imagens de microscopia confocal das células tratadas com CLN por 3h, sendo o sinal verde é proveniente dos lisossomos, azul do núcleo das células, e vermelho da rodamina-PE incorporada nos CLN.

#### 4.7. Estudos de interação das nanopartículas e pele humana

Por fim, avaliamos a interação dos CLN com pele humana. Para que o 17-alfaestradiol exerça seu efeito biológico este deve interagir com o folículo piloso (Inui e Itami, 2010). Observamos nas Figuras 21 e 22 que as seções transversais da pele demonstram a difusão passiva dos CLN marcados com rodamina-PE, após 1 h de estudo de permeação observa-se sinal de fluorescência da rodamina especialmente nos folículos pilosos (regiões circuladas em amarelo nas figuras), sendo muito reduzido seu acúmulo sobre a epiderme (região de aplicação), o contrário ocorre no grupo controle (Figuras 19 e 20), a qual corresponde ao corte de pele que foi tratada com rodamina-PE livre em gel, ou seja, não associado ao CLN, isso se deve ao tamanho e a composição destas estruturas carreadoras. Assim como relatado por Tomoda e col. (2012), observou-se que a principal rota de penetração cutânea das nanopartículas foi o folículo.

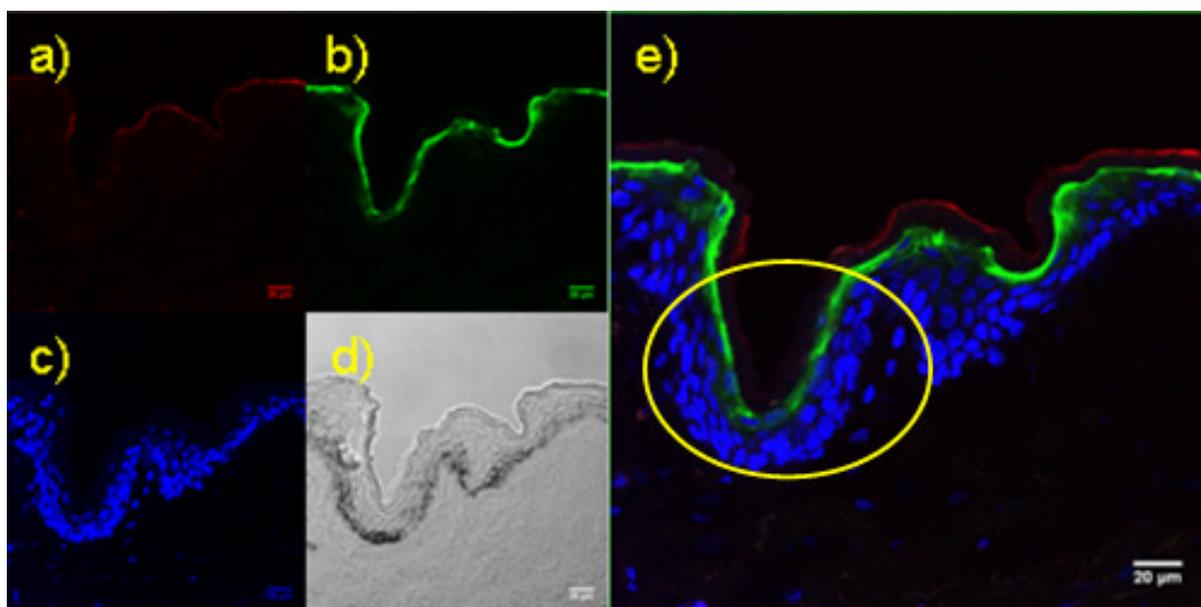


Figura 19: Imagem (microscopia confocal) dos cortes de pele tratados apenas com o fluoróforo. a) rodamina-PE (sinal vermelho); b) Actina marcada com faloidina ligada ao fluoróforo Alexa Fluor 488 (sinal verde); c) Núcleo marcado com TOPRO-3 (sinal azul); d) Campo claro; e) Sobreposição das imagens a, b e c.

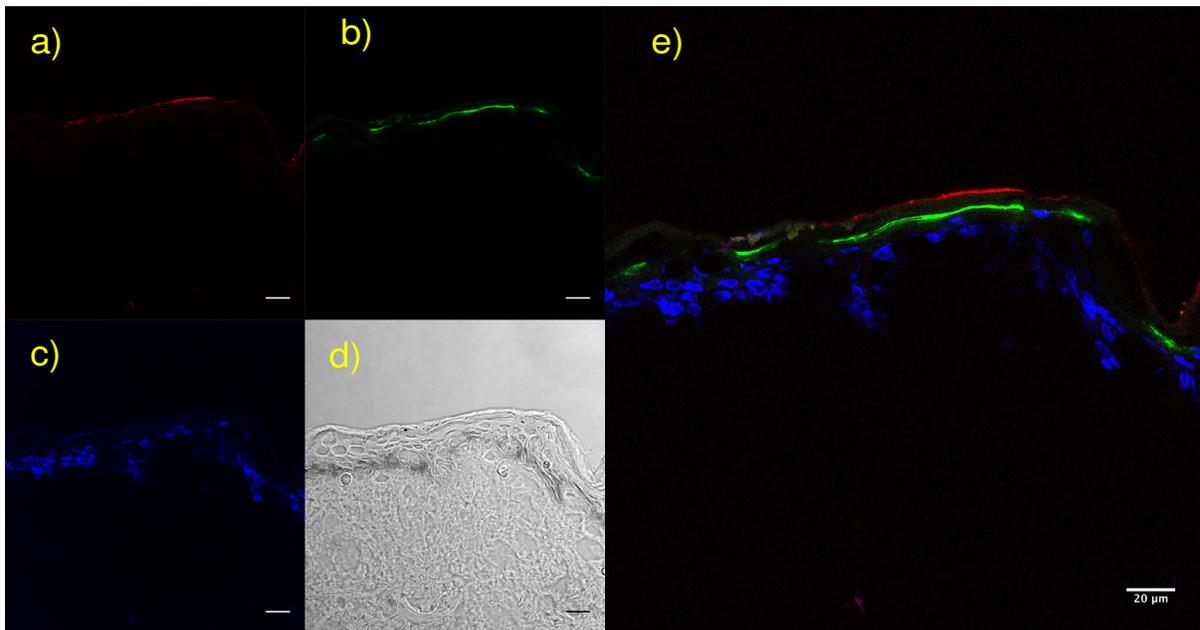


Figura 20: Imagem (microscopia confocal) dos cortes de pele tratados apenas com o fluoróforo. a) rodamina-PE (sinal vermelho); b) Actina marcada com faloidina ligada ao fluoróforo Alexa Fluor 488 (sinal verde); c) Núcleo marcado com TOPRO-3 (sinal azul); d) Campo claro; e) Sobreposição das imagens a, b e c

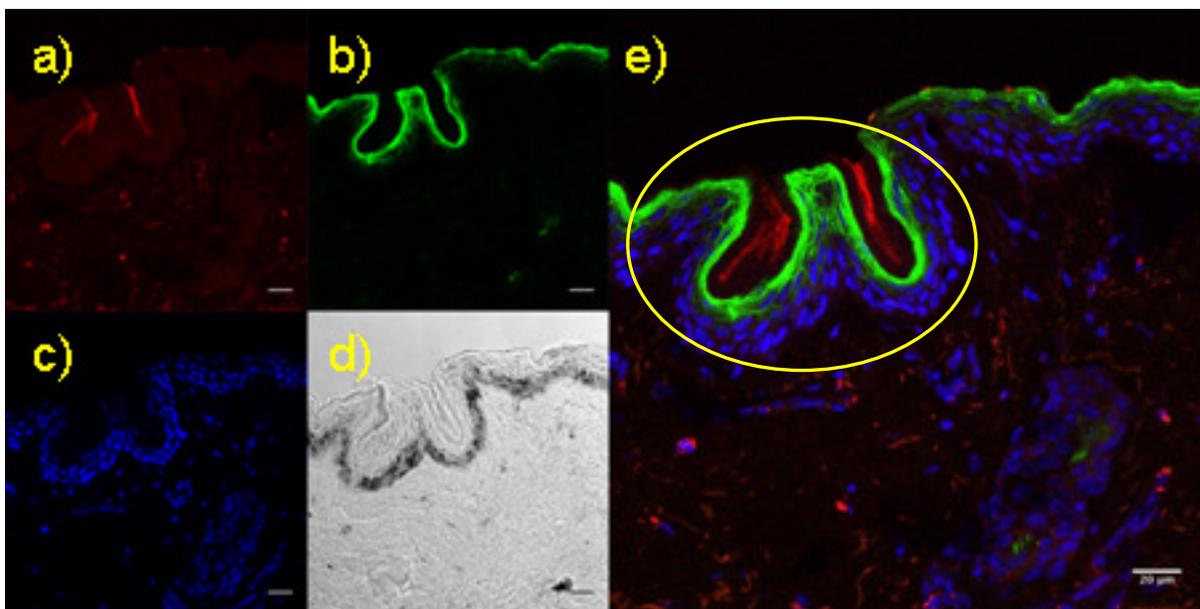


Figura 21: Imagem (microscopia confocal) dos cortes de pele tratados com CLN marcados: a) CLN marcado com rodamina-PE (sinal vermelho); b) Actina marcada com faloidina ligada ao fluoróforo Alexa Fluor 488 (sinal verde); c) Núcleo marcado com Tropo-3 (sinal azul); d) Campo claro; e) Sobreposição das imagens a, b e c.

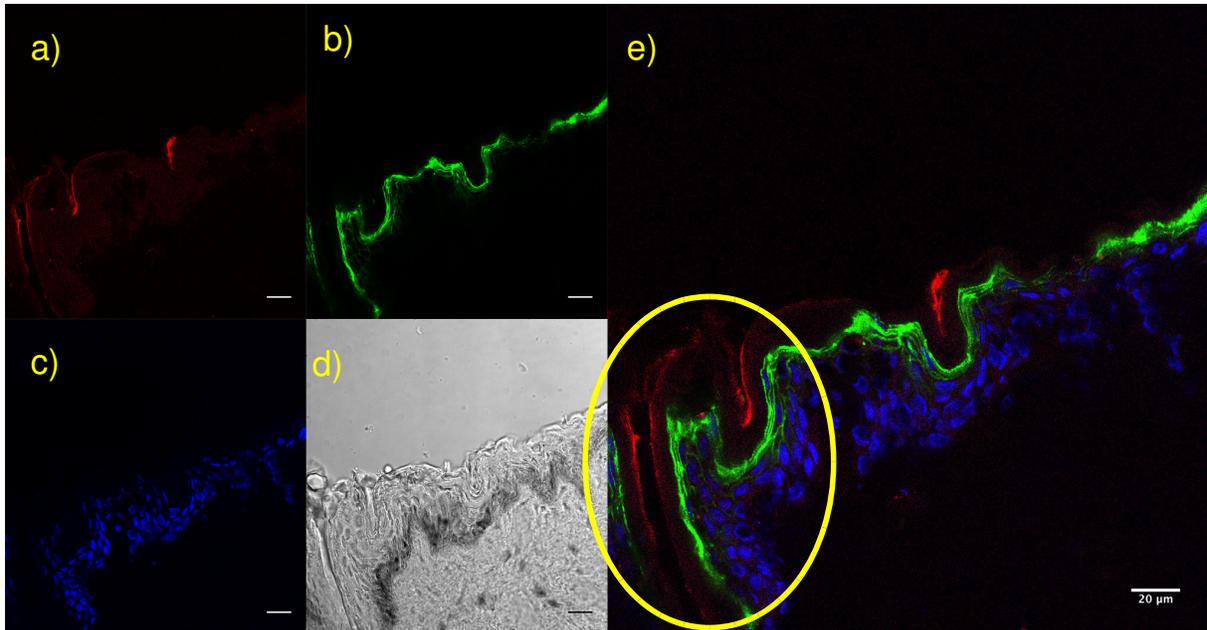


Figura 22: Imagem (microscopia confocal) dos cortes de pele tratados com CLN marcados: a) CLN marcado com rodamina-PE (sinal vermelho); b) Actina marcada com faloidina ligada ao fluoróforo Alexa Fluor 488 (sinal verde); c) Núcleo marcado com Tropo-3 (sinal azul); d) Campo claro; e) Sobreposição das imagens a, b e c.

## 5. CONCLUSÃO

Na primeira etapa do trabalho foram obtidos CLN com diâmetro médio de  $99,6 \pm 0,3$  nm, o que é um resultado apreciável, tendo em vista o objetivo do projeto em aumentar a penetração cutânea do 17-alfa-estradiol. O potencial Zeta dos CLN foi negativo ( $-16 \pm 6$  mV) e este valor negativo está associado ao tipo de estabilizante e lipídeo usados na preparação das partículas. O índice de polidispersidade obtido ( $0,31 \pm 0,05$ ) indica um sistema pouco polidisperso, isso pode ser visto de maneira positiva, pois evita o crescimento de partículas grandes à custa de partículas menores (envelhecimento de Ostwald). O valor da EE foi alto ( $99,6 \pm 0,3\%$ ) indicando que o método e o tipo de CLN desenvolvido neste projeto são adequados para o encapsulamento desta molécula.

O ponto de fusão dos CLN, demonstrado por DSC, foi de  $40,8^\circ\text{C}$ , isso indica que estes são apropriados para o uso tópico, sendo que permanecem sólidos na temperatura da pele ( $32^\circ\text{C}$ ). Em relação ao estudo de estabilidade física dos CLN foi realizado monitorando o diâmetro, potencial zeta, índice de recristalização (IR) e pH, a análise destes parâmetros

permite concluir que as dispersões de CLN permaneceram estáveis, por mais de 56 dias. Além disso, o estudo de estabilidade possibilitou observar que a formulação desenvolvida pode ser armazenada à temperatura ambiente, considerando a adição de parabenos.

Os resultados do ensaio de citotoxicidade revelam que a uma concentração de 250  $\mu\text{M}$  os CLN não são tóxicos para as células Hacat. Foi demonstrado ainda que os CLN têm a capacidade de se inserir nessa linhagem de células, sem no entanto penetrar no núcleo, atingindo o citoplasma onde deve ser digerido, liberando assim o 17-alfa-estradiol no meio onde ocorre sua atividade.

A marcação dos CLN com rodamina-PE se mostrou eficiente, o que possibilitou verificar que a principal via de penetração cutânea deles é o folículo piloso, o que sugere que eles atingirão o tecido alvo, podendo então aumentar a eficácia do tratamento.

## 6. REFERÊNCIAS:

- AGRAWAL, Y.; PETKAR, K.C.; SAWANT, K.K. 2010. Development, evaluation and clinical studies of Acitretin loaded nanostructured lipid carriers for topical treatment of psoriasis. *International Journal of Pharmaceutics*. 401, 93–102.
- AKHTAR, N.; REHMAN, M.U.; KHAN, H.M.S.; RASOOL, F.; SAEED, T.; MURTAZA, G. 2011. Penetration Enhancing Effect of Polysorbate 20 and 80 on the In Vitro Percutaneous Absorption of LAscorbic Acid. *Tropic Journal of Pharmacy Research*. 10, 281-281.
- ALJUFFALI, I.; SUNG, C.T.; SHEN, F.; HUANG, C.; FANG, J. 2014. Squarticles as a Lipid Nanocarrier for Delivering Diphencyprone and Minoxidil to Hair Follicles and Human Dermal Papilla Cells. *American Association of Pharmaceutical Scientists*. 16, 140-150.
- BARBOSA, R.M.; DA SILVA, C.M.G.; BELLA, T.S.; DE ARAÚJO, D.R.; MARCATO, P.D.; DURÁN, N.; DE PAULA, E. 2013. Cytotoxicity of solid lipid nanoparticles and nanostructured lipid carriers containing the local anesthetic dibucaine designed for topical application. *Journal of Physics: Conference Series*. 429, 1-8.
- BODÓ, E.; VAN BEEK, N.; NAUMANN, V.; OHNEMUS, U.; BRZOSKA, T.; ABELS, C.; PAUS, R. 2009. Modulation of Chemotherapy-Induced Human Hair Follicle Damage by 17- $\beta$  Estradiol and Prednisolone: Potential Stimulators of Normal Hair Regrowth by “Dystrophic Catagen” Promotion? *Journal of Investigative Dermatology*. 129, 506–509.
- BOSE, S.; MICHNIAK-KOHN, B. 2013. Preparation and characterization of lipid based nanosystems for topical delivery of quercetin. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*. 48, 442–452.
- BRINCAT, M.B. 2000. HORMONE REPLACEMENT THERAPY AND THE SKIN. *MATURITAS*. 35, 107–117

- CAMARGO, Z.T. 2009. Preparação e caracterização de nanocápsulas de poly(D,L-lactídeo) no encapsulamento de palmitato de retinila. Doutorado em Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas.
- CEVC, G.; VIERL, U. 2010. Nanotechnology and the transdermal route: A state of the art review and critical appraisal. *Journal of Controlled Release*. 141, 277–299.
- CHO, H.; YOON, H.Y.; KOO, H.; KO, S.; SHIM, J.; CHO, J.; PARK, J.H.; KIM, K.; KWON, I.C.; KIM, D. 2012. Hyaluronic acid-ceramide-based optical/MR dual imaging nanoprobe for cancer diagnosis. *Journal of Controlled Release*. 162, 111-118.
- ELNAGGAR, Y.S.R.; EL-MASSIK, M.A.; ABDALLAH, O.Y. 2011. Fabrication, appraisal, and transdermal permeation of sildenafil citrate-loaded nanostructured lipid carriers versus solid lipid nanoparticles. *International Journal of Nanomedicine*. 6, 3195-3205.
- FREITAS, C.; MÜLLER, R.H. 1999. Correlation between long-term stability of solid lipid nanoparticles (SLN(TM)) and crystallinity of the lipid phase. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. 47,125–32.
- FRONZA, T. 2006. Estudo exploratório de mecanismos de regulação sanitária de produtos cosméticos de base nanotecnológica no Brasil. Mestrado em ciências farmacêuticas, Universidade Federal do Rio Grand do Sul, Porto Alegre.
- GATTI, R.; GIOIA, M.G.; DI PIETRA, A.M.; CAVRINI, V. 1997. HPLC-fluorescence determination of unconjugated estrogens in pharmaceuticals. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 18, 187–192.
- HAN, F.; LI, S.; YIN, R.; SHI, X.; JIA, Q. 2008. Investigation of nanostructured lipid carriers for transdermal delivery of flurbiprofen. *Drug Development and Industrial Pharmacy*. 34, 453–458.
- HENDRADI, E. OBATA, Y.; ISOWA, K.; NAGAI, T.; TAKAYAMA, K. 2003. Effect of mixed micelle formulations including terpenes on the transdermal delivery of diclofenac. *Biological Pharmaceutical Bulletin* 26, 1739–1743.
- HOFFMANN, R.; NIIYAMA, S.; HUTH, A.; KISSLING, S.; HAPPLE, R. 2002.17 $\alpha$ -estradiol induces aromatase activity in intact human anagen hair follicles ex vivo. *Experimental Dermatology*. 11, 376–380.
- HYUN-JONG, C.; HONG, Y.Y.; HEEBEOM, K.; SEUNG-HAK, K.; JAE, S.; JU-HEE, L.; KWANGMEYUNG, K.; ICK, C. K.; DAE-DUK, K. 2011. Self-assembled nanoparticles based on hyaluronic acid-ceramide (HA-CE) and Pluronic® for tumor-targeted delivery of docetaxel. *Biomaterials*. 32, 7181–7190.
- INUI, S.; ITAMI, S. 2011. Molecular basis of androgenetic alopecia: From androgen to paracrine mediators through dermal papilla. *Journal of Dermatological Science*. 61, 1-6.
- JAIN, P.; BANGA, A.K. 2013. Induction and inhibition of crystallization in drug-in-adhesive-type transdermal patches. *Pharmaceutical Research*. 30, 562-571.
- JENNING, V.; MÄDER, K.; GOHLA, S.H. 2000. Solid lipid nanoparticles (SLN™) based on binary mixtures of liquid and solid lipids: a <sup>1</sup>H-NMR study. *International Journal of Pharmaceutics*. 205, 15–21.

- KANEBO LTD(KANE-C). 2000. Hair tonics for alopecia and dandruff prevention - contain one or more of estradiol, ethynyl estradiol, benzoic estradiol and estrone and extract of Fushi plant. Número da patente:JP3020727-B2. Requerida em: 02 Nov 1993
- KAUFMAN, K.D., 1996. Androgen metabolism as it affects hair growth in androgenetic alopecia. *Dermatologic Clinics*. 14, 697–711.
- KAUFMAN, K.D.; OLSEN, E.A.; WHITING, D.; SAVIN, R.; DEVILLEZ, R.; BERGFELD, W.; PRICE, V.H.; VAN NESTE, D.; ROBERTS, J.L.; HORDINSKY, M.; SHAPIRO, J.; BINKOWITZ, B.; GORMLEY, G.J. 1998. Finasteride in the treatment of men with androgenetic alopecia. Finasteride male pattern hair loss study group. *Journal of the American Academy of Dermatology*. 39, 578–589.
- KIM, J.H.; LEE, S.Y.; LEE, H.J.; YOON, N.Y.; LEE, W.S. 2012. The Efficacy and safety of 17 alpha-estradiol (EII-Cranell (R) alpha 0.025%) solution on female pattern hair loss: Single center, Open-label, non-comparative, Phase IV study. *Annals of Dermatology*. 24, 295-305.
- KITANO A. 1985. Shampoo for preventing hair-loss and promoting hair-growth - contg. highly pure linoleic acid, salt and/or ester prepd. from natural plant oil. Número da patente: DE3430166-A, requerida em 05 Jun 1983.
- KOHLI, A. K.; ALPAR, H. O. 2004. Potential Use of Nanoparticles for Transcutaneous Vaccine Delivery: Effect of Particle Size and Charge. *International Journal of Pharmaceutics*. 275, 13-17.
- KORVASOVÁ, Z.; DRAŠAR, L.; MAŠEK, J.; KNOTIGOVÁ, P.T.; KULICH, P.; MATIAŠOVIC, J.; KOVAŘČÍK, K.; BARTHELDYOVÁ, E.; KOUDELKA, S.; ŠKRABALOVÁ, M.; MILLER, A.D.; HOLÝ, A.; LEDVINA, M.; TURÁNEK, J. 2012. Antiviral effect of HPMP (Cidofovir®), entrapped in cationic liposomes: In vitro study on MDBK cell and BHV-1 virus. *Journal of Controlled Release*. 160, 330–338.
- LACHGAR, S.; CHARVERON, M.; GALL, Y.; BONAFE, J.L. 1998. Minoxidil upregulates the expression of vascular endothelial growth factor in human hair dermal papilla cells. *British Journal of Dermatology*. 138, 407–411.
- LIN, Y.; AL-SUWAYEH, S.A.; LEU, Y.I.; SHEN, F.; FANG, J. 2013. Squalene-containing nanostructured lipid carriers promote percutaneous absorption and hair follicle targeting of diphenylprone for treating alopecia areata. *Pharmaceutical Research*. 30, 435–446.
- LOBO, I.; MACHADO, S.; SELORES, M. 2008. Androgenetic alopecia in trichology consultation at the Hospital Geral de Santo António (Oporto - Portugal, 2004-2006): a descriptive study with an analytic component. *Anais Brasileiros Dermatologia*. 83, 207-211.
- LU, W.; CHIANG, B.; HUANG, D.; LI, P. 2014. Skin permeation of D-limonene-based nanoemulsions as a transdermal carrier prepared by ultrasonic emulsification. *Ultrasonics Sonochemistry*. 21, 826–832.
- MCDANIEL, W. R. 2009. Topical composition for treating male and female androgenetic alopecia, age-related alopecia, and keratosis pilaris, comprises linoleic acid in carrier. Número da patente: US2009197954-A1, requerida em 06 Aug 2009
- MARCATO, P.D.; DURÁN, N. 2008. New aspects of nanopharmaceutical delivery systems. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*. 8, 1–14.

- MARCATO-GASPARI, P.D. Sistemas micro e nanoestruturados:Preparação e caracterização no carregamento de ativos. 2009. Doutorado em Ciência, Universidade Estadual de Campinas, Campinas.
- MARCATO, P.D.; CAVERZAN, J.; ROSSI-BERGMANN, B.; PINTO, E.F.; MACHADO, D.; SILVA, R.A.; JUSTO, G.Z.; FERREIRA, C.V.; DURAN, N. 2011. Nanostructured Polymer and Lipid Carriers for Sunscreen. Biological Effects and Skin Permeation. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*. 11, 1880-1886.
- MARIATH, J.G.R.; LIMA, M.C.C.; SANTOS, L.M.P. 1989. Vitamin A activity of buriti (*Mauritia-Vinifera Mart*) and its effectiveness in the treatment and prevention of xerophthalmia. *American Journal of Clinical Nutrition*. 49, 849-853.
- MEHNERT, W.; MADER, K.K. 2001. Solid lipid nanoparticles: Production, characterization and applications. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 47, 165–196.
- MELO, N.F.S.; GRILLO, R.; GUILHERME, V.A.; ARAÚJO, D.R.; DE PAULA, E.; ROSA, A.H.; FRACETO, L.F. 2011. Poly(Lactide-co-Glycolide) Nanocapsules Containing Benzocaine: Influence of the Composition of the Oily Nucleus on Physico-Chemical Properties and Anesthetic Activity. *Pharmaceutical Research*. 28, 1984–1994.
- MENDES, A.I.; SILVA, A.C.; CATITA, J.A.M.; CERQUEIRA, F.; GABRIEL, C.; LOPES, C.M. 2013. Miconazole-loaded nanostructured lipid carriers (NLC) for local delivery to the oral mucosa: Improving antifungal activity. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. 111, 755–763.
- MIHRANYAN, A.; FERRAZ, N.; STROMME, M. 2012 Current status and future prospects of nanotechnology in cosmetics. *Progress in Materials Science*. 57, 875–910.
- MIRMIRANI, P. 2013. Managing hair loss in midlife women. *Maturitas*. 74, 119– 122
- MIYAZAKI, S.; TAKAHASHI, A.; KUBO, W. 2003. Poly n-butylcyanoacrylate(PNBCA) nanocapsules as a carrier for NSAIDs: in vitro release and in vivo skin penetration. *Journal of Pharmaceutical Sciences*. 6, 240-245.
- MORTIMER, C.H.; RUSHTON, H.; JAMES, K.C. 1984. Effective medical treatment of common baldness in women. *Clinical and Experimental Dermatology*. 9, 342-50.
- MORROW, D.I.J.; MCCARRON, P.A.; WOOLFSON, A.D.; DONNELLY, R.F. 2007. Innovative Strategies for Enhancing Topical and Transdermal Drug Delivery. *The Open Drug Delivery Journal*. 1, 36-59.
- MOSMANN, T. 1983. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunological Methods*. 65, 55-63.
- MOVÉRARE, S.; LINDBERG, M.K.; FAERGEMANN, J.; GUSTAFSSON, J.A.; OHLSSON, C. 2002. Estrogen receptor a, but not estrogen receptor b, is involved in the regulation of the hair follicle cycling as well as the thickness of epidermis in male mice. *The Journal of Investigative Dermatology*. 119, 1053-1058.
- MÜLLER, R.H.; MADER, K.; GOHLA, S. 2000. Solid lipid nanoparticles (SLN) for controlled drug delivery—a review of the state of the art. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. 50, 161–177.

- MULLER, R.H.; RADTKE, M.; WISSING, S.A. 2002. Solid lipid nanoparticles (SLN) and nanostructured lipid carriers (NLC) in cosmetic and dermatological preparations. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 54, S131–S155.
- MÜLLER, R.H.; PETERSEN, R.D.; HOMMOSS, A.; PARDEIKE, J. 2007. Lipid Nanoparticles: Recent Advances. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 59, 522–530.
- NAM, S.H.; JI, H.Y.; PARK, J. 2011. Investigation of Tacrolimus Loaded Nanostructured Lipid Carriers for Topical Drug Delivery. *Bulletin of the Korean Chemical Society*. 32, 956-960.
- NAKAMAGOE, M.; TABUCHI, K.; UEMAETOMARI, I.; NISHIMURA, B.; HARA, A. 2010. Estradiol protects the cochlea against gentamicin ototoxicity through inhibition of the JNK pathway. *Hearing Research*. 261, 67–74.
- NORWOOD OT. 2001. Incidence of female androgenetic alopecia (female pattern alopecia). *Dermatologic Surgery*. 27, 53-4.
- OHNEMUS, U.; UENALAN, M.; INZUNZA, J.; GUSTAFSSON, J.A.; PAUS, R. 2006. The Hair Follicle as an Estrogen Target and Source. *Endocrine Reviews*. 27, 677–706.
- OLSEN, E.A.; HORDINSKY, M.; WHITING, D.; STOUGH, D.; HOBBS, S.; ELLIS, M.L.; WILSON, T.; RITTMASER, R.S. 2006. The importance of dual 5 $\alpha$ -reductase inhibition in the treatment of male pattern hair loss: Results of a randomized placebo-controlled study of dutasteride versus finasteride. *Journal of the American Academy of Dermatology*. 55, 1014-1023.
- ORFANOS, C.E.; VOGELS, L. 1980. Lokalthherapie der Alopecia androgenetica mit 17 $\alpha$ -Östradiol. *Dermatology*. 161, 124-132.
- PARDEIKE, J.; HOMMOSS, A.; MULLER, R.H. 2009. Lipid nanoparticles (SLN, NLC) in cosmetic and pharmaceutical dermal products, *International Journal Pharmaceutical*, 366, 170–184.
- POOT F. 2004. Psychological consequences of chronic hair diseases. *Revue Médicale de Bruxelles*. 25, 286-288.
- PROW, T.W.; GRICE, J.E.; LIN, L.L.; FAYE, R.; BUTLER, M.; BECKER, W.; WURM, E.M.T.; YOONG, C.; ROBERTSON, T.A.; SOYER, H.P.; ROBERTS, M.S. 2011. Nanoparticles and microparticles for skin drug delivery. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 63, 470-491.
- QI, J.; LU, Y.; WU, W. 2012. Absorption, Disposition and Pharmacokinetics of Solid Lipid Nanoparticles. *Current Drug Metabolism*. 13, 418-428.
- REDZINIAK, G. 2003. Liposomes and skin: past, present, future. *Pathologie Biologie*. 51, 279- 281.
- RICCI, M.; PUGLIA, C.; BONINA, F.; DI GIOVANNI, C.; GIOVAGNOLI, S.; ROSSI, C. 2005. Evaluation of indomethacin percutaneous absorption from nanostructured lipid carriers (NLC): in vitro and in vivo studies. *Journal of Pharmaceutical Sciences*. 94, 1149–1159.
- RICHET, F. 2011. Determinação da expressão do gene do receptor androgênico em mulheres com alopecia androgenética. Doutorado em Ciências da Saúde. Faculdade de Ciências Médicas da Santa Casa de São Paulo, São Paulo.
- RIDOLFI, D.M.; MARCATO, P.D.; JUSTO, G.Z.; CORDID, L.; MACHADO, D.; DURÁN, N. 2012 Chitosan-solid lipid nanoparticles as carriers for topical delivery of tretinoin. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. 93, 36–40.

- RIVITTI E.A. 2005. Alopecia areata: a revision and update. *Anais Brasileiros de Dermatologia*. 80, 57-68.
- ROGERS, N.E.; AVRAM, M.R. 2008. Medical treatments for male and female pattern hair loss. *American Academy of Dermatology*. 59, 547-566.
- RUKSIRIWANICH, W.; MANOSROI, J.; ABE, M.; MANOSROI, W.; MANOSROI, A. 2011. 5 $\alpha$ -Reductase type 1 inhibition of *Oryza sativa* bran extract prepared by supercritical carbon dioxide fluid. *Journal of Supercritical Fluids*. 59, 61–71
- RUSHTON DH. 1993. Management of hair loss in women. *Dermatologic Clinics* . 11, 47-53.
- SAHLE, F.F.; LANGE, S.; DOBNER, B.; WOHLRAB, J.; NEUBERT, R.H.H. 2012. Development and validation of LC/ESI-MS method for the detection and quantification of exogenous ceramide NP in stratum corneum and other layers of the skin. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 60, 7-13.
- SANT'ANNA, A.L.S. 2000. Estudo da Deposição de Ceramidas sobre a Fibra Capilar para o Combate a Danos Cuticulares. Mestrado em química, Universidade Estadual De Campinas, Campinas.
- SCHWARZ, J.C.; WEIXELBAUM, A.; PAGITSCH, E.; LÖW, M.; RESCH, G.P.; VALENTA, C. 2012. Nanocarriers for dermal drug delivery: Influence of preparation method, carrier type and rheological properties. *International Journal of Pharmaceutics*. 437, 83-88.
- SCHWARZ, J.; BAISAENG, N.; HOPPEL, M.; LÖW, M.; KECK, C.M.; VALENTA, C. 2013, Ultra-small NLC for improved dermal delivery of coenzyme Q10. *International Journal of Pharmaceutics*. 447, 213-217.
- SAHAY, G.; ALAKHOVA, D.Y.; KABANOV, A.V. 2010. Endocytosis of nanomedicines. *Journal of Control Release*. 145, 182-195.
- SCHAFFAZICK, S.R.; GUTERRES, S.S.; FREITAS, L.L.; POHLMANN, A.R. 2003. Physicochemical characterization and stability of the polymeric nanoparticle systems for drug administration. *Química Nova*. 26, 726-737.
- SELVAMUTHUKUMAR, S.; VELMURUGAN, R. 2012. Nanostructured Lipid Carriers: A potential drug carrier for cancer chemotherapy. *Lipids in Health and Disease*. 11, 159-166.
- SINCLAIR, R.; PATEL, M.; DAWSON, JR, T.L.; YAZDABADI, A.; YIP, L.; PEREZ, A.; RUFAUT, N.W. 2011. Hair loss in women: medical and cosmetic approaches to increase scalp hair fullness. *British Association of Dermatologists*. 165, 12–18.
- SHAH, K.A., DATE, A.A., JOSHI, M.D., PATRAVALE, V.B., 2007. Solid lipid nanoparticles (SLN) of tretinoin: potential in topical delivery. *International Journal of Pharmaceutics* 345, 163–171.
- SOUTO, E.B.; SEVERINO, P.; SANTANA, M.H.A.; PINHO, S.C. 2011. Nanopartículas de lipídeos sólidos: métodos clássicos de produção laboratorial. *Química Nova*, 34, 1762-1769.
- TAVEIRA, S.F. 2009 Nanopartículas lipídicas sólidas (SLN) como carreadores de fármacos no tratamento tópico de câncer de pele. Doutorado em ciências farmacêuticas. Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto.

- TEERANACHAIDEEKUL, V.; BOONME, P.; SOUTO, E.B.; MÜLLER, R.H.; JUNYAPRASERT, V.B. 2008. Influence of oil content on physicochemical properties and skin distribution of Nile red-loaded NLC. *Journal of Controlled Release*. 128, 134-141.
- TOMODA, K.; WATANABE, A.; SUZUKI, K.; INAGIE, T.; TERADA, H.; MAKINO, K. 2012. Enhanced transdermal permeability of estradiol using combination of PLGA nanoparticles system and iontophoresis. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. 97, 84-89.
- TRUEB, R.M. 2002. Molecular mechanisms of androgenetic alopecia. *Experimental Gerontology*. 37, 981-990
- ÜNER, M.; RADTKE, M.; WISSING, S.A. 2007. Solid lipid nanoparticles and nanostructure lipid carriers. *Encyclopedia of Nanoscience and Nanotechnology*, American Scientific Publishers. 10, 43-56.
- ZANATTA, C.F.; SATO, A.M.C.D.; DE CAMARGO, F.B.; CAMPOS, P.M.B.G.M.; ROCHA, P.A. 2010. Rheological behavior, zeta potential, and accelerated stability tests of Buriti oil (*Mauritia flexuosa*) emulsions containing lyotropic liquid crystals. *Drug Development and Industrial*. 36, 93-101.
- WOLF, H U. 2009. New ceramide dimers, comprising two ceramide molecules that are linked to one another by their lipophilic ends, useful e.g. for preparing a cosmetic preparation, preferably as a cream, ointment, emulsion, gel, spray or cosmetic oil. Número da patente: US7553981-B2, requerida em 30 Jun 2004.