

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
Departamento de Farmácia

DESENVOLVIMENTO DE NANOPARTÍCULAS POLIMÉRICAS
CONTENDO MINOXIDIL E BETAMETASONA PARA O
TRATAMENTO TÓPICO DA ALOPECIA AREATA

Aluno: Lucas Cantalovo Pereira – 16/0149711

Orientador: Prof. Dr. Guilherme Martins Gelfuso

Co-orientador: Prof. Dr. Breno Noronha Matos

Brasília - DF

2021

LUCAS CANTALOVO PEREIRA

DESENVOLVIMENTO DE NANOPARTÍCULAS POLIMÉRICAS
CONTENDO MINOXIDIL E BETAMETASONA PARA O
TRATAMENTO TÓPICO DA ALOPECIA AREATA

Trabalho apresentado ao curso de graduação em
Farmácia da Universidade de Brasília como
requisito parcial de obtenção do título de Bacharel
em Farmácia

Orientador: Prof. Dr. Guilherme Martins Gelfuso

Co-orientador: Prof. Dr. Breno Noronha Matos

Brasília - DF

2021

FOLHA DE APROVAÇÃO

Lucas Cantalovo Pereira

Desenvolvimento de nanopartículas poliméricas contendo minoxidil e betametasona para o tratamento tópico da alopecia areata

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à Universidade de Brasília como requisito parcial para obtenção de grau Farmacêutico.

Prof. Dr. Guilherme Martins Gelfuso (Presidente)

Prof^a. Dr^a. Paula Martins de Oliveira

RESUMO

O objetivo desse trabalho foi desenvolver nanopartículas de policaprolactona (PCL) co-encapsulando minoxidil e betametasona como estratégia prolongar a liberação tópica dos fármacos, visando posterior aplicação no tratamento tópico da alopecia areata. O método analítico para quantificação do minoxidil e da betametasona por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) foi validado e seguiu os parâmetros de seletividade e linearidade preconizados pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). As nanopartículas de PCL foram obtidas pelo método de miniemulsificação/evaporação de solvente e caracterizadas pela determinação de distribuição do diâmetro hidrodinâmico, potencial zeta e eficiência de encapsulação. O perfil de liberação dos fármacos pela nanoformulação foi avaliado *in vitro* utilizando células de difusão por 9 horas. No compartimento doador das células foi inserida 1 mL da amostra de nanopartículas e o compartimento receptor foi preenchido com uma solução de tampão fosfato pH 7.4 com 0.5% de SDS, para garantir a manutenção das *sink conditions*. As nanopartículas quando preparadas sem os fármacos apresentaram diâmetro hidrodinâmico de $324,3 \pm 2,9$ nm, índice de polidispersividade (PDI) de $0,40 \pm 0,04$ e potencial zeta de $-20,7 \pm 0,52$ mV, enquanto as preparadas com os fármacos apresentaram diâmetro hidrodinâmico de $123,3 \pm 0,51$, PDI de $0,18 \pm 0,01$ e potencial zeta de $-32,1 \pm 2,88$ mV. Foi obtida uma eficiência de encapsulação de $87,42 \pm 0,31\%$ para o minoxidil e de aproximadamente 100% para betametasona. O perfil de liberação obtido demonstrou que as nanopartículas controlam a liberação dos fármacos em relação ao controle contendo os fármacos livres em solução. Assim, as nanopartículas desenvolvidas aparentam ser uma opção viável para o tratamento tópico de alopecia areata.

Palavras-chave: Alopecia Areata, Minoxidil, Betametasona, Nanopartículas Poliméricas, Penetração Folicular.

ABSTRACT

The objective of this work was to develop polycaprolactone (PCL) nanoparticles co-encapsulating minoxidil and betamethasone as a strategy to prolong the topical release of drugs, aiming at further application in the topical treatment of alopecia areata. The analytical method for quantifying minoxidil and betamethasone by high performance liquid chromatography (HPLC) was validated following the selectivity and linearity parameters recommended by the National Health Surveillance Agency (ANVISA). The PCL nanoparticles were obtained by the mini emulsification/solvent evaporation method and characterized by the determination of hydrodynamic diameter distribution, zeta potential, and encapsulation efficiency. The drug release profile by nanoformulation was evaluated in vitro using diffusion cells for 9 hours. In the cell donor compartment, 1 mL of the nanoparticle sample was inserted, and the recipient compartment was filled with a pH 7.4 phosphate buffer solution with 0.5% SDS, to ensure the maintenance of sink conditions. The nanoparticles when prepared without the drugs had a hydrodynamic diameter of 324.3 ± 2.9 nm, a polydispersity index (PDI) of 0.40 ± 0.04 and a zeta potential of -20.7 ± 0.52 mV, while the prepared with the drugs presented hydrodynamic diameter of 123.3 ± 0.51 , PDI of 0.18 ± 0.01 and zeta potential of -32.1 ± 2.88 mV. An encapsulation efficiency of $87.42 \pm 0.31\%$ was obtained for minoxidil and approximately 100% for betamethasone. The obtained release profile demonstrated that the nanoparticles control the release of drugs in relation to the control containing the free drugs in solution. Thus, the developed nanoparticles appear to be a feasible option for the topical treatment of alopecia areata.

Keywords: Alopecia Areata, Minoxidil, Betamethasone, Polymeric nanoparticles, Follicular penetration

1. INTRODUÇÃO

Alopecia areata é uma doença imunomediada de perda de cabelo, que pode afetar os pelos do corpo todo, incluindo sobrancelhas e cílios, além de causar alterações nas unhas. É estimado que a alopecia areata afeta aproximadamente 2% da população global (LEE et al., 2020), sendo que a manifestação é mais frequente entre pessoas de 25 a 36 anos de idade (CRANWELL et al., 2019; FREIRE et al., 2019). Atualmente, os tratamentos mais comuns não são curativos e têm o objetivo de interromper a progressão da doença. Uma estratégia de tratamento é o uso de corticosteroides em altas doses por via oral ou tópica para conter as causas autoimunes da doença. O uso de minoxidil por via tópica também pode ser indicado para auxiliar na cessão da queda capilar, como em casos que a doença se mostra mais persistente é necessária a combinação de medicamentos para retardar a progressão da doença (KISZEWSKI; BEVILAQUA; ABREU, 2018).

Nesses casos, em que é necessário um tratamento mais intensivo, uma formulação tópica contendo uma combinação de fármacos encapsulados em nanopartículas pode ser muito útil para aumentar a efetividade do tratamento. Isto porque estudos demonstram que nanopartículas poliméricas se acumulam mais seletivamente nos folículos pilosos (GELFUSO et al., 2015; MATOS et al., 2015; USHIROBIRA et al., 2020), propiciando um perfil de liberação modificado no local de ação dos fármacos, aumentando seu tempo de ação. Outra vantagem é que ao combinar dois fármacos em uma formulação eles podem ser administrados simultaneamente diminuindo assim a quantidade de aplicações necessárias, o que facilita a adesão do paciente à terapia.

Nanopartículas de matérias orgânicos podem encapsular centenas de moléculas de fármaco dentro de uma única partícula carreadora, essas moléculas vão sendo liberadas à medida que a partícula carreadora se degrada (HOBBS et al., 1998). A PCL (policaprolactona) é um polímero semicristalino, hidrofóbico, biocompatível e biodegradável e com baixa taxa de degradação, sendo ideal para sistemas de liberação prolongada (USHIROBIRA, 2019). Portanto nanopartículas poliméricas de PCL se apresentam como uma opção

promissora para a produção de um sistema de liberação prolongada contendo minoxidil e betametasona.

Desta maneira, a proposta do estudo é desenvolver uma formulação contendo nanopartícula polimérica co-encapsulando minoxidil e betametasona para ser estudada e aplicada como uma alternativa viável ao tratamento tópico da alopecia areata.

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GERAL

Este estudo tem como objetivo preparar e caracterizar nanopartículas de PCL co-encapsulando minoxidil e betametasona e avaliar a liberação dos fármacos para o uso no tratamento tópico da alopecia areata.

2.2. OBJETIVO ESPECÍFICO

- Adaptar o método analítico para quantificação simultânea dos fármacos;
- Obter nanopartículas de PCL encapsulando minoxidil e betametasona;
- Caracterizar nanopartículas quanto ao diâmetro hidrodinâmico, potencial zeta e eficiência de encapsulação;
- Avaliar o perfil de liberação *in vitro* da betametasona e minoxidil a partir das nanopartículas e solução dos fármacos;
- Analisar estatisticamente os dados obtidos.

3. REFERENCIAL TEÓRICO

3.1. ALOPECIA AREATA

A alopecia areata é um tipo comum de perda de cabelo que não envolve a formação de cicatrizes e que afeta igualmente pacientes de ambos os sexos e todas as idades (STRAZZULLA et al., 2018), é estimado que ela afete aproximadamente 2% da população global (LEE et al., 2020).

A porção proximal do folículo piloso em fase anágena é uma região imunoprivilegiada similar ao útero durante a gravidez e aos testículos (WESTGATE; CRAGGS; GIBSON, 1991). Na alopecia areata esse privilégio imune parece ser rompido, havendo mudanças que aumentam a apresentação de antígenos por células do folículo piloso e migração de células T para vizinhança próxima dos folículos nas lesões da alopecia areata (STRAZZULLA et al., 2018).

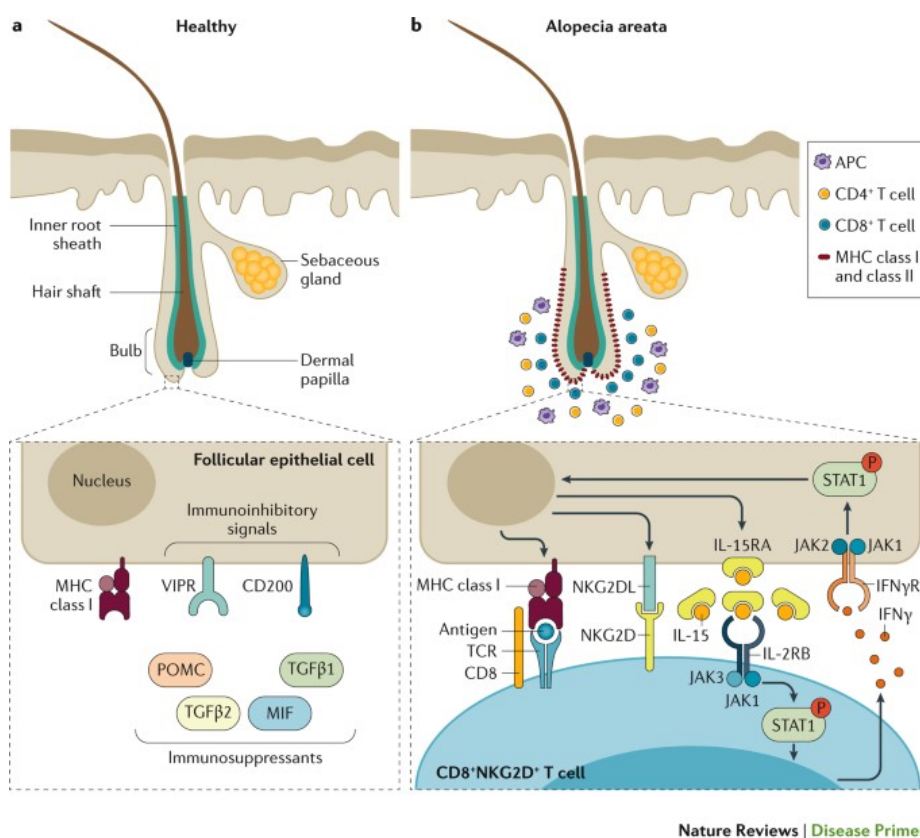


Figura 1: Quebra do privilégio imune durante a alopecia areata (PRATT et al. 2017).

O folículo piloso saudável passa normalmente por 3 fases, anágena (crescimento ativo), em seguida catágena (apoptose das células epiteliais) e por fim a telógena (fase de descanso) (ALONSO; FUCHS, 2006). Durante a alopecia areata o ciclo é perturbado, levando a fase anágena distrófica (STRAZZULLA et al., 2018). Os folículos passam de forma prematura da fase anágena para a telógena devido a inflamação, provavelmente em resposta a um estímulo imuno-mediado.

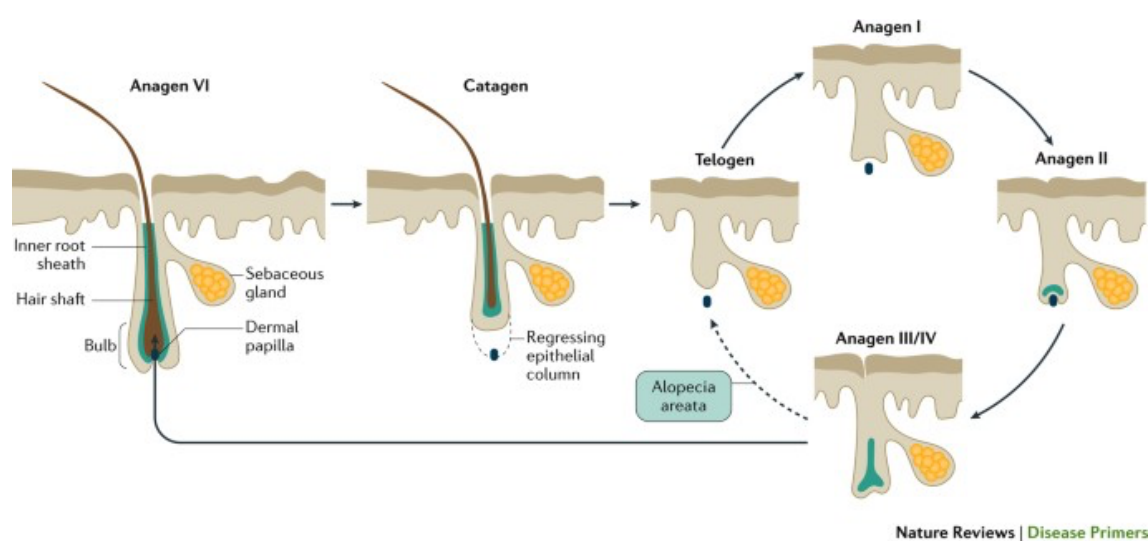


Figura 2: Ciclo do folículo piloso (PRATT et al., 2017).

3.2. NANOPARTÍCULAS DE PCL

Uma alternativa para a pesquisa de novos medicamentos com menos incidência de efeitos adversos e propriedades físico-químicas mais vantajosas, é o desenvolvimento de formulações inovadoras baseadas em nanotecnologia. As nanopartículas poliméricas têm sido propostas com esse objetivo (PEREIRA et al., 2018a).

Nanomateriais, por terem uma grande área de superfície, podem ser carregados com uma alta quantidade de agentes terapêuticos, nanomateriais orgânicos podem encapsular centenas de moléculas de fármaco dentro de uma única partícula carreadora por conta de sua parte central oca ou porosa, essas

moléculas vão sendo liberadas à medida que a partícula carreadora se degrada (HOBBS et al., 1998). A utilização de vetores capazes de permitir a otimização da velocidade e dosagem de substâncias para o controle da liberação de fármacos em sítios de ação específicos tem sido uma área de pesquisa nos últimos anos (SCHAFFAZICK et al., 2003).

As nanopartículas constituídas por polímeros biodegradáveis têm atraído maior atenção devido às suas potencialidades terapêuticas e à maior estabilidade durante o armazenamento (SCHAFFAZICK et al., 2003). A utilização de nanomateriais para a liberação de fármacos pode minimizar os efeitos adversos, impedindo a absorção não específica de agentes terapêuticos para os tecidos saudáveis (HOBBS et al., 1998).

PCL é um poliéster semicristalino, hidrofóbico, biodegradável e biocompatível. Quando comparado com outros polímeros sua degradação é lenta, portanto, é altamente compatível com o design de formas farmacêuticas de liberação controlada (AJIBOYE; TRIVEDI; MITCHELL, 2018). Além da PCL ser compatível com mistura de outros polímeros o que facilita o ajuste de propriedades desejadas como mucoadesão e cinética de degradação (AJIBOYE; TRIVEDI; MITCHELL, 2018).

3.3. TRATAMENTO DE ALOPECIA AREATA:

Diversos tratamentos estão disponíveis para a alopecia areata. Medicamentos tópicos como minoxidil, corticoides e antralina podem ser associados a tratamentos mais agressivos como sensibilizantes (difenciprona) ou metotrexato (Sociedade Brasileira de Dermatologia, 2020).

3.3.1. MINOXIDIL

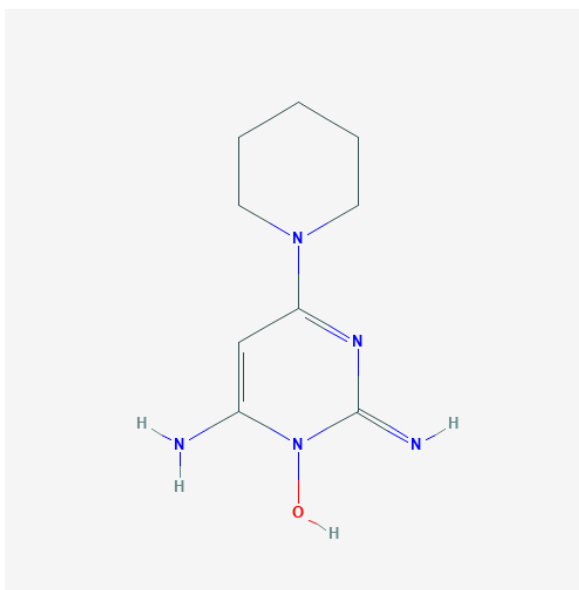


Figura 3: Estrutura química Minoxidil. PM: 209.25 g/mol, pka: 4.61, logP: 1.24, solubilidade em água: 2.2 mg/mL (PubChem 2021).

O Minoxidil é um derivado de piridina (2,4-dia mino-6-piperidinapirimidina 3-óxido), ele é metabolizado em sulfato de minoxidil, que apresenta maior ação nos crescimentos dos cabelos, essa metabolização ocorre no folículo pela atividade de uma sulfotransferase, a qual é maior no folículo piloso do que na epiderme e derme. No mercado nacional e internacional ele é comercializado nas concentrações de 2% e 5%. A maioria das formulações comerciais desse fármaco contém uma quantidade significativa de álcool etílico e/ou propileno glicol que induzem irritação queimação, dermatite alérgica, vermelhidão e secura do couro cabeludo, que podem ser agravados por aplicações repetidas, também foi reportado ritmo cardíaco elevado, hipertricrose, e retenção de sódio e água (PEREIRA et al., 2018b).

Inicialmente, acreditava-se que que a aplicação tópica do minoxidil somente estimulava o crescimento capilar devido a uma ação indireta do fármaco, induzindo vasodilatação na área, aumentando o fluxo sanguíneo na papila dérmica ou criando uma irrigação local. No entanto atualmente sabe-se que esse fármaco pode estimular o crescimento capilar de várias formas: pode aumentar a taxa de crescimento capilar linearmente, alterar o ciclo capilar diminuindo a fase telogênica e/ou prolongando a fase anagênica, aumentar o diâmetro da fibra

capilar, ou agir através da combinação desses efeitos (GELFUSO, 2009; MESSENGER; RUNDEGREN, 2004; SUCHONWANIT; THAMMARUCHA; LEERUNYAKUL, 2019).

3.3.2. BETAMETASONA

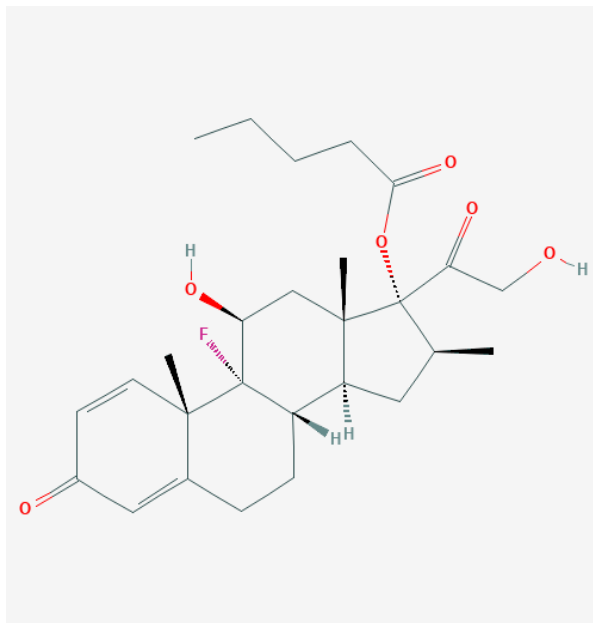


Figura 4: Valerato de betametasona

PM: 476.6 g/mol, logP: 3.6, solubilidade em água: 0.00669 mg/mL (PubChem 2021).

Esteroides são a forma mais comum de tratamento para a alopecia areata, eles podem ser aplicados por via tópica, intralesional ou como agentes sistêmicos. A aplicação tópica de betametasona é fácil, não invasivo, não é necessário ir ao hospital, pode ser feita a autoaplicação e não é doloroso (DEVI; RASHID; GHAFOR, 2015a). O possível mecanismo de ação dos corticosteroides seria através da imunossupressão, não atuando, entretanto, no crescimento do pelo normal (MAIA; FERNANDES, 2003). Tratamentos tópicos convencionais com corticosteroides quando feitos de forma prolongada podem causar efeitos adversos como foliculite, telangiectasia, estrias, alteração pigmentar e atrofia (DEVI; RASHID; GHAFOR, 2015b).

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. MATERIAL

O minoxidil (3-hydroxy-2-imino-6-piperidin-1-ylpyrimidin-4-amine, C₉H₁₅N₅O) utilizada nesse trabalho foi adquirido da SM Empreendimentos Farmacêuticos LTDA (Anápolis, Goiás, Brasil). Betametasona ([[(8S,9R,10S,11S,13S,14S,16S,17R)-9-fluoro-11-hydroxy-17-(2-hydroxyacetyl)-10,13,16-trimethyl-3-oxo-6,7,8,11,12,14,15,16-octahydrocyclopenta[a]phenanthren-17-yl] pentanoate, C₂₇H₃₇FO₆) foi adquirida da Aché (São Paulo, Brasil). PCL (2-[2-(6-hydroxyhexanoyloxy)ethoxy]ethyl 6-hydroxyhexanoate, C₁₆H₃₀O₇) e Tween80 foram adquiridos da Sigma-Aldrich (Steinheim, Alemanha). Acetonitrila e metanol grau HPLC foram adquiridos da J.T. Barker (Philisburg, USA). Todas as análises foram realizadas com água Milli-Q (Millipore, Illkirch-Graffenstaden, França).

4.2. MÉTODO ANALÍTICO PARA QUANTIFICAÇÃO DO MINOXIDIL E BETAMETASONA

O minoxidil e a betametasona foram dosados com o auxílio de um Cromatógrafo Líquido de Alta Eficiência (CLAE), modelo Shimadzu LC 20-AD, composto por duas bombas (modelo LC 20-AT), um injetor automático (modelo 9SIL-20AD) e forno (modelo CTO-20AS), acoplados a um detector espectrofotométrico (modelo SPD-M20A) e a um computador equipado com o programa de análise cromatográfica Shimadzu LC. Foi utilizada uma coluna de fase reversa C₁₈ (150 mm x 4,6 mm) e fase móvel composta por uma mistura de Água Milli-Q:Acetronitrila (53:47) gradiente variando em t = 8 minutos para (45:55) e em t = 12 minutos retornando para (53:47) (v/v). A vazão foi de 1mL/min, o volume de injeção das amostras foi de 20 µL, o forno foi utilizado à temperatura 40°C e a detecção foi feita em 285 nm para o minoxidil e 245 nm para a betametasona.

4.3. VALIDAÇÃO DO MÉTODO ANALÍTICO PARA QUANTIFICAÇÃO DO MINOXIDIL E BETAMETASONA

Para verificar a linearidade do método, foram realizadas seis diluições em metanol a partir de uma solução padrão de cada fármaco (100 µg/mL), previamente preparada pela diluição de 10 mg do fármaco em 100 mL de metanol (grau HPLC, Tedia, Brazil). As diluições para o desenvolvimento da curva foram feitas utilizando como solvente metanol, em triplicata para cada concentração, que foram iguais a 5,0; 10,0; 15,0; 20,0, 30,0 e 100,0 µg/mL. A curva analítica foi construída relacionando-se a concentração de cada fármaco (µg/mL) com área do cromatograma (mA) fornecido pelo aparelho após injeção das amostras padrão. A análise estatística dos dados foi obtida pelo método de regressão linear, obtendo uma reta no formato $y = ax + b$, onde (a) corresponde ao coeficiente angular e (b) coeficiente linear. As faixas lineares foram calculadas utilizando-se o coeficiente de correlação linear (r), que de acordo com os parâmetros mínimo aceitável de $r = 0,99$ (ANVISA, 2017).

Para a análise da seletividade do método foi injetado no CLAE metanol, Estrato Córneo (EC), Folículo Piloso (FP), Pele Remanescente (EP), fita (Scotch storage packing tape long lasting 3M) e cola (SuperBonder), que são os interferentes das análises nos ensaios de permeação cutânea, para verificar a capacidade do método de separar os fármacos desses interferentes nos futuros ensaios de permeação/penetração cutânea (ANVISA, 2017).

Limite de detecção (LD) e limite de quantificação (LQ) foram definidos a partir das equações descritas abaixo:

$$LD = (3 \times s) / S,$$

$$LQ = (10 \times s) / S,$$

onde: s é o desvio padrão do intercepto no eixo Y da curva de calibração e S é o coeficiente angular da curva de calibração.

4.4. OBTENÇÃO DE NANOPARTÍCULAS POR EVAPORAÇÃO DE SOLVENTE

As nanopartículas de PCL encapsulando o minoxidil a 0,5% (m/m) e a betametasona a 0,1% (m/m) foram preparadas a partir do método adaptado de

(BADRI et al., 2017). A técnica se baseia no uso de dois solventes imiscíveis, o polímero e os fármacos sendo solúveis na fase orgânica e os insolúveis na outra fase, que normalmente é água. Neste trabalho, 0,075 g de PLC (MW 2000 $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$) foram dissolvidos em 7,5 g de acetona $\text{C}_3\text{H}_6\text{O}$ (PA 99,5%) sob agitação magnética a 30°C até dissolução completa. A fase orgânica foi composta de uma proporção de massa de 0,5% de Minoxidil e 0,1% de betametasona para o volume final. A fase aquosa foi composta de uma solução contendo 10 mL de água e 50 mg de Tween80. A fase orgânica foi adicionada por injeção à fase aquosa sob agitação magnética moderada, por via de uma seringa com agulha. A dispersão foi então colocada no rotaevaporador (R-100, Buchi, Suíça) para evaporar o solvente orgânico. Após a evaporação as nanopartículas foram armazenadas em geladeira 4°C até o momento da sua utilização. Nanopartículas de PCL sem o fármaco (controle) foram preparadas de forma semelhante, no entanto sem adicionar os fármacos à fase orgânica inicial contendo PCL.

4.5. CARACTERIZAÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS

4.5.1. DIÂMETRO HIDRODINÂMICO DE PARTÍCULA E POTENCIAL ZETA

A distribuição do diâmetro hidrodinâmico das nanopartículas e o potencial zeta foram analisados por espalhamento de luz dinâmico e mobilidade eletroforética, respectivamente. Para isso, 10 μL da suspensão coloidal das nanopartículas, contendo ou não os fármacos, foram diluídos em 990 μL de água Milli-Q e analisadas logo após sua obtenção em um aparelho Zetasizer Nano ZS (Malvern, EUA).

4.5.2. EFICIÊNCIA DE ENCAPSULAÇÃO

A eficiência de encapsulação foi determinada por centrifugação da suspensão das nanopartículas em um dispositivo com tamanho de poro definido em 10kDa (Vivaspin 2, 100000, MWCO HY, Sartorio, Goettingen, Alemanha) (Figura 5). A amostra foi centrifugada por 10 minutos à 4000 rpm em uma

centrífuga (Nova Ética, Brasil), sendo o filtrado constituído de minoxidil e betametasona livres (FL). Foi feita então uma segunda filtração em um filtro de poro igual a 0,45 µm acoplado a uma seringa. Esse método é um método indireto e foi feita a validação do método utilizando os fármacos livres em solução para garantir que não houve interação das membranas filtrantes com os fármacos.

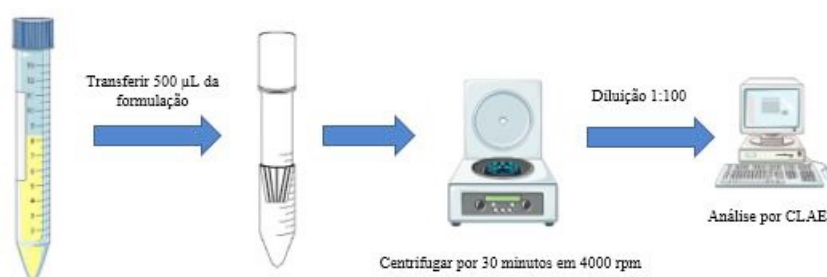


Figura 5: Representação do protocolo de eficiência de encapsulação por Vivaspin (SÁ, 2015).

A concentração de fármaco encapsulado foi determinada pela diferença entre a concentração inicial de fármaco adicionado (FT) e a concentração de fármaco não encapsulada obtida (FL). A eficiência de encapsulação, então, foi calculada da seguinte forma:

$$EE\% = (FT - FL) / FT \times 100,$$

onde: EE% é a eficiência de encapsulação de minoxidil ou betametasona na nanopartícula; FL é a concentração de minoxidil ou betametasona que não foi encapsulado nas nanopartículas de PCL; e FT é a concentração de minoxidil ou betametasona que foi inicialmente colocada para preparo das nanopartículas.

4.6. LIBERAÇÃO *IN VITRO* DA BETAMETASONA E MINOXIDIL A PARTIR DAS NANOPARTÍCULAS

A influência das nanopartículas desenvolvidas na velocidade de liberação dos fármacos foi verificada *in vitro* por meio de um ensaio de liberação. Este ensaio foi realizado utilizando-se células de difusão do tipo Franz modificada e membranas sintéticas hidrofílicas de acetato de celulose.

A solução presente no compartimento receptor da célula foi uma solução tampão fosfato com 0,5% de SDS (para garantir as condições de *sink*), pH 7,4, mantida a 30°C durante todo o tempo de experimento. Essa solução foi sendo reposta ao compartimento receptor à medida que, de 1 h em 1h, foram coletadas para análise de 1 mL de solução receptora ao longo de 9 h de experimento. No compartimento doador foi adicionado 1 mL da suspensão das nanopartículas. Como controle, ou seja, para eliminar o efeito da membrana no controle da liberação do fármaco, um experimento semelhante foi realizado colocando-se no compartimento doador 1 mL de uma solução aquosa dos fármacos. O experimento foi realizado em quadruplicata para cada formulação. Todas as amostras foram diluídas, 500µL de amostra em 500µL metanol para a passagem no CLAE. A quantidade de fármaco liberada foi determinada por meio do método analítico previamente validado no laboratório. O perfil de liberação dos fármacos a partir das nanopartículas foi analisado e comparado com a solução aquosa dos fármacos por meio de métodos gráficos relacionando-se a quantidade de fármaco liberada (µg) em função do tempo (h).

Para se determinar a quantidade de fármaco liberado que se difunde através da membrana hidrofílica foi necessário realizar um cálculo de acordo com a seguinte equação:

$$Q_{\text{realt}} = C_{\text{mensurado}} \times V_r + V_a \times \sum^{n-1} C_a,$$

onde: Q_{realt} é a quantidade liberada acumulada de fármaco no tempo t ; $C_{\text{mensurado}}$ é a concentração mensurada do fármaco da coleta no tempo t ; V_r é o volume do compartimento receptor da célula de difusão; V_a é o volume de amostra removido na coleta; e C_a é a concentração de fármaco na amostra removida.

4.7. ANÁLISE DOS DADOS

Os experimentos foram realizados em triplicata e foram expressos como média \pm desvio padrão da média. A análise estatística dos dados foi feita utilizando o software Prisma, e a significância estatística foi fixada em $p < 0,05$.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O objetivo deste estudo foi desenvolver uma formulação inovadora para o tratamento tópico da alopecia areata utilizando a nanoencapsulação dos fármacos minoxidil e betametasona. A utilização de nanopartículas de PCL possui diversas vantagens na administração tópica de fármacos, principalmente a capacidade de liberação localizada nos folículos pilossebáceos, local de ação dos fármacos, dessa forma reduzindo efeitos adversos. Outras vantagens são a biocompatibilidade, liberação controlada e facilidade de ajuste de suas características para diferentes formulações (AJIBOYE; TRIVEDI; MITCHELL, 2018).

5.1. ADAPTAÇÃO DO MÉTODO ANALÍTICO PARA QUANTIFICAÇÃO DO MINOXIDIL E BETAMETASONA

Foram construídas curvas analíticas para os fármacos (Figuras 6 e 7). Considerando que os coeficientes de correlação linear (r) obtidos foram superiores a 0,99, a linearidade das curvas está de acordo com os padrões propostos pela ANVISA na RDC N° 166, de 24 de julho de 2017, e o método pode ser considerado linear.

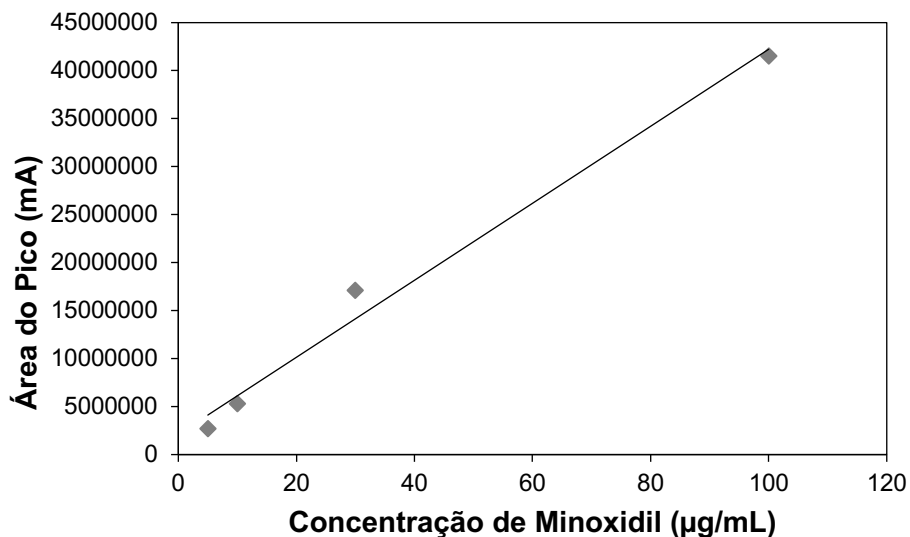


Figura 6: Representação gráfica da curva analítica obtida para o minoxidil por CLAE. Concentrações diluídas em metanol. Equação da reta: $y = 401136x + 2E+06$ e coeficiente de correlação linear: $r = 0,9875$.

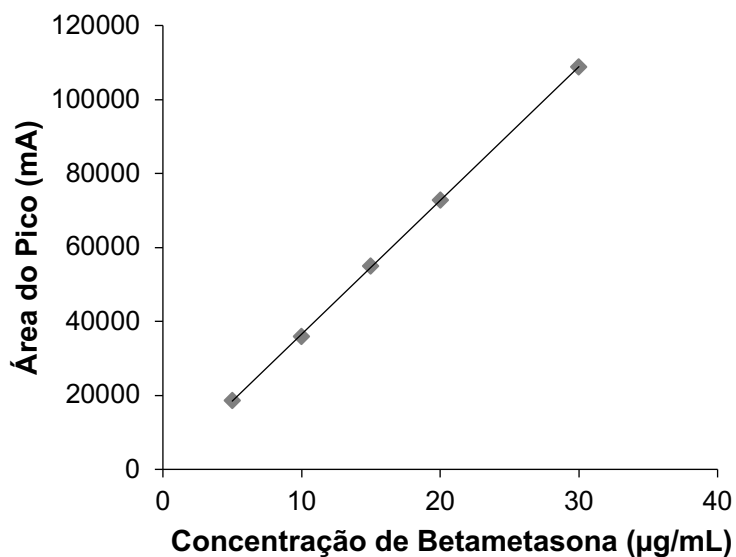


Figura 7: Representação gráfica da curva analítica obtida para a betametasona por CLAE. Concentrações diluídas em metanol. Equação da reta: $y = 3616,2x + 378,19$ e coeficiente de correlação linear: $r = 0,9999$.

5.2. SELETIVIDADE

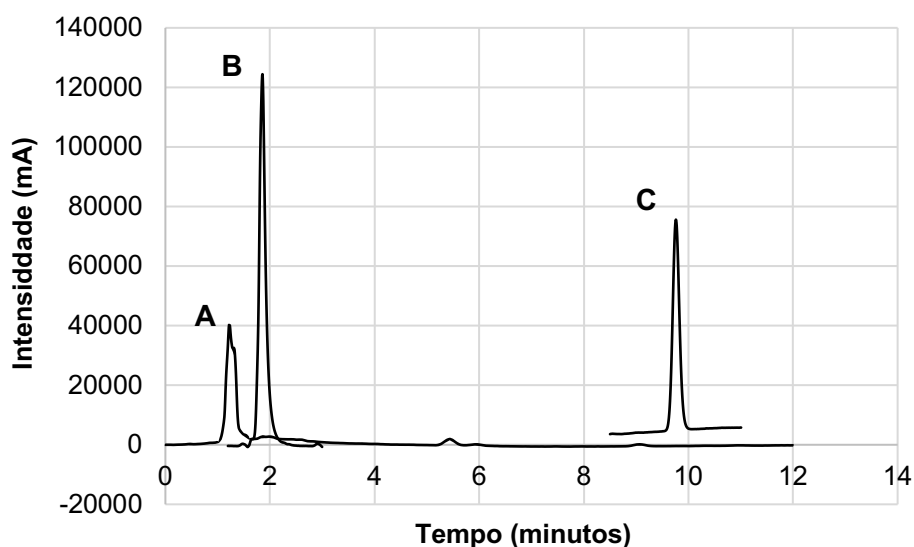


Figura 8: Cromatograma por CLAE comparando uma solução contaminada por metanol, Estrato Córneo (EC), Folículo Piloso (FP), Pele Remanescente (EP), fita (Scotch storage packing tape long lasting 3M) e cola (SuperBonder) utilizada como branco (A), uma solução de minoxidil $100 \mu\text{g.mL}^{-1}$ (B) e uma solução de betametasona $100 \mu\text{g.mL}^{-1}$ (C).

Na análise da seletividade, pensando em futuros ensaios de permeação cutânea dos fármacos, os interferentes de pele suína, fita (Scotch storage packing tape long lasting 3M) e cola (SuperBonder) não foram detectados no mesmo tempo de retenção dos fármacos (minoxidil: 2:30 minutos e betametasona: 9 minutos), dessa forma cumprindo os parâmetros para seletividade estabelecidos pela ANVISA na RDC N° 166, de 24 de julho de 2017.

5.3. LIMITE DE DETECÇÃO (LD) E LIMITE DE QUANTIFICAÇÃO (LQ)

Os LD e LQ foram calculados e são para o minoxidil, $0,00003$ e $0,00009 \mu\text{g.mL}^{-1}$, e para betametasona $0,0005$ e $0,002 \mu\text{g.mL}^{-1}$, respectivamente. Dessa maneira, o método analítico proposto é sensível para a análise do minoxidil e da betametasona nas formulações farmacêuticas, da mesma forma pode ser útil para determinar a cinética de liberação dos fármacos pela matriz polimérica em que eles estão inseridos.

5.4. OBTENÇÃO DE NANOPARTÍCULAS POR EVAPORAÇÃO DE SOLVENTE

As nanopartículas de PCL contendo o minoxidil e betametasona foram preparadas seguindo a técnica evaporação de solvente, e foram caracterizadas quanto à distribuição do diâmetro hidrodinâmico da partícula e potencial zeta, tamanho e eficiência de encapsulação do fármaco.

5.5. CARACTERIZAÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS

5.5.1. DIÂMETRO HIDRODINÂMICO DE PARTÍCULA E POTENCIAL ZETA

A Tabela 1 mostra o diâmetro hidrodinâmico médio (diâmetro hidrodinâmico), índice de polidispersão (PDI) e potencial zeta das suspensões de nanopartículas vazias e preparadas usando-se a concentração de 0,5% (m/m) do fármaco minoxidil e 0,1% (m/m) do fármaco betametasona.

Tabela 1: Diâmetro hidrodinâmico (nm), PDI e potencial zeta das partículas (vazia, 0,5% Minoxidil + 0,1% betametasona).

Partícula	Diâmetro hidrodinâmico das partículas (nm)	PDI	Potencial Zeta (-mV)
Vazia	324,3 ± 2,9	0,04 ± 0,04	20,7 ± 0,52
Minoxidil 0,5% + betametasona 0,1%	123,3 ± 0,5	0,18 ± 0,01	32,1 ± 2,88

O diâmetro hidrodinâmico das nanopartículas contendo o fármaco (123,3 ± 0,5) foi menor que o tamanho das nanopartículas vazias (324,3 ± 2,9) ($p < 0,05$). A diminuição do tamanho da nanopartícula contendo os fármacos em relação à nanopartícula vazia pode ter sido causada pela quantidade de tensoativo necessária para obter a dissolução completa dos fármacos na fase orgânica, 3 vezes a quantidade adicionada à fase aquosa, pois o aumento da proporção de

tensoativo causa a redução do tamanho da partícula (AMOABEDINY et al., 2018).

Segundo Pereira et.al (2018b) nanopartículas com diâmetros próximos à 200 nm são favoráveis para a liberação de fármacos no istmo do folículo piloso, e nanopartículas lipídicas, encapsulando minoxidil, com um diâmetro de 190 nm demonstraram uma melhor acumulação nas camadas da pele de porco em relação aos produtos comerciais.

Utilizando-se proporções de massa de 0,5% do fármaco minoxidil e 0,1% do fármaco betametasona, obteve-se soluções de aparência similar levemente opacas e leitosas, conforme mostra a Figura 9.

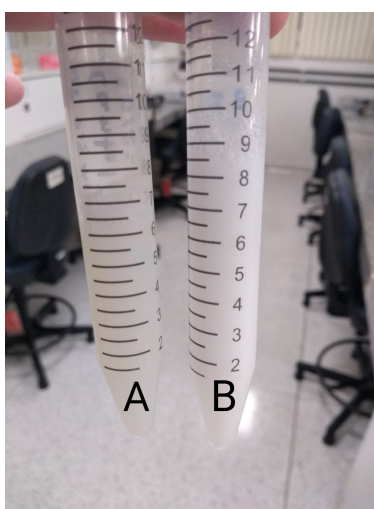


Figura 9: Nanopartículas formadas, à esquerda (A) as nanopartículas contendo o minoxidil e a betametasona, à direita (B) as nanopartículas vazias.

O PDI apresentado por todas as nanopartículas foi próximo de 0,1, mostrando estarem relativamente monodispersas. De maneira semelhante aos nossos resultados, ZANETTI et al. (2019), seguindo a mesma metodologia, obtiveram nanopartículas de PCL com valores de PDI abaixo de 0,2 indicando boa homogeneidade da distribuição de tamanho das partículas.

Todas as partículas apresentaram valores de potencial zeta acima de 20 mV em módulo. No entanto as nanopartículas contendo os fármacos apresentaram uma carga mais negativa ($-32,1 \pm 2,88$ mV) em comparação as nanopartículas vazias ($-20,7 \pm 0,52$ mV), o aumento da carga negativa ocorreu devido a presença da betametasona (HUANG et al., 2003), ela contribui com a carga negativa pelo mecanismo de adsorção iônica (KAYES, 1977). As cargas

superficiais negativas apresentadas pelas nanopartículas são devido à contribuição do PCL devido aos grupos carboxila terminais nas cadeias de polímero (MORA-HUERTAS; FESSI; ELAISSARI, 2011). Valores de potencial zeta mais distantes de zero indicam maior estabilidade devido a repulsão eletrostática (GALINDO-PÉREZ et al., 2018), o que é o caso dessas nanopartículas.

5.5.2. EFICIÊNCIA DE ENCAPSULAÇÃO

A eficiência de encapsulação foi determinada avaliando-se a quantidade de fármaco interagindo com as nanopartículas, seja em seu interior ou conectado à sua superfície. A Tabela 2 apresenta os valores encontrados de eficiência de encapsulação do minoxidil e da betametasona. O valor de eficiência foi de 87,42% para o minoxidil e de 100% para betametasona, mostrando que ambos os fármacos são encapsulados simultaneamente. Os valores obtidos foram similares aos encontrados por GALINDO-PÉREZ et al. (2018) que separadamente obtiveram 85% de eficiência para betacaroteno e 92,29% para óleo de limão, moléculas lipofílicas, também pelo método de miniemulsificação/evaporação de solvente.

Tabela 2: Eficiência de encapsulação dos fármacos em porcentagem (%)

fármaco	Eficiência de Encapsulação (%)
minoxidil	87,42 ± 0,31
betametasona	100

Diversos fatores são capazes de influenciar a quantidade de fármaco associada aos sistemas nanoestruturados, como as características físico-químicas do fármaco, pH do meio, log de P, características da superfície da partícula ou a natureza do polímero e a quantidade de fármaco adicionada.

Portanto a característica de compatibilidade entre PCL e fármacos lipofílicos e a quantidade de fármaco adicionado, entre outras coisas, pode explicar os resultados de eficiência de encapsulação obtidos (SCHAFFAZICK et al., 2003)

5.6. LIBERAÇÃO IN VITRO DA BETAMETASONA E MINOXIDIL A PARTIR DAS NANOPARTÍCULAS

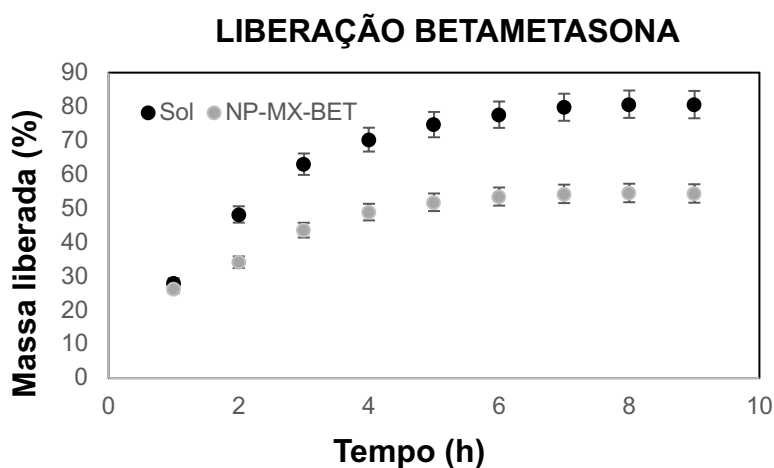


Figura 10: Representação gráfica dos perfis de liberação (porcentagem da massa do fármaco liberada ao longo do tempo), comparando uma solução contendo o fármaco livre (Sol) e as nanopartículas contendo betametasona. $p < 0,05$

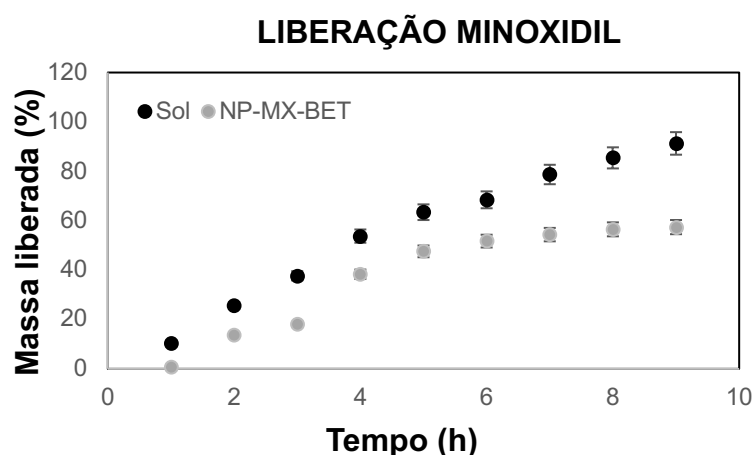


Figura 11: Representação gráfica dos perfis de liberação (porcentagem da massa do fármaco liberada ao longo do tempo), comparando uma solução contendo o fármaco livre (Sol) e as nanopartículas contendo minoxidil. $p < 0,05$

O experimento demonstrou que as nanopartículas de PCL foram capazes de controlar o perfil de liberação dos fármacos (Figuras 10 e 11) de forma significativa ($p < 0,05$) em relação aos mesmos fármacos livres em solução. Também foi observado que a taxa de liberação do minoxidil e da betametasona foi similar devido à alta eficiência de encapsulação destes. O controle exercido pela nanopartícula na liberação pode ser explicado pelo fato de que PCL é um polímero biodegradável de degradação lenta, dessa forma como os fármacos estão presos à nanopartícula de PCL eles só são capazes de serem liberados após a degradação da nanopartícula, assim controlando a taxa de liberação dos fármacos (AJIBOYE; TRIVEDI; MITCHELL, 2018)

6. CONCLUSÃO

As nanopartículas de PCL desenvolvidas foram capazes de encapsular tanto o minoxidil quanto a betametasona e apresentaram características de tamanho, potencial zeta e composição que conferiram a elas liberação controlada dos fármacos e direcionamento seletivo ao folículo piloso, de forma que tiveram a capacidade de prolongar o tempo de liberação dos fármacos no local de ação específico. Dessa forma, as nanopartículas contendo minoxidil e betametasona aparentam ser uma opção viável para o tratamento tópico de alopecia areata. Estudos de permeação e penetração cutânea dos fármacos deverão ser conduzidos posteriormente pelo grupo de pesquisa para confirmar o potencial do sistema em direcionar a liberação dos fármacos para os folículos pilosos.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AJIBOYE, A. L.; TRIVEDI, V.; MITCHELL, J. C. **Preparation of polycaprolactone nanoparticles via supercritical carbon dioxide extraction of emulsions** *Drug Delivery and Translational Research*, 2018.

ALONSO, L.; FUCHS, E. The hair cycle. *Journal of Cell Science*, v. 119, n. 3, p. 391–393, 2006.

AMOABEDINY, G. et al. Overview of preparation methods of polymeric and lipid-based (niosome, solid lipid, liposome) nanoparticles: A comprehensive review. *International Journal of Polymeric Materials and Polymeric Biomaterials*, v.

67, n. 6, p. 383–400, 2018.

ANVISA. **RESOLUÇÃO RDC Nº 166, DE 24 DE JULHO DE 2017**, 2017.

BADRI, W. et al. Polycaprolactone Based Nanoparticles Loaded with Indomethacin for Anti-Inflammatory Therapy: From Preparation to Ex Vivo Study. **Pharmaceutical Research**, v. 34, n. 9, p. 1773–1783, 2017.

CRANWELL, W. C. et al. Treatment of alopecia areata: An Australian expert consensus statement. **Australasian Journal of Dermatology**, v. 60, n. 2, p. 163–170, 2019.

DEVI, M.; RASHID, A.; GHAFOR, R. Intralesional triamcinolone acetonide versus topical betamethasone valerate in the management of localized alopecia areata. **Journal of the College of Physicians and Surgeons Pakistan**, v. 25, n. 12, p. 860–862, 2015a.

DEVI, M.; RASHID, A.; GHAFOR, R. Intralesional triamcinolone acetonide versus topical betamethasone valerate in the management of localized alopecia areata. **Journal of the College of Physicians and Surgeons Pakistan**, v. 25, n. 12, p. 860–862, 2015b.

FREIRE, P. C. B. et al. Minoxidil for patchy alopecia areata: systematic review and meta-analysis. **Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology**, v. 33, n. 9, p. 1792–1799, 2019.

GALINDO-PÉREZ, M. J. et al. Optimization of the emulsification-diffusion method using ultrasound to prepare nanocapsules of different food-core oils. **LWT - Food Science and Technology**, v. 87, p. 333–341, 2018.

GELFUSO, G. M. Desenvolvimento de sistemas de liberação para a administração tópica passiva e iontoforética do minoxidil no tratamento da alopecia androgênica. **IEEE Transactions on Industrial Electronics**, v. 53, n. 5, p. 1504–1511, 2009.

GELFUSO, G. M. et al. Iontophoresis of minoxidil sulphate loaded microparticles, a strategy for follicular drug targeting? **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 134, p. 408–412, 2015.

HOBBS, S. K. et al. Regulation of transport pathways in tumor vessels: Role of tumor type and microenvironment. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 95, n. 8, p. 4607–4612, 1998.

HUANG, Y. C. et al. The characteristics of betamethasone-loaded chitosan microparticles by spray-drying method. **Journal of Microencapsulation**, v. 20, n. 4, p. 459–472, 2003.

KAYES, J. B. Pharmaceutical suspensions: micro electrophoretic properties. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 29, n. 1, p. 163–168, 1977.

KISZEWSKI, A. E.; BEVILAQUA, M.; ABREU, L. B. DE. Mesalazine in the treatment of extensive alopecia areata: A new therapeutic option? **International Journal of Trichology**, v. 10, n. 3, p. 99–102, 2018.

LEE, H. H. et al. Epidemiology of alopecia areata, ophiasis, totalis, and universalis: A systematic review and meta-analysis. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 82, n. 3, p. 675–682, 2020.

MAIA, C. P. A.; FERNANDES, N. C. Tratamento da alopecia areata com corticóide tópico: estudo prospectivo randomizado duplo cego em crianças. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 78, n. 1, p. 63–71, 2003.

MATOS, B. N. et al. Chitosan nanoparticles for targeting and sustaining minoxidil sulphate delivery to hair follicles. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 75, p. 225–229, 2015.

MESSENGER, A. G.; RUNDEGREN, J. Minoxidil: Mechanisms of action on hair growth. **British Journal of Dermatology**, v. 150, n. 2, p. 186–194, 2004.

MORA-HUERTAS, C. E.; FESSI, H.; ELAISSARI, A. Influence of process and formulation parameters on the formation of submicron particles by solvent displacement and emulsification-diffusion methods: Critical comparison. **Advances in Colloid and Interface Science**, v. 163, n. 2, p. 90–122, 2011.

PEREIRA, M. N. et al. Nanotechnology advances for hair loss. **Therapeutic Delivery**, v. 9, n. 8, p. 593–604, 2018a.

PEREIRA, M. N. et al. Nanotechnology advances for hair loss. **Therapeutic Delivery**, v. 9, n. 8, p. 593–604, 2018b.

SÁ, F. A. P. DE. **Desenvolvimento e caracterização de lipossomas mucoadesivos para liberação ocular de fármacos**. [s.l.] Universidade de Brasília, 2015.

SCHAFFAZICK, S. R. et al. Caracterização e estabilidade físico-química de sistemas poliméricos nanoparticulados para administração de fármacos. **Química Nova**, v. 26, n. 5, p. 726–737, 2003.

STRAZZULLA, L. C. et al. Alopecia areata: Disease characteristics, clinical evaluation, and new perspectives on pathogenesis. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 78, n. 1, p. 1–12, 2018.

SUCHONWANIT, P.; THAMMARUCHA, S.; LEERUNYAKUL, K. **Minoxidil and its use in hair disorders: A review** *Drug Design, Development and Therapy*,

2019.

USHIROBIRA, C. Y. et al. Dutasteride nanocapsules for hair follicle targeting: Effect of chitosan-coating and physical stimulus. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 151, p. 56–61, 2020.

WESTGATE, G. E.; CRAGGS, R. I.; GIBSON, W. T. Immune Privilege in Hair Growth. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 97, n. 3, p. 417–420, set. 1991.

ZANETTI, M. et al. Encapsulation of geranyl cinnamate in polycaprolactone nanoparticles. **Materials Science and Engineering C**, v. 97, n. November 2018, p. 198–207, 2019.