

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
FACULDADE DE FARMÁCIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Desenvolvimento de formulações nanotecnológicas  
para tratamento da calvície

LUDMILA PINHEIRO DO NASCIMENTO

PORTO ALEGRE, 2009



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
FACULDADE DE FARMÁCIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Desenvolvimento de formulações nanotecnológicas  
para tratamento da calvície

Dissertação apresentada por **Ludmila Pinheiro do Nascimento** para obtenção do GRAU DE MESTRE em Ciências Farmacêuticas

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Adriana Raffin Pohlmann

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Rio Grande do Sul e aprovada em 25 de junho de 2009 pela Comissão Examinadora constituída por:

Professor Doutor Helder Teixeira Ferreira  
Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Professor Doutor Ruy Carlos Ruver Beck  
Universidade Federal de Santa Maria

Professora Doutora Silvia Stanisçuaski Guterres  
Universidade Federal do Rio Grande do Sul

N244q Nascimento, Ludmila Pinheiro do

Desenvolvimento de formulações nanotecnológicas para tratamento da calvície / Ludmila Pinheiro do Nascimento – Porto Alegre: UFRGS, 2009. – xviii, 71 p.: il., tab., gráf.

Dissertação (mestrado). UFRGS. Faculdade de Farmácia. Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas.

1. Nanossistemas. 2. calvície. 3. avaliação biológica. I. Pohlmann, Adriana Raffin. II. Título.

CDU:

Bibliotecária responsável:

Margarida Maria C. F. Ferreira – CRB10/480

**Este trabalho foi desenvolvido nos Laboratórios 405 da Faculdade de Farmácia da UFRGS e K204 do Instituto de Química, contando com apoio financeiro da Rede Nanocosméticos MCT/CNPq.**



## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	<b>1</b>
<b>2 OBJETIVOS</b> .....	<b>3</b>
2.1 Geral .....	3
2.2 Específicos.....	3
<b>3 REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	<b>5</b>
3.1 Cabelo humano e ciclo capilar.....	5
3.2 Alopecias.....	7
3.3 Produtos para tratamento da calvície.....	8
3.3.1 Minoxidil.....	9
<b>3.4 Nanopartículas</b> .....	<b>12</b>
3.4.1 Nanopartículas poliméricas para uso tópico e capilar .....	14
<b>4 MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	<b>19</b>
<b>4.1 Materiais</b> .....	<b>19</b>
4.1.1 Matérias-primas .....	19
4.1.2 Aparelhos e equipamentos.....	19
4.1.3 Solventes e outros materiais .....	20
4.1.4 Animais.....	21
<b>4.2 Métodos</b> .....	<b>21</b>
4.2.1 Preparação das nanocápsulas .....	21
4.2.2 Caracterização físico-química .....	23
4.2.2.1 Doseamento do minoxidil nas suspensões de nanocápsulas.....	23
4.2.2.2 Determinação do teor e da concentração livre de minoxidil nas formulações .....	24
4.2.2.3 Determinação de pH .....	24
4.2.2.4 Determinação do diâmetro de partículas médio e polidispersão.....	25
4.2.2.5 Determinação do potencial zeta .....	25
4.2.2.6 Análise de retroespalhamento .....	25
4.2.2.7 Determinação da solubilidade do minoxidil na fase aquosa das formulações.....	26
4.2.3 Avaliação biológica das nanocápsulas de minoxidil .....	26
4.2.3.1 Animais.....	26

4.2.3.2 Avaliação biológica .....	27
4.2.3.3 Metodologia analítica para a quantificação de minoxidil em amostras de plasma .....	28
<b>4.3 Descarte de resíduos químicos .....</b>	<b>29</b>
<b>5 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>31</b>
<b>5.1 Preparação e caracterização das suspensões de nanocápsulas contendo minoxidil</b>	<b>31</b>
5.1.1 Desenvolvimento de suspensões de nanocápsulas com superfície aniônica, catiônica ou neutra	31
5.1.2 Caracterização físico-química das nanocápsulas com superfície aniônica, catiônica ou neutra	32
5.1.3 Estudo da influência da concentração de minoxidil na estabilidade física das nanocápsulas....	41
5.1.4 Estudo da estabilidade acelerada por espalhamento múltiplo de luz.....	44
<b>5.2 Avaliação biológica do crescimento de pêlos em camundongos previamente</b>	<b>48</b>
<b>depilados .....</b>	<b>48</b>
<b>5.3 Detecção de minoxidil nas amostras de plasma .....</b>	<b>52</b>
<b>6 CONCLUSÕES.....</b>	<b>55</b>
<b>7 REFERÊNCIAS.....</b>	<b>57</b>
<b>8 ANEXOS .....</b>	<b>65</b>
<b>Anexo 1.....</b>	<b>65</b>
<b>Anexo 2.....</b>	<b>71</b>

## LISTA DE FIGURAS

<i>Figura 1: Esquema ilustrativo de um corte transversal do couro cabeludo</i> .....	6
<i>Figura 2: Fases do ciclo capilar</i> .....	7
<i>Figura 3: Fórmula estrutural do minoxidil</i> .....	10
<i>Figura 4: Gráficos de distribuição de partículas por intensidade, número, volume e potencial zeta das amostras NC(An)</i> .....	34
<i>Figura 5: Gráficos de distribuição de partículas por intensidade, número, volume e potencial zeta das amostras NC(Cat)</i> .....	35
<i>Figura 6: Gráficos de distribuição de partículas por intensidade, número, volume e potencial zeta das amostras NC(PCL)-S</i> .....	36
<i>Figura 7: Gráficos de distribuição de partículas por intensidade, número, volume e potencial zeta das amostras NC(An)-S</i> .....	38
<i>Figura 8: Estruturas químicas do Eudragit RS100 e Eudragit S100</i> .....	40
<i>Figura 9: Gráficos de variação de backscattering das suspensões de nanocápsulas: NC(Cat)</i> .....	45
<i>Figura 10: Gráficos de distribuição de partículas por intensidade, número, volume e potencial zeta da amostra NC(Cat), dias 0, 120 e 240</i> .....	47
<i>Figura 11: Estudo Biológico, dia zero</i> .....	50
<i>Figura 12: Estudo Biológico, dia 14</i> .....	51
<i>Figura 13: Representação gráfica da curva média do minoxidil, quantificado por CLAE</i> .....	66
<i>Figura 14: Cromatogramas obtidos na detecção das nanocápsulas com e sem minoxidil</i> .....	69



## LISTA DE TABELAS

<i>Tabela 1: Composição das suspensões de nanocápsulas contendo minoxidil. ....</i>	<i>22</i>
<i>Tabela 2: Características físico-químicas de nanocápsulas de Eudragit S100 contendo minoxidil [NC(An)] preparadas com etanol.....</i>	<i>33</i>
<i>Tabela 3: Características físico-químicas de nanocápsulas de Eudragit RS100 contendo minoxidil [NC(Cat)] preparadas com etanol. ....</i>	<i>34</i>
<i>Tabela 4: Características físico-químicas de nanocápsulas contendo minoxidil e o polímero PCL [NC(PCL)-S], preparadas com acetona. ....</i>	<i>36</i>
<i>Tabela 5: Características físico-químicas de nanocápsulas contendo minoxidil e o polímero aniônico Eudragit S-100 [NC(An)-S], preparadas com acetona.....</i>	<i>37</i>
<i>Tabela 6: Características físico-químicas de NC(Cat) contendo minoxidil nas concentrações de 1, 5, 10 e 15 mg/mL, no dia 0 e após 14 dias do preparo. ....</i>	<i>42</i>
<i>Tabela 7: Características físico-químicas de NC(Cat) contendo minoxidil nas concentrações de 2 e 3 mg/mL. ....</i>	<i>43</i>
<i>Tabela 8: Características físico-químicas de NC(Cat) 3 mg/mL nos dias 0, 120 e 240. ....</i>	<i>46</i>
<i>Tabela 9: Classificação do crescimento de pêlos ao longo de 21 dias.....</i>	<i>49</i>
<i>Tabela 10: Avaliação da exatidão do método analítico de doseamento do minoxidil em plasma (n = 9).....</i>	<i>53</i>
<i>Tabela 11: Cálculo de ANOVA para análise da linearidade do método analítico de quantificação do minoxidil em nanocápsulas.....</i>	<i>66</i>
<i>Tabela 12: Avaliação dos coeficientes de variação intra e inter-dia do método analítico para doseamento do minoxidil em nanocápsulas (n = 6).....</i>	<i>67</i>
<i>Tabela 13: Avaliação da exatidão do método analítico de doseamento do minoxidil em nanocápsulas (n = 9).....</i>	<i>68</i>



## LISTA DE ABREVIATURAS

ATP: Trifosfato de Adenosina

CLAE: Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

CV: Coeficiente de variação

DP: Desvio Padrão

DSC: Calorimetria Exploratória Diferencial

EHL: Equilíbrio Hidrófilo-Lipófilo

NC(An): Nanopartículas com superfície aniônica, contendo minoxidil

NC(An)-S: Nanopartículas com superfície aniônica, contendo minoxidil e monoestearato de sorbitano

NC(Cat): Nanopartículas com superfície catiônica, contendo minoxidil

NC(PCL)-S: Nanopartículas com superfície não-iônica, contendo minoxidil e monoestearato de sorbitano

PCL: poli( $\epsilon$ -caprolactona)

PDI: Índice de Polidispersão

PLGA: poli(ácido lático-co-glicólico)

SDS: Dodecilsulfato de sódio

TCM: Triglicerídeo dos ácidos cáprico e caprílico

TPGS: succinato de tocoferil polietilenoglicol

UV: Ultra-Violeta



## RESUMO

O uso tópico de nanopartículas para tratamento da calvície tem despertado grande interesse nos últimos anos, principalmente devido à melhoria na ação farmacológica e às evidências de que o folículo piloso apresenta também uma função de reservatório, aumentando assim o tempo de permanência das substâncias no sítio de ação. O objetivo deste trabalho foi desenvolver nanocápsulas contendo minoxidil e avaliar o efeito biológico *in vivo* no re-crescimento de pêlos em camundongos previamente depilados. Primeiramente, suspensões de nanocápsulas com superfície aniônica, catiônica ou neutra foram preparadas utilizando-se como polímeros Eudragit S100 [NC(An) e NC(An)-S], Eudragit RS100 [NC(Cat)] ou poli( $\epsilon$ -caprolactona) [NC(PCL)-S], respectivamente. As nanocápsulas NC(An) e NC(An)-S apresentaram diâmetros médios de 341 nm e 264 nm, enquanto que a NC(Cat) de 219 nm e a NC(PCL)-S de 226 nm. Os índices de polidispersão variaram entre 0,3 e 0,5. As taxas médias de encapsulação situaram-se entre 20 e 69,4%. A suspensão NC(Cat) contendo 3 mg/mL de minoxidil apresentou diâmetro de partículas de 175 nm, índice de polidispersão de 0,1, potencial zeta + 12 mV e taxa de encapsulação de 21,2 %, sendo então selecionada para o estudo biológico. Três grupos de camundongos C57BL/J receberam aplicação tópica diária de NC(Cat), solução aquosa de minoxidil (controle positivo) ou suspensão de nanocápsulas sem fármaco (controle negativo), por 21 dias. O estudo demonstrou um crescimento mais acelerado e uniforme no grupo tratado, quando comparado aos grupos controle. As análises das amostras de plasma evidenciaram a absorção sistêmica de minoxidil no grupo NC(Cat), o que não foi observado para o grupo controle positivo. Os resultados obtidos demonstraram a potencialidade do uso das nanocápsulas contendo minoxidil no tratamento da calvície.

**Palavras-chave:** nanocápsulas poliméricas, calvície, alopecia, minoxidil, eficácia, absorção.



## ABSTRACT

The topical use of nanoparticles for treatment of baldness has raised a great deal of interest in recent years, especially due to an improved pharmacological action and also to the evidence that the hair follicle also show a reservoir function, so increasing the time-residence of substances in the site of action. The aim of this work was to develop nanocapsules containing minoxidil and evaluate their *in vivo* biological effect in re-growing hair in previously shaved mice. Initially, suspensions of anionic, cationic or neutrally surfaced nanocapsules were prepared, using Eudragit S100 [NC(An) and NC(An)-S], Eudragit RS100 [NC(Cat)] or poli( $\epsilon$ -caprolactona) [NC(PCL)], respectively, as polymers. The nanocapsules NC(An) and NC(An)-S presented mean particle diameter of 341 nm and 264 nm, while the NC(Cat) of 219 nm and a NC(PCL) of 226 nm. The polydispersity index varied between 0,3 and 0,5. The mean encapsulation efficiency were between 20 and 69,4 %. The NC(Cat) suspension containing 3 mg/mL of minoxidil presented a particle diameter of 175 nm, a polydispersity index of 0,1, a zeta potential of +12 mV and an encapsulation efficiency of 21,2 %, being then selected to be used in the biological study. Three groups of C57BL/J mice received a daily topical application of NC(Cat), an aqueous solution of minoxidil (positive control) or a drug free nanocapsules suspension (negative control), for a period of 21 days. The study was able to show a more accelerated and uniform growth in the treated group, when compared with the control groups. The analysis of the plasma samples also showed the systemic absorption of minoxidil in the NC(Cat) group of animals, effect which was not observed in the positive control group. Results were able to demonstrate the potential use of nanocapsules containing minoxidil for the treatment of baldness.

**Key words:** polymeric nanocapsules, baldness, alopecia, minoxidil, efficacy, absorption



## 1 INTRODUÇÃO

Os cuidados com o cabelo atraem a atenção da humanidade há milhares de anos devido ao seu importante valor social e psicológico, além da significativa função biológica de conferir proteção e blindagem contra a ação dos raios solares. Ao longo da evolução humana, os cabelos se tornaram uma parte essencial da imagem corporal, definida como um conceito psicológico que se refere às percepções, pensamentos, sentimentos e comportamentos relacionados a uma aparência física (CASH, 2001).

Nos últimos anos, inúmeras pesquisas vêm sendo realizadas sobre a biologia capilar e suas possíveis patologias. A alopecia androgênica ou calvície comum é responsável por mais de 90 % das quedas de cabelos em homens, sendo que em ambos os sexos, a incidência aumenta com a idade. Em mulheres a prevalência é baixa, ocorrendo principalmente após a menopausa. Um histórico familiar da doença está presente em 80 % dos casos, confirmando a transmissão multigênica (REYGAGNE e DE LACHARRIÈRE, 2005). Por outro lado, a alopecia areata afeta uma parcela menor da população, caracterizando-se pela perda rápida e completa de pêlos em uma ou mais áreas do couro cabeludo e, às vezes, de outras regiões (barba, supercílio, púbis, etc.). O estresse emocional também é apontado como fator importante na patogenia (AZULAY & AZULAY, 1999).

Atualmente, o tratamento da alopecia inclui o uso de corticosteróides tópicos ou intra-lesionais, minoxidil tópico (2 ou 5 %) ou finasterida oral (1 mg). O produto mais comumente utilizado é a solução tópica de minoxidil, cujo efeito esperado depende da aplicação diária, 2 vezes ao dia. Entretanto, possíveis reações adversas estão relacionadas ao seu uso, tais como irritação local, hirsutismo e descamação do couro cabeludo.

A descoberta recente de que o folículo piloso exerce relevante papel na penetração cutânea, podendo atuar também como reservatório de fármacos

(LADEMANN *et al.*, 2007; KNORR *et al.*, 2009), pode ser vista como um avanço tecnológico no tratamento de afecções pilosas. Neste contexto, nanopartículas poliméricas vêm sendo propostas como uma nova geração de carreadores para cosméticos, com o propósito de prolongar o tempo de permanência dos fármacos no sítio de ação (BARRATT, 2003).

O objetivo deste trabalho foi verificar se nanocápsulas contendo minoxidil seriam eficazes no tratamento da calvície, avaliando-se a ação farmacológica *in vivo* após administração tópica da formulação em camundongos.

## **2 OBJETIVOS**

### **2.1 Geral**

Desenvolver nanocápsulas poliméricas contendo minoxidil e proceder sua caracterização físico-química, empregando técnicas de espalhamento de luz, mobilidade eletroforética, cromatografia a líquido, e avaliação de eficácia *in vivo* da formulação selecionada através de ensaio biológico em camundongos.

### **2.2 Específicos**

- Preparar nanocápsulas poliméricas contendo minoxidil através do método de deposição interfacial de polímeros pré-formados, empregando diferentes materiais para a obtenção de partículas com superfície aniônica, catiônica ou neutra.
- Determinar as características físico-químicas das formulações de nanocápsulas contendo minoxidil em termos de diâmetro de partículas, polidispersão, potencial zeta, pH, teores, taxas de encapsulação e estabilidade para seleção de formulação.
- Determinar a eficácia da formulação selecionada através da avaliação biológica comparativa do crescimento de pêlos de camundongos previamente depilados em relação a formulações controle.
- Determinar a absorção sistêmica de minoxidil após a administração tópica de nanocápsulas em camundongos.



### 3 REVISÃO DE LITERATURA

#### 3.1 Cabelo humano e ciclo capilar

Os cuidados com o cabelo atraem a atenção da humanidade há milhares de anos devido ao seu importante valor social e psicológico, além da significativa função biológica de conferir proteção e blindagem contra a ação dos raios solares, realizada pela melanina (que também confere coloração aos fios). Ao longo da evolução humana, os cabelos se tornaram uma parte essencial da imagem corporal, definida como um conceito psicológico que se refere às percepções, pensamentos, sentimentos e comportamentos relacionados a uma aparência física. Para muitas pessoas, o cabelo é um atributo físico que expressa a individualidade de forma bastante singular, como uma real parte do corpo humano que é facilmente adaptável à alteração ou mudanças na sua aparência física, podendo também servir como um sinal social de gênero, idade, status, valores e, inclusive, filiação a um grupo (CASH, 2001).

Estima-se que o couro cabeludo tenha cerca de 100.000 a 150.000 fios de cabelo. Estes crescem em torno de 10 mm por mês, sendo considerada como queda normal 60 a 100 fios por dia (AZULAY & AZULAY, 1999). O cabelo humano pode ser visualizado como um filamento queratinizado que cresce a partir de cavidades denominadas folículos (Figura 1). Estes folículos estendem-se desde a derme até a epiderme através do estrato córneo, possuindo componentes glandulares e musculares. O cabelo é basicamente composto por três camadas: cutícula (camada externa composta por várias subcamadas separadas por um complexo de células – endocutícula, epicutícula e exocutícula); córtex (principal componente do cabelo, formado por um conjunto de células cilíndricas denominado de matriz, sendo este o local onde estão situadas proteínas como a queratina) e medula (camada mais interna do folículo, que em alguns casos pode não estar presente) (POZEBON *et al.*, 1999).

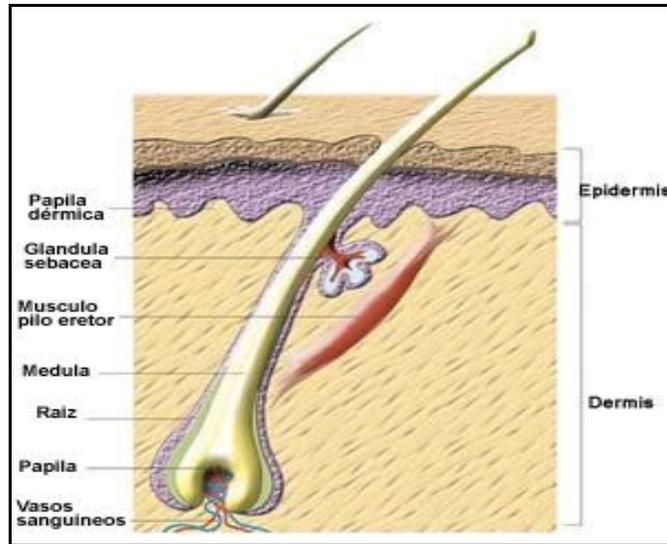


Figura 1: Esquema ilustrativo de um corte transversal do couro cabeludo (adaptado de [www.sandro.com.br/assets/images/cabelo3.jpg](http://www.sandro.com.br/assets/images/cabelo3.jpg)).

O ciclo evolutivo dos cabelos ocorre em três fases (Figura 2): 1) *anagênica*, ou fase de crescimento, na qual há uma grande atividade mitótica e ceratogênica. Sua duração é de dois a três anos no homem e de seis a oito anos na mulher; 2) *catagênica*, onde estas duas atividades cessam, havendo uma regressão da matriz capilar e processando-se em cerca de três semanas; 3) *telogênica*, ou de repouso, que dura de três a seis meses, com a queda final do pêlo telogênico, enquanto um novo pêlo anagênico se inicia (AZULAY & AZULAY, 1999). Entretanto, este ciclo pode ter sua duração alterada no caso de folículos em processo de calvície, onde ocorre um encurtamento da fase anágena e uma miniaturização do folículo.

Diversos estímulos regulatórios extra-foliculares influenciam este ciclo (estímulos endócrinos, neurais, vasculares, nutricionais), que estão associados a funções imunes, à arquitetura da pele e à proliferação celular. O folículo piloso é considerado um poderoso reservatório de células epiteliais e melanócitos, dispondo de uma privilegiada área de defesa anti-infecções (PAUS & PEKER, 2003).

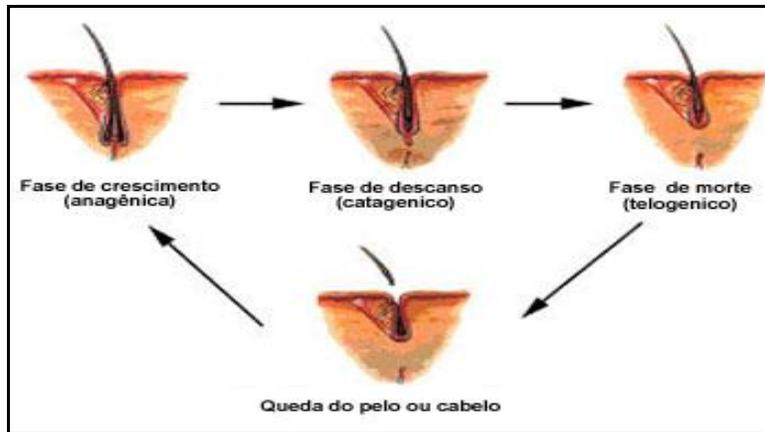


Figura 2: Fases do ciclo capilar (adaptado de [www.sandro.com.br/html/cabelos.html](http://www.sandro.com.br/html/cabelos.html)).

### 3.2 Alopecias

Didaticamente, as afecções pilosas podem ser classificadas em três grupos: alopecias (diminuição excessiva de pêlos); hirsutismo (excesso de pêlos em lugares não desejados) e malformações (tamanho, cor, forma, etc.) (AZULAY & AZULAY, 1999).

A maioria dos pêlos encontra-se em fase anágena. O ciclo das células dos pêlos é um dos mais ativos no corpo, sendo extremamente sensível a influências externas (DU VIVIER, 1996).

Existem diversos tipos de alopecias, variando de acordo com a sua topografia, evolução e etiologia. Elas podem ser difusas (forma aguda e crônica) ou localizadas (REYGAGNE e DE LACHARRIÈRE, 2005). Dentre estas, as de maior importância clínica são: alopecias difusas e localizadas (cicatriciais e não-cicatriciais), eflúvio anagênico (causado pelo efeito de quimioterápicos), eflúvio telogênico, alopecia congênita, alopecia areata e alopecia androgênica (AZULAY & AZULAY, 1999). Um eflúvio (perda significativa de cabelo) pode ser telogênico (como nos casos de alopecia pós-parto, queda sazonal de cabelos, depois de uma alta febre ou terapia tópica com minoxidil), anagênico (como observado durante

quimioterapia antimitótica) ou um misto de ambos (como durante o eflúvio crônico associado com alopecia areata ou também durante a fase aguda da alopecia androgênica) (HORDINSKY, 2003; REYGAGNE e DE LACHARRIÈRE, 2005).

A alopecia androgênica ou calvície comum ocorre com muita frequência. Mais de 90 % das quedas de cabelos em homens são devido a este tipo de alopecia, dos quais cerca de 20 % são homens com idade de 20 anos e 50 % homens com idade de 50 anos. Em ambos os sexos, a incidência de alopecia aumenta com a idade. Em mulheres a prevalência é baixa, com 10 % delas sendo visivelmente afetadas durante a menopausa e 40 % após este período, entre a faixa etária de 50 e 60 anos. Um histórico familiar da doença está presente em 80 % dos casos e o modo de transmissão é multigênica (REYGAGNE e DE LACHARRIÈRE, 2005).

Por sua vez, a alopecia areata é um distúrbio idiopático. Entretanto, sua associação a distúrbios auto-imunes, inclusive o vitiligo, bem como a anormalidade da imunidade humoral e principalmente à imunidade mediada por células, sugerem uma etiologia imunológica (GUZZO, 1993). Afeta 2 % da população, sendo que em 20 % dos casos há relato de história familiar (REYGAGNE e DE LACHARRIÈRE, 2005; HORDINSKY, 2003). Caracteriza-se mais frequentemente por perda rápida e completa de pêlos em uma ou mais áreas do couro cabeludo e, às vezes, de outras regiões (barba, supercílio, púbis, etc.). O estresse emocional também é apontado como fator importante na patogenia (AZULAY & AZULAY, 1999).

### **3.3 Produtos para tratamento da calvície**

Atualmente, alguns tratamentos contra a alopecia já estão disponíveis. Estes incluem agentes imunomoduladores, sensibilizantes de contato e modificadores da resposta biológica. Várias combinações também são utilizadas. O tratamento da alopecia areata irregular comumente inclui o uso de corticosteróides tópicos ou intralesionais (como hidrocortisona, betametasona), minoxidil tópico (2 ou 5 %),

antralina e, ainda, terapia combinada (HORDINSKY, 2003).

ROGERS e AVRAM (2008) revisaram tratamentos existentes para a alopecia, considerando seus mecanismos de ação, efeitos colaterais e resultados esperados. Os fármacos avaliados foram minoxidil, finasterida, dutasterida e cetoconazol, juntamente com suplementos e complexos vitamínicos. Como conclusão, os autores afirmam que até o momento, o minoxidil e a finasterida permanecem como as escolhas mais eficazes para este tratamento.

### **3.3.1 Minoxidil**

A descoberta da ação hipotensiva do minoxidil em 1965 foi um avanço significativo no tratamento da hipertensão, visto que o agente mostrou-se eficaz no tratamento de pacientes com as formas mais graves de hipertensão fármaco-resistente (HARDMAN & LIMBIRD, 2003). O interesse desenvolveu-se quando foi observado que o minoxidil administrado oralmente causava hipertricose (ADAMS, 2001; HORDINSKY, 2003). O fármaco também foi aprovado pela Food and Drug Administration (FDA) para tratamento da alopecia androgênica em homens (na concentração de 5 %) e mulheres (na concentração de 2 %).

O minoxidil ((6-1'-piperidinil)-2,4-pirimidinadiamina-3-óxido) possui massa molar de 209,25 g/mol e sua fórmula estrutural está representada na Figura 3. É solúvel em metanol e propilenoglicol, sendo ligeiramente solúvel em água e em éter (USP 27, 2004; BP 1999).

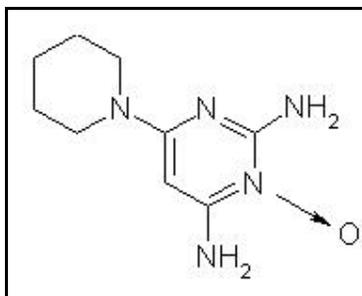


Figura 3: Fórmula estrutural do minoxidil.

O mecanismo pelo qual o minoxidil estimula o crescimento de cabelo ainda não está totalmente estabelecido, mas possíveis mecanismos incluem o aumento de fluxo sanguíneo cutâneo resultante da vasodilatação e a estimulação das células do folículo piloso (MICROMEDEX<sup>®</sup>). NAKAYA e colaboradores (1994) relataram que o sulfato de minoxidil ativa o canal de potássio modulado pelo ATP, permitindo assim o efluxo de potássio, o que causaria a hiperpolarização e o relaxamento da musculatura lisa (HARDMAN & LIMBIRD, 2003). Entretanto, não existem dados que comprovem e esclareçam se realmente canais de potássio são expressos no folículo piloso (MESSENGER e RUNDEGREN, 2004).

Estudos em animais evidenciam que o uso tópico do minoxidil pode encurtar a fase telógena, causando uma prematura passagem da fase de descanso para a fase de crescimento. Outra possibilidade é de que ocorra um prolongamento na fase anágena e um aumento no tamanho do folículo. Através de estudos *in vitro*, diversos efeitos como estimulação da proliferação celular, inibição da síntese de colágeno, estímulo do fator de crescimento vascular endotelial e síntese de prostaglandinas foram relatados. Alguns ou todos estes eventos podem ser relevantes no crescimento capilar, mas a aplicação dos resultados obtidos em estudos de cultura de células na complexa biologia do folículo capilar permanece incerta (MESSENGER e RUNDEGREN, 2004).

O minoxidil é rápida e completamente absorvido (95 %) após administração oral, sendo detectado na corrente sanguínea em 30 minutos. A absorção cutânea do minoxidil aplicado topicamente é de cerca de 5 % da dose aplicada. FERRY e colaboradores (1990) avaliaram a relação entre o tempo de contato e a absorção do minoxidil aplicado topicamente, revelando que, do total absorvido em

um período de 12 horas, 50 % é absorvido em até 1 hora e cerca de 75 % em 4 horas.

A distribuição de um fármaco no organismo baseia-se nas suas propriedades físico-químicas, que muitas vezes não permitem que este atinja o local de ação. Assim, se faz necessária a administração de grandes quantidades de fármaco para obtenção do efeito farmacológico desejado, trazendo, como consequência, o aparecimento da toxicidade do fármaco frente a outros tecidos (COUVREUR *et al.*, 1995)

A ocorrência de hipertricose em todos os pacientes que recebem minoxidil via oral por um longo período de tempo constitui um efeito adverso provavelmente causado pela ativação dos canais de potássio. Ocorre crescimento de pêlos na face, nas costas, nos braços e nas pernas, o que é particularmente desagradável em mulheres (HARDMAN & LIMBIRD, 2003).

Atualmente, as únicas terapias aprovadas pela FDA para uso no tratamento da alopecia androgênica são a solução de uso tópico de minoxidil (minoxidil, álcool, propilenoglicol e água purificada) e comprimidos de 1 mg de finasterida via oral. Para ambos os sexos, recomenda-se a aplicação local da solução de minoxidil diariamente, 2 x ao dia. O paciente deve ser conscientizado de que os benefícios potenciais deste tratamento não serão visíveis antes de 3 meses de aplicação, mas sendo possível obter ótimos resultados após 6 a 8 meses (BONNETBLANC, 2008).

Entretanto, embora a solução tópica de minoxidil apresente comprovada segurança e efetividade, efeitos adversos ao seu uso podem ocorrer. FRIEDMAN e colaboradores (2002) relataram casos de alergia de contato, que incluíam prurido, eritema e ressecamento do couro cabeludo. Alguns pacientes apresentaram sensibilidade ao minoxidil, mas principalmente ao propilenoglicol, componente presente na solução tópica como co-solvente e promotor de absorção (TATA *et al.*, 1994).

CHEN e colaboradores (2005) prepararam 10 soluções contendo três tipos de co-solventes em diferentes proporções (água, etanol e PEG 400), minoxidil 2 % e percentuais crescentes (0,0 a 2,0 %) de um derivado hidrossolúvel de vitamina E

(TPGS), visando avaliar a influência deste na promoção do crescimento capilar após aplicação tópica, e a sua segurança em termos de quantidade de minoxidil absorvida através da pele na circulação sistêmica. O modelo animal utilizado foi camundongos C57BL/6J, sendo que os resultados obtidos foram comparados aos grupos controle negativo (branco) e positivo (solução comercial de minoxidil, Regaine 2 %<sup>®</sup>). Foi possível concluir que o crescimento promovido pelas formulações testadas foi comparável ao do produto comercial, e que a adição de 0,5 % de TPGS foi benéfica em termos de crescimento. Os níveis sanguíneos de minoxidil observados após a aplicação desta concentração de TPGS foram inferiores aos detectados no grupo controle positivo. Entretanto, formulações contendo altas quantidades de TPGS (2 %) apresentaram uma tendência a aumentar a concentração plasmática de minoxidil.

Efeitos sistêmicos em crianças de 10 a 14 anos, ao usarem a solução tópica de minoxidil a 2 %, foram relatados por SCHMUTZ e colaboradores (2008) em uma nota de farmacovigilância. Nos três casos apresentados, os sintomas de taquicardia, palpitações e tonturas começaram a ser notados após 20 dias a um mês de uso diário, 2 x ao dia.

### **3.4 Nanopartículas**

Desde as últimas três décadas, considerável atenção tem sido despendida para o desenvolvimento de novos sistemas de liberação de fármacos, visando uma melhoria na eficácia terapêutica e segurança no uso, através da alteração de aspectos farmacocinéticos e farmacodinâmicos. Dentre os sistemas coloidais de liberação de fármacos, destacam-se as nanopartículas poliméricas e os lipossomas (BODMEIER & MAINCENT, 1998). As nanopartículas, constituídas por polímeros biodegradáveis, têm atraído maior atenção de alguns pesquisadores em relação aos lipossomas, devido às suas potencialidades terapêuticas, à maior estabilidade nos fluidos biológicos e também durante o armazenamento (SCHAFFAZICK *et al.*, 2003).

As nanopartículas poliméricas são sistemas carreadores de fármacos que apresentam diâmetros inferiores a 1  $\mu\text{m}$ . O termo nanopartícula inclui as nanocápsulas e as nanoesferas, as quais diferem entre si segundo a composição e organização estrutural. As nanocápsulas são constituídas por um invólucro polimérico disposto ao redor de um núcleo oleoso, podendo o fármaco estar dissolvido/retido no núcleo e/ou adsorvido à parede polimérica (JÄGER *et al.*, 2007; CRUZ *et al.*, 2006). Por outro lado, as nanoesferas, que não apresentam óleo em sua composição, são formadas por uma matriz polimérica, onde o fármaco pode ficar retido, molecularmente disperso ou superficialmente adsorvido (GUTERRES *et al.*, 2007; SCHAFFAZICK *et al.*, 2003; SOPPIMATH *et al.*, 2001).

Existem vários métodos para preparação de nanocápsulas descritos na literatura, dentre os quais se destaca o método de deposição interfacial de polímero pré-formado, proposto por FESSI e colaboradores em 1988. Este se baseia na deposição do polímero, biodegradável, na interface óleo-agua e não apresenta o inconveniente dos métodos que requerem uma reação de polimerização, no que diz respeito à presença de monômeros e oligômeros residuais. O polímero é dissolvido em um solvente orgânico juntamente com o óleo, o tensoativo e o fármaco. Esta fase orgânica é vertida, cuidadosamente, sob agitação moderada, sobre a fase aquosa, a qual é composta de água e tensoativo. A mistura origina, de forma espontânea, as nanocápsulas, com diâmetro médio situado entre 200 e 500 nm. As nanocápsulas obtidas por esta metodologia são consideravelmente estáveis, sendo capazes de fornecer elevadas taxas de encapsulação, principalmente para fármacos lipofílicos (DEVISSAGUET *et al.*, 1991; FESSI *et al.*, 1988).

A determinação de parâmetros físico-químicos das suspensões de nanopartículas é importante na avaliação da estabilidade. Tal caracterização tem sido possível, apesar do tamanho reduzido das partículas, mediante a combinação de diversas técnicas de análise. As técnicas mais comumente utilizadas são: a análise morfológica, a distribuição do tamanho de partículas e as determinações do potencial zeta, do pH e da concentração de fármaco encapsulado nas nanoestruturas (LEGRAND *et al.* 1999; COUVREUR *et al.*, 2002; SCHAFFAZICK *et al.*, 2003). A distribuição de tamanho de partículas é um parâmetro muito utilizado no controle de qualidade do sistema disperso, pois a estabilidade física

das dispersões depende do tamanho das partículas e da sua distribuição (MÜLLER-GOYMANN, 2004).

Quanto à caracterização da superfície das nanopartículas, o potencial zeta reflete o potencial de superfície da partícula, o qual é influenciado pelas mudanças na interface com o meio dispersante, em razão da dissociação de grupos funcionais na superfície da partícula ou da adsorção de espécies iônicas presentes no meio aquoso de dispersão. As nanopartículas usualmente apresentam um potencial zeta diferente de zero, o que conduz a sistemas relativamente estáveis. O pH também se apresenta como uma característica físico-química importante a ser avaliada, pois alterações de seus valores podem estar associados à degradação do polímero ou de outros componentes pertencentes à formulação (LEGRAND *et al.* 1999; COUVREUR *et al.*, 2002; SCHAFFAZICK *et al.*, 2003).

A determinação do teor total de fármaco contido em nanopartículas é dificultada pela necessidade de separação da fração livre de fármaco daquela encapsulada (SOPPIMATH *et al.* 2001). A técnica mais comumente utilizada, no caso de nanocápsulas, é a ultrafiltração-centrifugação, na qual uma membrana de porosidade de 10 kDa é empregada para separar parte da fase aquosa dispersante da suspensão coloidal. A concentração livre é determinada no ultrafiltrado e a fração de fármaco encapsulada nas nanoestruturas é calculada pela diferença das concentrações total e livre (MAGENHEIM e BENITA, 1991; GUTERRES *et al.*, 1995; SCHAFFAZICK *et al.*, 2003).

### **3.4.1 Nanopartículas poliméricas para uso tópico e capilar**

A maioria dos produtos de uso tópico disponíveis para tratamento da calvície consiste de uma formulação contendo os fármacos dissolvidos em uma solução hidroalcoólica. Entretanto, devido à baixa permeabilidade de fármacos através da camada de queratina, somente uma fração da dose aplicada atinge o local de ação, penetrando nos poros capilares e folículos (TSUJIMOTO, 2007).

Como resultado, o crescimento capilar com o uso destes produtos não supera as expectativas dos pacientes, levando à falta de adesão ao tratamento. Neste contexto, novas técnicas de liberação de fármacos como micro- e nanopartículas podem ser de grande valia para o êxito da terapia.

Recentes estudos (LADEMANN *et al.*, 2007; KNORR *et al.*, 2009) confirmaram a hipótese de que nanopartículas podem penetrar eficientemente nos folículos pilosos (SHIM *et al.*, 2004), alcançando estruturas funcionais profundas onde permanecem estocadas por alguns dias. No caso de substâncias não-particuladas, tais efeitos a longo prazo não foram observados nos folículos pilosos ou no estrato córneo. A princípio, o estrato córneo não possui a característica de reservatório de substâncias topicamente aplicadas, já que estas permanecem localizadas na superfície da pele ou nas camadas celulares superiores (que são continuamente removidas por descamação). Portanto, os folículos pilosos tornam-se os únicos reservatórios a longo prazo para substâncias de uso tópico. Conseqüentemente, são importantes alvos para liberação de fármacos, uma vez que estão rodeados por uma estreita rede de capilares sangüíneos e células dendríticas (células de Langerhans).

Até então, acreditava-se que a penetração cutânea era feita por difusão para dentro das camadas lipídicas, cercadas de corneócitos. Estes novos conceitos mostraram que o transporte de substâncias ativas pela via folicular e ductos sebáceos não poderia mais ser negligenciado, apesar destes elementos representarem somente cerca de 0,1 % do total da área superficial da pele. (ALVAREZ-ROMÁN *et al.*, 2004; LADEMANN *et al.*, 2008).

Diferenças foliculares decorrentes do tipo de pele foram também evidenciadas por LADEMANN e colaboradores (2007), denotando diferentes estados de saúde (pele madura, imatura ou danificada). Os autores mencionam a existência de 2 tipos de folículos: “abertos” e “fechados”, com propriedades de permeação distintas. Nos folículos abertos, onde ocorre produção sebácea e crescimento capilar, a permeação das nanopartículas é intensa e significativa. Por outro lado, nos folículos fechados, onde não há produção sebácea e nem crescimento capilar, não foi observada penetração transcutânea. O fluxo sebáceo e o crescimento do cabelo

poderiam ser as principais razões para as propriedades de reservatório e permeação folicular.

O efeito de nanoesferas de poli(ácido lático-co-glicólico) (PLGA) contendo três diferentes ativos (hinokitiol ou ácido glicirretínico ou 6-benzilaminopurina) para crescimento capilar foi avaliado *in vivo* por TSUJIMOTO e colaboradores (2007). Analisando a intensidade de fluorescência destes ativos em biópsias de couro cabeludo humano, eles verificaram que as nanoesferas exerceram um efeito de permeabilidade nos poros 2 a 2,5 vezes maior quando comparadas ao grupo controle dos mesmos ativos em uma solução de PBS. Também foi possível visualizar um aumento na atividade capilar, cujo ciclo passou da fase de repouso para a fase de crescimento, sugerindo que nanoesferas de PLGA possam ser promissores carreadores de fármacos nos folículos pilosos.

O efeito do diâmetro hidrodinâmico na penetração cutânea de nanopartículas de minoxidil foi avaliado *in vitro* e *in vivo* por SHIM e colaboradores (2004). As nanopartículas foram preparadas com o copolímero em bloco poli( $\epsilon$ -caprolactona)-b-poli(etilenoglicol) pelo método de evaporação de solvente, apresentando diâmetros médios de 40 e 130 nm. Estas foram, então, aplicadas em estudo *in vitro* com células de Franz, sobre a pele de porco com e sem pêlos. Os resultados indicaram que, no caso da pele de porco com pêlos, a permeação do minoxidil incorporado nas nanopartículas de 40 nm foi 1,5 vezes maior na camada epidérmica e 1,7 vezes maior no compartimento receptor, quando comparada às de 130 nm, sugerindo que partículas com menor tamanho facilitam amplamente a penetração do minoxidil. Interessantemente, quando aplicadas em pele de porco sem pêlos, a quantidade de minoxidil permeada não se mostrou dependente do tamanho das partículas, sendo este fortemente detectado no compartimento receptor. Estes resultados indicam a existência de uma rota específica de permeação na pele com pêlos, sugerindo que as nanopartículas são absorvidas por penetração folicular através de vias como os folículos pilosos e ductos sudoríparos.

Neste mesmo estudo *in vitro*, mas utilizando pele de camundongos C57BL com e sem pêlos, o comportamento de permeação do minoxidil foi similar em ambos os casos, fato que nestes animais pode ser explicado pela sua relativamente fina

pele e estrato córneo. Um estudo *in vivo* foi também realizado em camundongos, visando comparar o efeito das nanopartículas com grupos controle (lipossomas e solução hidroalcoólica a 30 %, todos os grupos contendo 0,5 % de minoxidil). Entretanto, a quantidade de minoxidil detectada na pele foi 1,5 vezes maior na aplicação de nanopartículas de 40 nm do que nas de 130 nm. Além disso, não foram encontradas diferenças significativas entre as nanopartículas e os grupos controle. Os autores justificam estes resultados com base nos estudos *in vitro*, levantando a hipótese de que a fina espessura do estrato córneo e da pele de camundongos C57BL também sejam as causas da diminuição das diferenças *in vivo*.



## **4 MATERIAIS E MÉTODOS**

### **4.1 Materiais**

#### **4.1.1 Matérias-primas**

- Minoxidil neutro (Genix, Brasil);
- Sulfato de minoxidil (DEG, Brasil);
- Eudragit S100 (Rohm, Alemanha);
- Eudragit RS (Rohm, Alemanha);
- Poli( $\epsilon$ -caprolactona) (PCL)  $M_w = 65.000$  g/mol (Aldrich, França)
- Span 60<sup>®</sup> (Monoestearato de sorbitano) (Sigma-Aldrich, Brasil);
- Tween 80<sup>®</sup> (Polissorbato 80) (Delaware, Brasil);
- Triglicerídios de ácidos cáprico/caprílico (Brasquim, Brasil).

#### **4.1.2 Aparelhos e equipamentos**

- Balança analítica APX-200 (Denver Instruments, EUA);
- Centrífuga Centrifuge 5417R (Eppendorf);
- Agitador Vortex Certomat<sup>®</sup> MV (B. Braun Biotech International, Alemanha);

- Cromatógrafo a líquido de alta eficiência (Perkin Elmer Series 200, EUA);
- Evaporador rotatório (Büchi, Alemanha);
- Bomba de vácuo V-500 (Büchi, Alemanha);
- Potenciômetro B474 (Micronal, Brasil);
- Espectrômetro de auto-correlação laser - Zetasizer nano-ZS modelo ZEN 3600 (Malvern Instruments, Reino Unido);
- Turbiscan LAb (Formulaction - França);
- Microscópio Óptico de luz polarizada Olympus BX41TF acoplado a câmara fotográfica (Japão) – IQ /UFRGS.

#### **4.1.3 Solventes e outros materiais**

- Metanol grau CLAE (Merck, Brasil);
- Álcool etílico absoluto (Merck, Brasil);
- Acetona (Merck, Brasil);
- Ácido acético glacial (Synth, Brasil);
- Ácido perclórico (Synth, Brasil);
- Água Milli-Q; (Destilador/deionizador Milli-Q – Millipore, EUA);
- Dodecilsulfato de sódio (Synth, Brasil);
- Membrana 0,45 µm (Millipore, EUA);
- Coluna Waters Nova-Pak® C18, 4 µm, 3,9 x 150 mm (Waters, Irlanda);

- Pré-Coluna Phenomenex® Analytical KJ0-4282 (Allcrom Group, Brasil);
- Filtros Ultrafree® (Millipore, EUA).

#### **4.1.4 Animais**

- Camundongos machos C57BL;
- Loção depilatória Veet®;
- Lâmina depilatória elétrica.

## **4.2 Métodos**

### **4.2.1 Preparação das nanocápsulas**

As suspensões de nanocápsulas contendo minoxidil foram preparadas segundo método de deposição interfacial de polímero pré-formado (FESSI *et al.*, 1989) empregando-se etanol ou acetona como solvente orgânico. As formulações de nanocápsulas preparadas com etanol na fase orgânica (Tabela 1) foram nominadas NC(Cat), quando o polímero usado foi o Eudragit RS e NC(An) quando o polímero usado foi o Eudragit S100. Por outro lado, as formulações de nanocápsulas preparadas com acetona e monoestearato de sorbitano (Tabela 1) foram nominadas NC(An)-S, quando o polímero usado foi o Eudragit S100 e NC(PCL)-S, quando o polímero usado foi a poli( $\epsilon$ -caprolactona). O sufixo “S” indica a presença do tensoativo Span 60® (monoestearato de sorbitano).

No preparo das formulações com etanol, o polímero foi solubilizado na fase orgânica juntamente com o fármaco e os triglicerídeos de ácido caprílico e cáprico, sob aquecimento moderado (40 °C). Após a solubilização, a fase orgânica foi

injetada, com auxílio de um funil, na fase aquosa contendo o tensoativo de alto EHL (polissorbato 80). A suspensão foi mantida sob agitação moderada durante 10 minutos e então, concentrada a um volume final de 10 mL em evaporador rotatório para eliminação do solvente orgânico e ajuste da concentração final de minoxidil.

No preparo das formulações com acetona, o minoxidil foi previamente solubilizado em uma pequena quantidade de etanol (4 mL), sendo esta solução então vertida na fase orgânica contendo o tensoativo de baixo EHL (monoestearato de sorbitano), o polímero e o triglicérideo dos ácidos cáprico e caprílico. A suspensão foi mantida sob agitação moderada durante 10 minutos e então, concentrada a um volume final de 10 mL em evaporador rotatório para eliminação do solvente orgânico e ajuste da concentração final de minoxidil.

Tabela 1: Composição das suspensões de nanocápsulas contendo minoxidil.

Componentes	Formulações			
	NC(An)	NC(Cat)	NC(PCL)-S	NC(An)-S
<b>Fase Orgânica</b>				
Polímero	Eudragit S-100 100 mg	Eudragit RS-100 100 mg	PCL 100 mg	Eudragit S-100 100 mg
Trig. Ác. Cáprico/capríl.	0,33 mL	0,33 mL	0,33 mL	0,33 mL
Minoxidil	10 mg	10, 20, 30, 50, 100 e 150 mg	10 mg	10 mg
Span 60 <sup>®</sup>	-	-	77 mg	77 mg
Solv. Orgânico	Etanol 27 mL	Etanol 27 mL	Acetona 23 mL	Acetona 23 mL
<b>Fase Aquosa</b>				
Água MilliQ	53 mL	53 mL	53 mL	53 mL
Tween 80	77 mg	77 mg	77 mg	77 mg

## 4.2.2 Caracterização físico-química

### 4.2.2.1 Doseamento do minoxidil nas suspensões de nanocápsulas

As suspensões de nanocápsulas foram tratadas com metanol para a extração do fármaco e doseamento através de cromatografia a líquido de alta eficiência (CLAE). As análises foram realizadas em cromatógrafo Perkin Elmer Series 200, utilizando-se detector ultravioleta visível 282 nm, coluna Waters Nova-Pak<sup>®</sup> C18 com partículas de 4 µm, pré-coluna Phenomenex Analytical e fase móvel isocrática de metanol, água e ácido acético glacial em uma proporção 70:30:1 (v/v). Conforme preconizado na Farmacopéia Americana (USP 27) foram também adicionados à fase móvel 3 g/L de dodecilsulfato de sódio (SDS). O pH aparente foi então ajustado a pH 3,0 com ácido perclórico. O fluxo utilizado foi de 0,8 mL/min.

A curva padrão foi preparada a partir de uma solução-mãe contendo 10 mg de minoxidil em 50 mL de metanol, que forneceu diferentes soluções nas seguintes concentrações: 0,5 µg/mL, 0,75 µg/mL, 1 µg/mL, 2 µg/mL, 5 µg/mL, 10 µg/mL, 20 µg/mL, 30 µg/mL e 50 µg/mL.

O método de quantificação foi validado segundo as normas descritas pelo *International Conference on Harmonisation* (ICH, 2005) e pela Resolução nº 899 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) (BRASIL, 2003), em termos de: especificidade, linearidade, precisão, limite de detecção, limite de quantificação e exatidão (Anexo 1).

#### **4.2.2.2 Determinação do teor e da concentração livre de minoxidil nas formulações**

O teor de minoxidil nas suspensões foi determinado por CLAE (item 4.2.2.1) após dissolução das nanocápsulas (100 µL) com metanol (10 mL). A solução foi diluída 100x, filtrada em membrana 0,22 µm e injetada no cromatógrafo (n=9). A concentração livre de minoxidil foi determinada em triplicatas para os três lotes diferentes de cada formulação (n=9) após ultrafiltração-centrifugação (Ultrafree® - MC Millipore 10.000 Da) durante 10 minutos a 2.000 ×g. O ultrafiltrado foi diluído 50x para ser quantificado através de CLAE, empregando-se metodologia descrita no item 4.2.2.1.

A taxa de encapsulação foi calculada pela relação percentual entre a concentração de fármaco encapsulado e o teor, multiplicado por 100. A concentração de fármaco encapsulado nas nanocápsulas foi calculada, levando em consideração a diferença entre a concentração total de minoxidil na formulação e a sua concentração livre presente na fase aquosa determinadas.

#### **4.2.2.3 Determinação de pH**

A determinação de pH foi realizada em potenciômetro calibrado com solução tampão pH 4,0 e 7,0, diretamente nas suspensões de nanocápsulas, após preparação. Os resultados foram obtidos através da média de triplicatas de três lotes de formulações (n=9).

#### **4.2.2.4 Determinação do diâmetro de partículas médio e polidispersão**

A determinação do diâmetro médio e do índice de polidispersão das nanopartículas em suspensão foram realizados através de espalhamento de luz dinâmico. As amostras foram diluídas 500 vezes em água MilliQ<sup>®</sup> e filtradas (Millipore<sup>®</sup> 0,45 µm), sendo os resultados expressos pela média de 3 medidas por amostra para três diferentes lotes de formulações (n=9).

#### **4.2.2.5 Determinação do potencial zeta**

O potencial zeta das nanocápsulas foi obtido logo após preparação das suspensões. As suspensões de nanocápsulas foram diluídas em solução aquosa de NaCl 10 mM, sendo os resultados expressos pela média de 3 medidas de cada amostra para três lotes diferentes de formulações (n=9).

#### **4.2.2.6 Análise de retroespalhamento**

As suspensões de nanocápsulas foram analisadas diretamente em Turbiscan<sup>®</sup> (Formulation, França). Este equipamento permite determinar a estabilidade físico-química de emulsões e dispersões coloidais, podendo detectar instabilizações causadas por fenômenos irreversíveis, como coalescência e floculação, ou processo reversíveis, como cremagem ou sedimentação (LEMARCHAND *et al.*, 2003). A técnica combina transmissão e retroespalhamento de luz empregando uma fonte de infravermelho próximo (850 nm) e detectores que medem, a cada 40 µm, a intensidade da luz transmitida ou refletida que atinge a amostra (MENGUAL *et al.*, 1999). As formulações selecionadas de NC(Cat) nas concentrações de 1 mg/mL, 2 mg/mL e 3 mg/mL de minoxidil foram analisadas em

cubetas de vidro (20 mL) durante 24 h, a 25 °C, com varreduras a cada 6 minutos.

#### **4.2.2.7 Determinação da solubilidade do minoxidil na fase aquosa das formulações**

Minoxidil (10 mg) foi adicionado em 1 mL de solução preparada com água e polissorbato 80 (10 mL e 76,7 µg, respectivamente, mantendo-se assim a mesma proporção da fase aquosa das formulações). A mistura foi agitada em vórtex durante 30 s. Após repouso de 10 dias, a amostra foi agitada novamente em vórtex por 30 s e centrifugada durante 10 minutos a 2.000 ×g. O sobrenadante foi então coletado, diluído em 10 mL de fase aquosa, filtrado (Millipore® 0,45 µm) e analisado quanto ao teor de minoxidil por CLAE, segundo metodologia descrita em 4.2.2.1.

#### **4.2.3 Avaliação biológica das nanocápsulas de minoxidil**

##### **4.2.3.1 Animais**

O protocolo experimental foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da UFRGS sob número 2007840 (Anexo 2). O experimento biológico foi realizado com camundongos machos C57BL/J obtidos da FEPPS (Fundação Estadual de Produção e Pesquisa em Saúde). Os animais foram mantidos no biotério da Faculdade de Farmácia da UFRGS até o momento de sua utilização. Os experimentos foram realizados nos Laboratórios do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas (PPGCF), em espaço reservado aos experimentos animais (Laboratório 405). Os animais receberam alimentação e água livre durante todo o experimento. As condições ambientais da sala foram controladas e adequadas ao abrigo dos animais, com temperatura média de 22 ± 2 °C, ciclo

artificial de luminosidade (12 h claro – 12 h escuro), umidade relativa em torno de 60 % e sanitização diária.

Duas horas após a última aplicação tópica (dia 21), os animais foram sacrificados por deslocamento cervical. O sangue total de cada animal foi coletado, centrifugado e armazenado. Os animais foram então acondicionados em embalagens plásticas adequadas e depositados em *freezer* especial da Faculdade de Farmácia até serem recolhidos pelo Serviço de Coleta Especial da Prefeitura Municipal de Porto Alegre.

#### **4.2.3.2 Avaliação biológica**

A avaliação biológica das formulações foi feita baseada no protocolo proposto por CHEN e colaboradores (2005) com modificações. Os pêlos de camundongos machos C57BL/J foram removidos através de depilação com lâmina depilatória elétrica, seguida da aplicação tópica de loção depilatória Veet®. No dia seguinte, foram aplicadas: a) a formulação teste de nanocápsulas catiônicas contendo 3 mg/mL de minoxidil, b) o controle positivo com solução aquosa de sulfato de minoxidil na mesma concentração molar, obtida pelo doseamento da solução por CLAE, ou c) o controle negativo feito com suspensão de nanocápsulas sem fármaco. A aplicação de cada suspensão ou solução foi feita com auxílio de uma válvula de *spray*. Foram pesados diversos jatos da formulação e dos controles, determinando-se que o valor médio de uma aspersão corresponde a 0,13 mL. Considerando que as soluções hidroalcoólicas comercialmente disponíveis apresentam as concentrações de 20 mg/mL e 50 mg/mL (equivalentes a 2 % e 5 %, respectivamente) e que a dose diária testada no protocolo proposto por CHEN e colaboradores (2005) era equivalente a 4 mg/dia de minoxidil, calculou-se que seriam necessárias 11 aspersões diárias para atingir a dose ( $11 \times 0,13 \text{ mL} = 1,43 \text{ mL} \times \text{dose } 3 \text{ mg/mL} = 4,29 \text{ mg/dia}$ ).

A avaliação do crescimento de pêlos foi realizada pela análise de fotografias de cada camundongo tiradas a cada 3 ou 4 dias, ao longo de 21 dias, sendo então classificados segundo a escala: 0. pele lisa sem pêlos, após depilação, 1. estado inicial, 2. pêlo curto visível, 3. pêlo longo esparso, 4. pêlo longo denso e 5. completo crescimento de pêlos.

#### **4.2.3.3 Metodologia analítica para a quantificação de minoxidil em amostras de plasma**

As concentrações plasmáticas de minoxidil foram determinadas por CLAE, utilizando-se as mesmas condições cromatográficas apresentadas no item 4.2.2.1.

A metodologia previamente validada foi utilizada para a quantificação do fármaco nas amostras de plasma. A exatidão e a especificidade foram novamente avaliadas, utilizando-se plasma como matriz. Foram preparadas três soluções-mãe contendo 20 mg de minoxidil em 10 mL de etanol, que forneceram diferentes soluções nas seguintes concentrações: 0,15 mg/mL, 0,30 mg/mL, 0,90 mg/mL (n=9). Alíquotas de 10 µL de cada diluição foram adicionadas a tubos eppendorfs contendo 90 µL de plasma, a fim de se obter concentrações finais em plasma de 5, 10 e 30 µg/mL, respectivamente. Para a precipitação da amostra sem fármaco (branco, para teste de especificidade) e das amostras de plasma coletadas após o experimento biológico, 100 µL de plasma foram precipitados com 200 µL de metanol. Posteriormente, as amostras foram agitadas em vórtex por 3 minutos e centrifugadas, durante 10 minutos a 2.000 ×g e temperatura de 4 °C. O sobrenadante foi transferido para *inserts* colocados dentro de *vials* e, então, quantificado por CLAE.

### **4.3 Descarte de resíduos químicos**

Os resíduos químicos gerados durante a parte experimental do trabalho foram rotulados e descartados conforme preconizado no Plano de Gerenciamento de Resíduos (PGR), elaborado pela Comissão de Saúde e Ambiente de Trabalho (COSAT) da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), em 2007.



## **5 RESULTADOS E DISCUSSÃO**

### **5.1 Preparação e caracterização das suspensões de nanocápsulas contendo minoxidil**

#### **5.1.1 Desenvolvimento de suspensões de nanocápsulas com superfície aniônica, catiônica ou neutra**

As suspensões de nanocápsulas com superfície aniônica, catiônica ou neutra foram preparadas utilizando-se como polímeros: Eudragit S100, Eudragit RS100 ou poli( $\epsilon$ -caprolactona), respectivamente, com base na composição qualitativa de nanocápsulas previamente relatada na literatura (CRUZ, 2005; PAESE, 2008). Para comparar a influência das características de superfície, as formulações de nanocápsulas de minoxidil contendo Eudragit S100, Eudragit RS100 foram obtidas pelo método de deposição interfacial de polímero, usando etanol como solvente orgânico e triglicerídeos dos ácidos cáprico e caprílico, monoestearato de sorbitano e polissorbato 80 como materiais.

A formulação de nanocápsulas de Eudragit S100 [NC(An)] apresentou-se estável. Por outro lado, observou-se que, imediatamente após o preparo, as formulações de nanocápsulas contendo Eudragit RS100 [NC(Cat)] apresentaram-se instáveis, ocorrendo separação de fases na suspensão. UBRICH e colaboradores (2005) prepararam nanopartículas de ciclosporina com Eudragit RS utilizando Pluronic<sup>®</sup> como único tensoativo, sem a presença de monoestearato de sorbitano. Adicionalmente, SIQUEIRA e colaboradores (2008) também detectaram instabilidade em formulações de nanocápsulas de benzofenona preparadas com monoestearato de sorbitano e revestidas com quitosana, um biopolímero biodegradável policatiônico. Desta forma, no preparo dos lotes subseqüentes de NC(Cat) contendo minoxidil optou-se por utilizar apenas o polissorbato 80 como tensoativo. Por conseqüência, para que os polímeros fossem o único parâmetro de

formulação diferente entre NC(An) e NC(Cat), optou-se por preparar NC(An) também sem o monoestearato de sorbitano.

Para a obtenção das nanocápsulas com superfície neutra, o polímero poli( $\epsilon$ -caprolactona) foi escolhido por ser um poliéster alifático que confere ao material biodegradabilidade e caráter hidrofóbico não-ionizável. Como este não é solúvel em etanol, as NC(PCL)-S foram preparadas com acetona como solvente orgânico. Como o minoxidil não é solúvel em acetona, este foi previamente solubilizado em etanol, sendo, a solução, então, adicionada na fase orgânica composta de acetona, triglicerídeos dos ácidos cáprico e caprílico, PCL e monoestearato de sorbitano. Para fins comparativos, preparou-se a suspensão de nanocápsulas com Eudragit S100 [NC(An)-S], utilizando triglicerídeos dos ácidos cáprico e caprílico e monoestearato de sorbitano em acetona e fase aquosa de polissorbato 80.

Todas as formulações de nanocápsulas foram obtidas como suspensões leitosas esbranquiçadas com reflexo azulado. Não houve formação de resíduos em qualquer das suspensões, não havendo necessidade de filtração ou centrifugação após preparação.

### **5.1.2 Caracterização físico-química das nanocápsulas com superfície aniônica, catiônica ou neutra**

Foram preparados 3 lotes de cada formulação, visando avaliar a reprodutibilidade dos resultados verificados em ensaios preliminares. Para a formulação NC(An) o diâmetro médio das partículas foi de 341 nm com uma grande variação entre os lotes. Uma grande variação também foi verificada no índice de polidispersão. A taxa de encapsulação foi similar nos 3 lotes, sendo em média de 69 % (Tabela 2).

Tabela 2: Características físico-químicas de nanocápsulas de Eudragit S100 contendo minoxidil [NC(An)] preparadas com etanol.

	<b>Diâmetro (nm)</b>	<b>PDI</b>	<b>Potencial Zeta (mV)</b>	<b>Teor (mg/mL)</b>	<b>Taxa de encapsulação (%)</b>	<b>pH</b>
<i>Lote 1</i>	265	0,3	-25	1,23	71,2	5,3
<i>Lote 2</i>	293	0,4	-24	0,91	67,4	5,3
<i>Lote 3</i>	467	0,5	-24	1,11	69,4	5,1
Média	341 ±109	0,4±0,1	-25 ± 1	1,08 ± 0,16	69,4 ± 1,9	5,2±0,1

Analisando-se os gráficos de distribuição de partículas (Figura 4), torna-se evidente a presença de um sistema dinâmico, já que dentro de uma mesma amostra não houve reprodutibilidade dos diâmetros nas 3 leituras efetuadas pelo equipamento, sugerindo uma possível transferência de massa entre as partículas.

Perfis de distribuição de tamanho por intensidade evidenciam que as partículas com menor diâmetro tendem a apresentar um pico menor que partículas de diâmetro maior (quando há uma presença proporcional de ambas), pois a intensidade de espalhamento de luz é proporcional ao diâmetro elevado na 6ª potência. Perfis de distribuição de tamanho por número apresentam a relação do número de partículas, para cada tamanho, que a formulação apresenta. Assim, a presença de mais de um pico indica a presença de mais de uma população de tamanho diferente. Por outro lado, nos perfis de distribuição de tamanho por volume, a intensidade de espalhamento de luz torna-se proporcional ao diâmetro elevado na 3ª potência, já que o volume de uma esfera é igual a  $\frac{4}{3} \pi (d/2)^3$  (MALVERN INSTRUMENTS LTD, MRK656-01).

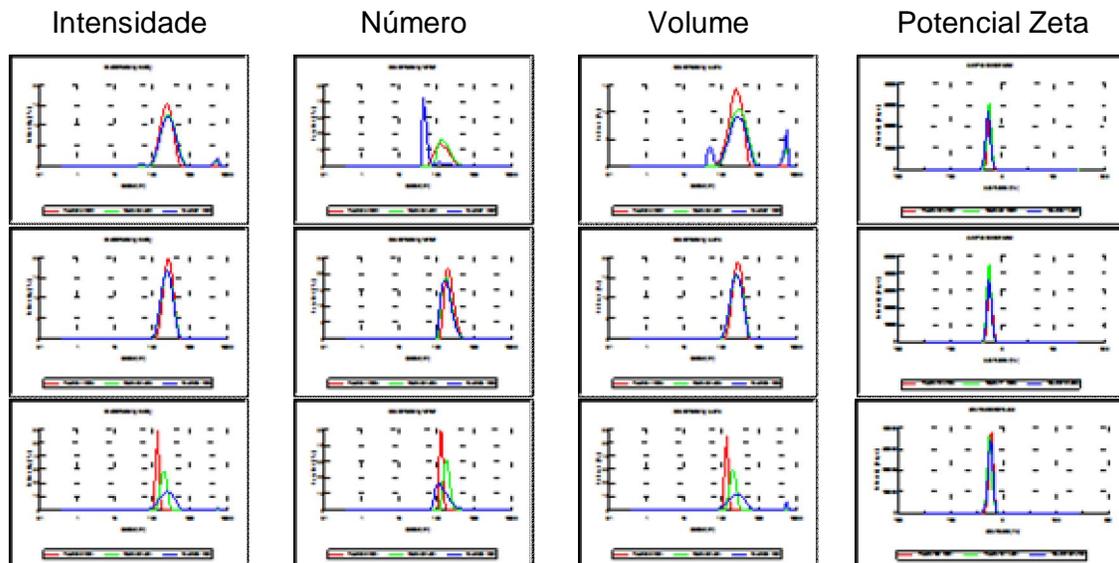


Figura 4: Gráficos de distribuição de partículas por intensidade, número, volume e potencial zeta das amostras NC(An), lotes 1 (linha superior) a 3 (linha inferior).

A formulação NC(Cat) apresentou resultados com maior reprodutibilidade entre os lotes (Tabela 3). O diâmetro médio de 219 nm e o potencial zeta de +15 mV foram considerados satisfatórios, assim como o baixo índice de polidispersão (0,1). Entretanto, não foi possível a obtenção de uma taxa de encapsulação maior do que 22,3 %. O pH médio de  $6,4 \pm 0,4$  foi condizente com o esperado para formulações preparadas pelo mesmo método e matérias-primas similares.

Tabela 3: Características físico-químicas de nanocápsulas de Eudragit RS100 contendo minoxidil [NC(Cat)] preparadas com etanol.

	<b>Diâmetro (nm)</b>	<b>PDI</b>	<b>Potencial Zeta (mV)</b>	<b>Teor (mg/mL)</b>	<b>Taxa de encapsulação (%)</b>	<b>pH</b>
<i>Lote 1</i>	218	0,1	+15	1,06	20,0	6,7
<i>Lote 2</i>	205	0,1	+14	1,00	22,3	6,5
<i>Lote 3</i>	233	0,2	+16	1,07	18,5	6,0
<i>Média</i>	$219 \pm 14$	$0,1 \pm 0,1$	$+15 \pm 1$	$1,04 \pm 0,04$	$20,3 \pm 1,9$	$6,4 \pm 0,4$

Os gráficos de distribuição de partículas de NC(Cat), apresentados na Figura 5, mostraram uma homogeneidade nos lotes, comprovando a existência de um sistema nanométrico estável, assim como demonstram a excelente reprodutibilidade na produção das partículas.

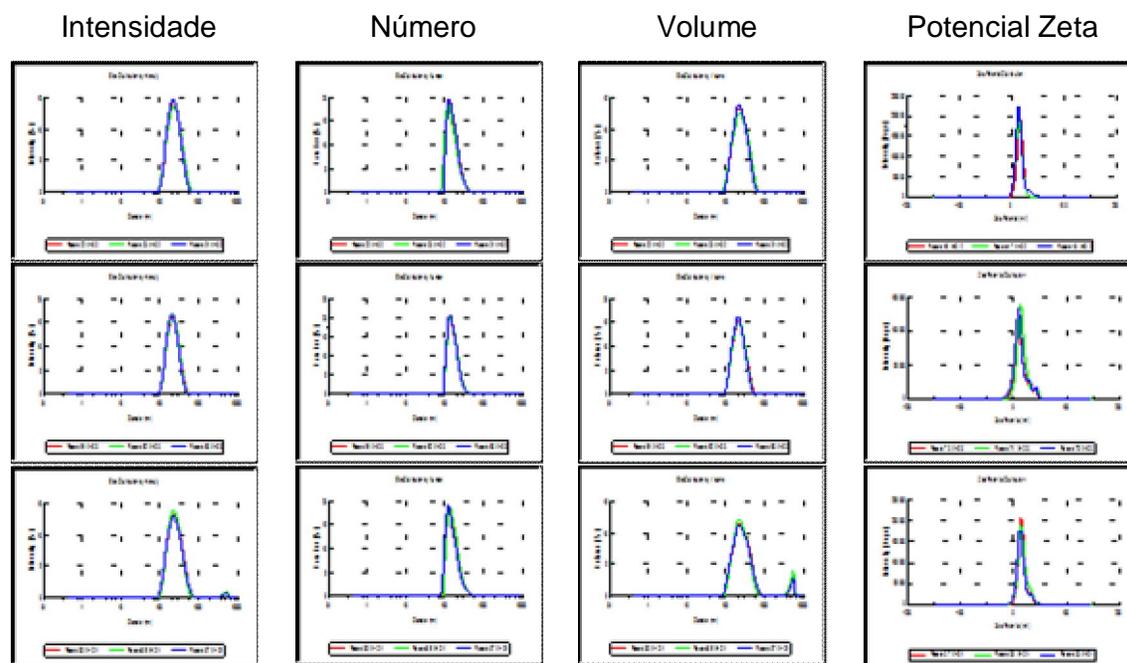


Figura 5: Gráficos de distribuição de partículas por intensidade, número, volume e potencial zeta das amostras NC(Cat), lotes 1 a 3.

Também foram testadas amostras preparadas com acetona no lugar de etanol, sendo que estas tiveram em sua composição o tensoativo monoestearato de sorbitano. As formulações NC(PCL)-S, de superfície não-iônica, apresentaram resultados satisfatórios em termos de caracterização físico-química e distribuição de partículas, com diâmetro médio de 226 nm, baixo índice de polidispersão (0,1) e potencial zeta médio de  $-16$  mV (Tabela 4). Entretanto, uma baixa taxa de encapsulação foi novamente verificada, com alto desvio entre os lotes ( $25,6 \pm 10$  %). Por outro lado, a preparação das partículas apresentou alta reprodutibilidade, o que pode ser observado pelos valores semelhantes obtidos no diâmetro de partícula e potencial zeta.

Tabela 4: Características físico-químicas de nanocápsulas contendo minoxidil e o polímero PCL [NC(PCL)-S], preparadas com acetona.

	Diâmetro (nm)	PDI	Potencial Zeta (mV)	Teor (mg/mL)	Taxa de encapsulação (%)	pH
Lote 1	218	0,1	-18	1,08	18,4	6,9
Lote 2	229	0,1	-16	0,98	36,9	6,5
Lote 3	229	0,1	-15	1,15	21,6	6,3
Média	226 ± 7	0,1 ± 0	-16 ± 2	1,07 ± 0,09	25,6 ± 10	6,6±0,3

As curvas de distribuição de partículas de NC(PCL)-S indicaram uma distribuição unimodal, confirmando seu baixo índice de polidispersão e reprodutibilidade de preparação pela existência de uma única população nos diferentes lotes de formulações (Figura 6).

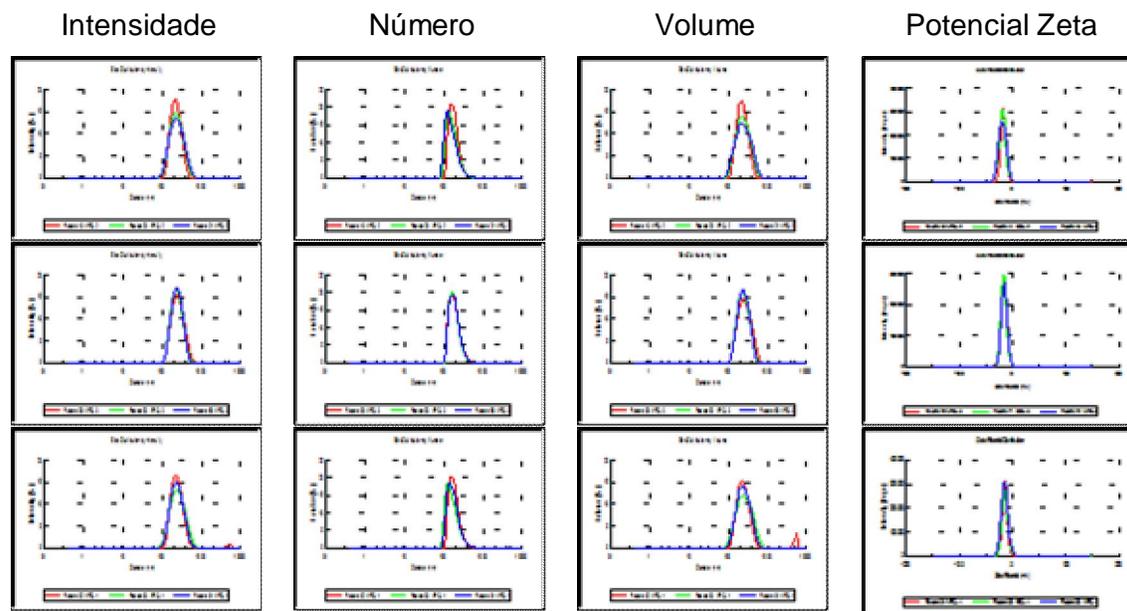


Figura 6: Gráficos de distribuição de partículas por intensidade, número, volume e potencial zeta das amostras NC(PCL)-S, lotes 1 a 3.

As últimas formulações testadas, NC(An)-S, apresentaram diâmetro médio de partícula adequada (264 nm), no entanto a taxa de encapsulação não foi reprodutível entre os 3 lotes (71,5 %, 73,0 % e 40,4 %). Adicionalmente, o índice de polidispersão foi mais elevado ( $0,4 \pm 0,1$ ) do que os valores observados para as formulações anteriormente descritas (Tabela 5).

Tabela 5: Características físico-químicas de nanocápsulas contendo minoxidil e o polímero aniônico Eudragit S-100 [NC(An)-S], preparadas com acetona.

	<b>Diâmetro (nm)</b>	<b>PDI</b>	<b>Potencial Zeta (mV)</b>	<b>Teor (mg/mL)</b>	<b>Taxa de encapsulação (%)</b>	<b>pH</b>
<i>Lote 1</i>	273	0,3	-20	1,06	71,5	5,3
<i>Lote 2</i>	258	0,4	-17	1,06	73,0	5,4
<i>Lote 3</i>	263	0,4	-18	0,99	40,4	5,4
<i>Média</i>	$264 \pm 8$	$0,4 \pm 0,1$	$-18 \pm 2$	$1,04 \pm 0,04$	$61,7 \pm 18$	$5,4 \pm 0,1$

Os gráficos de distribuição de partículas de NC(An)-S (Figura 7) evidenciaram novamente a presença de um sistema dinâmico, como já havia sido observado para a formulação preparada com o mesmo polímero, mas na presença de etanol e sem monoestearato de sorbitano [NC(An)].

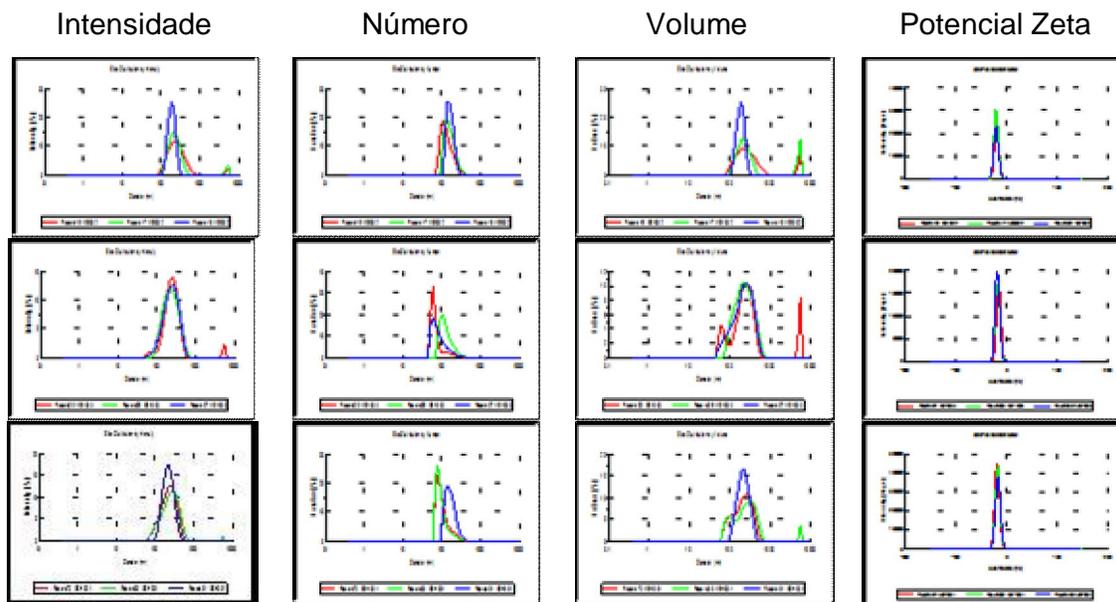


Figura 7: Gráficos de distribuição de partículas por intensidade, número, volume e potencial zeta das amostras NC(An)-S, lotes 1 a 3.

Ao compararmos todas as amostras preparadas, é possível perceber uma boa reprodutibilidade em termos de diâmetro de partículas, com valores inferiores a 300 nm [à exceção de uma das triplicatas de NC(An)]. Os resultados estão de acordo com relatos anteriores, que descrevem a obtenção de nanocápsulas preparadas pelo método de deposição interfacial de polímero pré-formado (COUVREUR *et al.*, 2002; ZILI *et al.*, 2005). Em relação aos teores obtidos, todas as formulações apresentaram valores próximos ao teórico de 1 mg/mL. Entretanto, as maiores variações foram observadas nas taxas de encapsulação, que variaram entre 18,4 % e 73 %.

A formulação NC(An), dentre todas as testadas, foi a que apresentou em média a maior taxa de encapsulação (69,4 %  $\pm$  1,9). O índice de polidispersão foi mais elevado para NC(An) e para NC(An)-S do que para as outras formulações. Os valores de pH de 5,2 e de 5,4 observados para as formulações NC(An) e para NC(An)-S (Tabela 2 e Tabela 5, respectivamente) foram semelhantes e levemente

inferiores do que os determinados para as outras formulações, cujas médias foram de 6,4 e 6,6.

Diferenças nos valores de pH entre formulações preparadas com Eudragit RS 100 [NC(Cat)] e Eudragit S100 [NC(An) e NC(An)-S] podem ser explicadas com base na análise das estruturas químicas destes polímeros. O Eudragit S100 pertence a uma série de copolímeros entéricos desenvolvidos para controle de liberação de fármacos, sendo considerado um polímero com reversível solubilidade pH dependente (OLIVEIRA *et al.*, 2009). Sua estrutura química está demonstrada na Figura 8 (B), evidenciando o grupamento iônico COOH. A proporção entre grupamentos carboxílicos livres e grupos ésteres é de aproximadamente 1:2. O comportamento destes polímeros é dependente do seu estado de protonação: em altos valores de pH, os grupos carboxílicos presentes no Eudragit S100 ionizam-se, ocorrendo uma mudança na sua conformação e uma conseqüente repulsão entre as cargas negativas dos carboxilatos. Já em baixos valores de pH, estes grupamentos não estarão ionizados (OLIVEIRA *et al.*, 2009). Os valores de pH levemente inferiores, determinados para estas formulações, demonstram que a parede das nanocápsulas preparadas com Eudragit S100 está insolúvel na suspensão. No caso do Eudragit RS100 [Figura 8 (A)], trata-se de um copolímero de ésteres dos ácidos acrílico e metacrílico que apresenta 5% de grupamentos amônio quaternário, sendo insolúvel em água. Além disso, possui um perfil de permeação independente do pH do meio e possibilita liberação prolongada, além de um prolongado tempo de residência das nanopartículas em contato com as mucosas (DILLEN *et al.*, 2006; FUJIMORI *et al.* 2005; VERVOORT e KINGET, 1996).

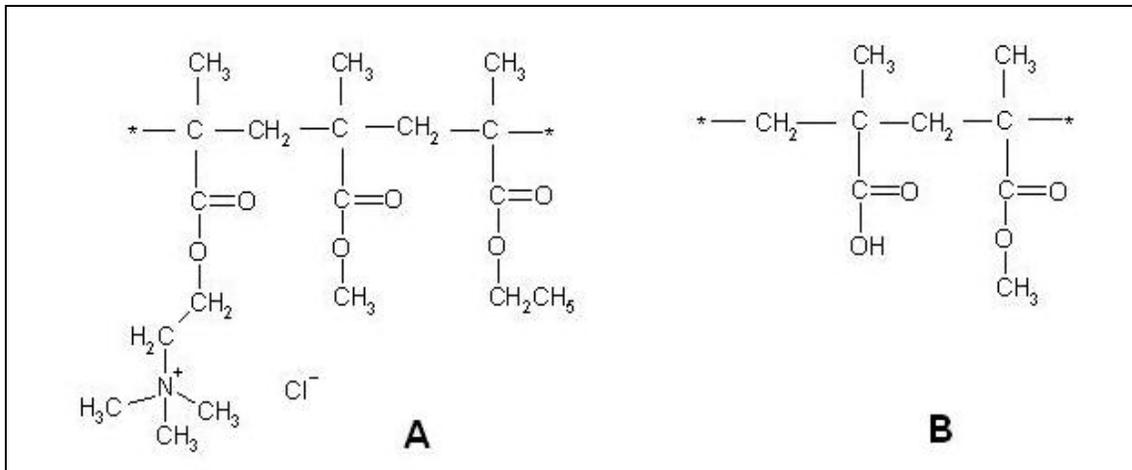


Figura 8: Estruturas químicas do (A) Eudragit RS100 e (B) Eudragit S100.

Ao avaliarmos a amostra NC(PCL)-S, esta foi considerada uma formulação com possível potencial para uso, tendo apresentado diâmetros, PDI, pH, potencial zeta e distribuição de partículas satisfatórios.

NC(Cat) apresentou baixo PDI, que foi o menor dentre todas as amostras preparadas. Já NC(An) e NC(AN)-S mostraram sempre um PDI acima de 0,3, indicando uma possível falta de homogeneidade nos tamanhos das partículas. Índices de polidispersão abaixo de 0,25 indicam uma distribuição restrita do tamanho de partícula e, conseqüentemente, uma adequada homogeneidade do sistema (ALVES *et al.*, 2007).

O potencial zeta reflete o potencial de superfície das partículas, o qual é influenciado pelas mudanças na interface com o meio dispersante, em razão da dissociação de grupos funcionais na superfície da partícula ou da adsorção de espécies iônicas presentes no meio aquoso da dispersão. Fosfolipídeos, poloxamers e os polímeros constituintes das nanopartículas são os principais componentes das formulações capazes de influenciar o potencial zeta. Em módulo, valores relativamente altos são importantes para uma boa estabilidade físico-química da suspensão coloidal, pois grandes forças repulsivas tendem a evitar a agregação em função das colisões ocasionais de nanopartículas adjacentes (SHAFFAZICK *et al.*, 2003). Paralelamente, o uso de poloxamers, polissorbatos e outros polímeros podem

estabilizar os colóides por impedimento estérico, aumentando também a barreira de energia requerida para a agregação. Todas as formulações preparadas apresentaram valores de potencial zeta compatíveis com os respectivos revestimentos (polímero formador da parede das nanocápsulas e polissorbato).

As características de superfície das partículas também podem alterar a resposta biológica do fármaco encapsulado, já que este potencial de superfície pode influenciar a penetração das nanopartículas através da pele e mucosas. Diversos polímeros vêm sendo utilizados com a finalidade de modificar superfícies, tais como sais de quitosana e trimetilquitosana (VALENTA, 2004). Estes polímeros, carregados positivamente, interagem ionicamemente com grupos negativamente carregados presentes no glicocálix, sendo capazes assim de aumentar a permeabilidade paracelular do epitélio com a mucosa intestinal, nasal e bucal por abertura das *tight junctions*. Nos últimos anos, provou-se que as *tight junctions* também ocorrem na camada granular da epiderme (VALENTA, 2004). Com base nestas informações, acredita-se que nanocápsulas com superfície catiônica, preparadas com Eudragit RS100, também possam promover um aumento na penetração percutânea, atuando pelo mesmo mecanismo. Tendo em vista estas considerações e os resultados acima expostos, a formulação de nanocápsulas NC(Cat) foi então selecionada para dar continuidade aos estudos.

### **5.1.3 Estudo da influência da concentração de minoxidil na estabilidade física das nanocápsulas**

Todas as formulações anteriormente descritas foram preparadas visando uma concentração final de minoxidil de 1 mg/mL. Independente da taxa de encapsulação obtida, todas apresentaram um teor experimental próximo ao teórico.

Uma série de formulações NC(Cat) em concentrações crescentes de fármaco (1, 5, 10 e 15 mg/mL) foram então preparadas e caracterizadas, visando a obtenção de nanocápsulas cuja estabilidade permitisse o maior teor de minoxidil

encapsulado. Todas as amostras apresentaram diâmetros, PDI e potencial zeta satisfatórios. Entretanto, verificou-se que, acima de 5 mg/mL, as concentrações obtidas foram bem inferiores às teóricas, evidenciando uma possível sedimentação de nanocristais de minoxidil. Já as taxas de encapsulação variaram conforme a formulação, mantendo-se semelhantes às anteriormente obtidas para NC(Cat) na concentração de 1 mg/mL, inferior no caso da de 5 mg/mL e superiores nas de 10 e 15 mg/mL. Os resultados obtidos estão apresentados na Tabela 6.

Tabela 6: Características físico-químicas de NC(Cat) contendo minoxidil nas concentrações de 1, 5, 10 e 15 mg/mL, no dia 0 e após 14 dias do preparo.

<b>Conc Teórica (mg/mL)</b>	<b>Dia 0</b>					
	<b>Diâmetro (nm)</b>	<b>PDI</b>	<b>Potencial Zeta (mV)</b>	<b>Teor (mg/mL)</b>	<b>Taxa de encapsulação (%)</b>	<b>pH</b>
1	180	0,1	+17	0,93	19,7	6,4
5	187	0,1	+15	3,48	9,6	6,7
10	188	0,1	+14	7,01	62,8	6,5
15	199	0,1	+16	7,59	68,3	6,0
<b>Conc Teórica (mg/mL)</b>	<b>Dia 14</b>					
	<b>Diâmetro (nm)</b>		<b>PDI</b>		<b>Teor (mg/mL)</b>	
1	191		0,1		0,95	
5	194		0,1		2,67	
10	190		0,1		3,63	
15	202		0,1		3,45	

Estas mesmas amostras foram analisadas novamente após 14 dias do preparo (Tabela 6). A amostra NC(Cat) preparada com a concentração teórica de 1 mg/mL manteve seu diâmetro, teor e PDI estáveis durante o período de armazenagem. Entretanto, verificou-se que as amostras de NC(Cat) preparadas teoricamente com 5, 10 e 15 mg/mL apresentaram uma diminuição significativa nos seus teores, embora seus diâmetros e PDI tenham permanecido estáveis. Estas observações foram confirmadas estatisticamente, onde estas amostras apresentaram diferença significativa para teor (Teste-t,  $p < 0,05$ ). Todavia, não houve

diferença estatística significativa para diâmetro e PDI, com exceção da amostra preparada com 15 mg/mL. Pôde-se concluir, então, que as formulações NC(Cat) preparadas com concentrações teóricas de minoxidil maiores que 5 mg/mL não são adequadas para a continuidade do trabalho.

POHLMANN e colaboradores (2008) demonstraram que o processo de encapsulação de fármacos lipofílicos em nanopartículas pode formar simultaneamente nanopartículas poliméricas e nanocristais do fármaco, quando o sistema é supersaturado. Uma correlação entre a variação na intensidade de espalhamento de luz e um decréscimo no teor de fármaco foi evidenciada, em amostras estocadas sem agitação (imóveis), nas quais são relatadas a presença de nanocristais. Logo, quando as formulações são supersaturadas, os nanocristais formados durante o preparo sofrem aglomeração e precipitam durante o armazenamento. Para verificar a hipótese da presença de nanocristais em NC(Cat), uma alíquota da formulação foi observada em microscópio óptico. Esta análise mostrou a ausência deste tipo de estrutura nas amostras NC(Cat).

A partir destes resultados, foram então preparadas e caracterizadas amostras NC(Cat) contendo minoxidil nas concentrações teóricas de 2 e 3 mg/mL (Tabela 7).

Tabela 7: Características físico-químicas de NC(Cat) contendo minoxidil nas concentrações de 2 e 3 mg/mL.

<b>Conc Teórica. (mg/mL)</b>	<b>Diâmetro (nm)</b>	<b>PDI</b>	<b>Potencial Zeta (mV)</b>	<b>Teor (mg/mL)</b>	<b>Taxa de encapsulação (%)</b>	<b>pH</b>
2	169	0,1	+13	2,05	20,5	6,8
3	175	0,1	+12	3,02	21,2	6,8

Tanto a amostra NC(Cat) preparada teoricamente com 2 mg/mL como a preparada teoricamente com 3 mg/mL mostraram teores de fármaco estáveis, demonstrando a recuperação total do fármaco após dissolução dos sistemas. Essas formulações NC(Cat) apresentaram diâmetros médios entre 160 e 180 nm, índice de

polidispersão de 0,1, potencial zeta entre +12 e +13 mV e taxa de encapsulação em torno de 20 %.

#### **5.1.4 Estudo da estabilidade acelerada por espalhamento múltiplo de luz**

O estudo da estabilidade acelerada por espalhamento múltiplo de luz foi então realizado nas amostras de NC(Cat) preparadas com concentrações teóricas de minoxidil de 1, 2 ou 3 mg/mL. Comparado a outros métodos de análise de partículas, como medidas de diâmetro, potencial zeta e microscopia, este apresenta a vantagem de analisar diretamente sistemas concentrados, sem necessidade de diluição prévia (TURBISCAN, 1996) e de forma mais rápida, fácil e segura do que por observação visual do analista.

Os gráficos de variação de *backscattering* após análise das 3 amostras estão apresentados na Figura 9. São analisados os gráficos de variação de *backscattering* no caso dos valores de transmissão inferiores à 0,2 %. Como as três amostras analisadas mostraram valores inferiores à 0,2 %, somente os gráficos de variação de *backscattering* são apresentados.

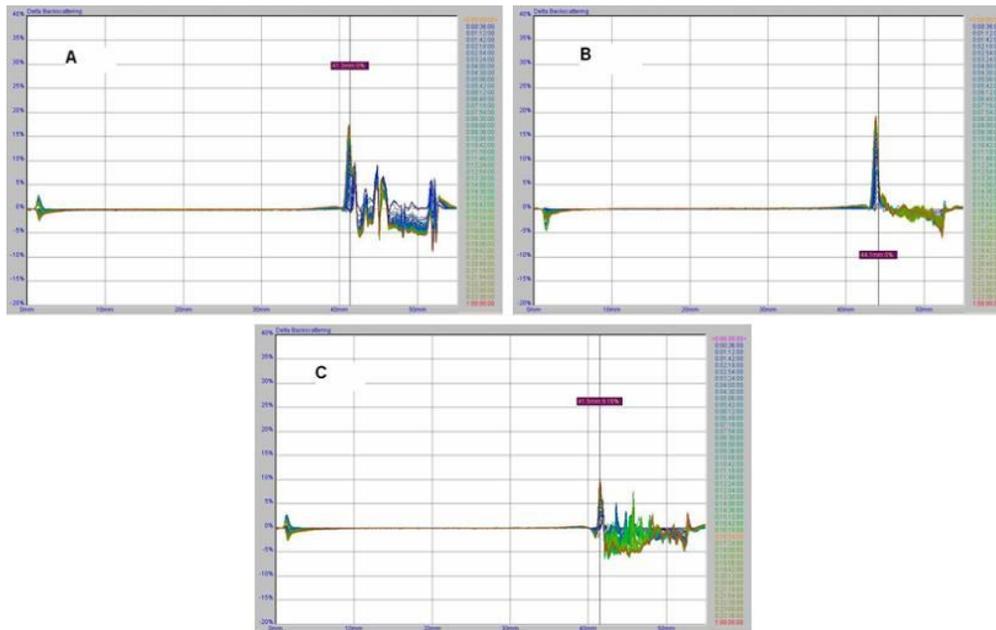


Figura 9: Gráficos de variação de *backscattering* das suspensões de nanocápsulas: NC(Cat) 1 mg/mL (A), NC(Cat) 2 mg/mL (B) e NC(Cat) 3 mg/mL (C).

Nos gráficos de variação de *backscattering*, a parte esquerda refere-se à base da cubeta de análise e a direita ao topo da mesma. Os fenômenos de instabilidade, como cremagem, floculação, sedimentação ou coalescência, podem ser visualizados na base, no topo ou no centro da cubeta, através da observação do aumento ou diminuição na variação de *backscattering*.

Os resultados obtidos mostram que as três formulações são relativamente estáveis, com leve tendência à cremagem, evidenciada no aumento de *backscattering* acima de 40 mm. Este fenômeno físico indica uma migração de partículas no sistema, que pode levar à alteração na homogeneidade da dispersão ao longo do tempo devido à sua menor densidade que a densidade do meio. O processo de cremagem ocorre quando as partículas dispersas flutuam em relação à fase contínua, tornando as porções superiores mais opacas (ROLAND *et al.*, 2003). Na Figura 9 [(A) e (C)] pode-se perceber ainda uma tendência à sedimentação, visualizada na base da cubeta, que poderia indicar a presença de outro tipo de

partículas concomitantemente, que são mais densas que o meio. O fenômeno de sedimentação normalmente é determinado por características como tamanho, interação partícula-partícula, densidade de partículas, ou ainda condições físico-químicas ou hidrodinâmicas (AZEMA, 2006).

Um estudo de estabilidade convencional de bancada foi realizado em uma amostra da formulação NC(Cat) contendo 3 mg/mL de minoxidil (Tabela 8). Os resultados foram condizentes com os obtidos no estudo de estabilidade acelerada, onde se verificou que o tamanho das partículas não sofreu alteração significativa durante a análise. A formulação apresentou diâmetro, potencial zeta e PDI estáveis durante o período de 240 dias.

Tabela 8: Características físico-químicas de NC(Cat) 3 mg/mL nos dias 0, 120 e 240.

<b>Característica</b>	<b>Dia 0</b>	<b>Dia 120</b>	<b>Dia 240</b>
<i>Diâmetro (nm)</i>	175	188	174
<i>Potencial Zeta (mV)</i>	+12	+10	+12
<i>PDI</i>	0,14	0,12	0,16

Os gráficos de distribuição de partículas também não apresentaram variações significativas no período de armazenagem (dia 0, 120 e 240), durante o qual permaneceu à temperatura ambiente e ao abrigo da luz (Figura 10).

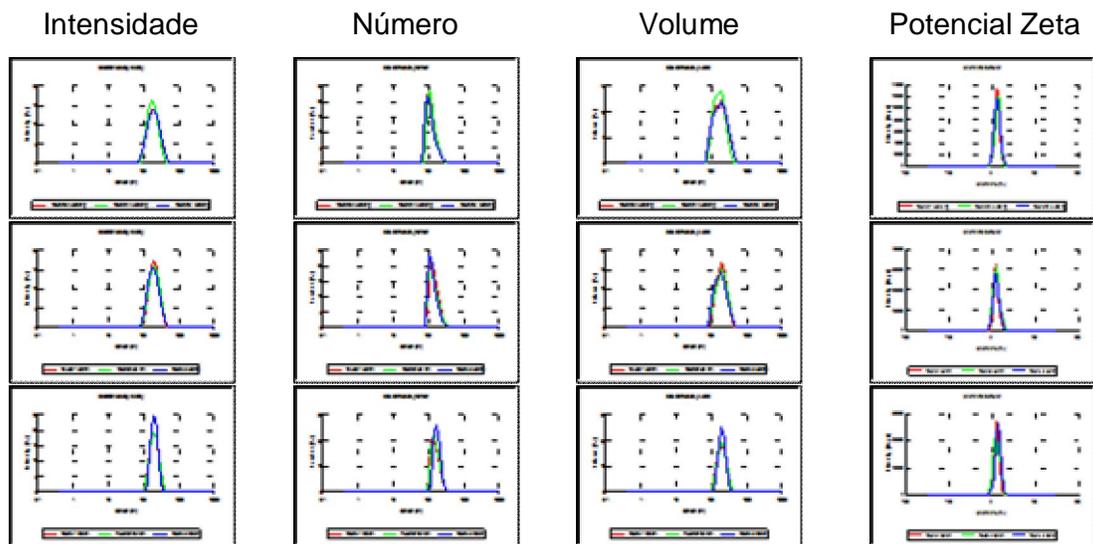


Figura 10: Gráficos de distribuição de partículas por intensidade, número, volume e potencial zeta da amostra NC(Cat) 3 mg/mL, nos dias 0 (linha superior), 120 (linha central) e 240 (linha inferior).

Dados da literatura (USP 27) indicam que o minoxidil é ligeiramente solúvel em água. A solubilidade do minoxidil na fase aquosa das nanocápsulas foi então determinada experimentalmente, encontrando-se um valor de 2,45 mg/mL. Desta forma, a formulação NC(Cat) 3 mg/mL que apresentou-se estável com taxa de encapsulação em torno de 20 % tem 2,45 mg de fármaco solubilizados na fase aquosa da formulação. A saturação da fase aquosa levou ao equilíbrio de 20 % encapsulado e 80 % solubilizados. É possível que o minoxidil esteja fracamente adsorvido à matriz polimérica, estando na interface com a fase aquosa. Parte do fármaco que é solúvel passa através do filtro no processo de ultrafiltração-centrifugação, podendo ser quantificado no ultrafiltrado.

Diante dos resultados apresentados, a formulação NC(Cat) preparada com concentração teórica de minoxidil de 3 mg/mL foi selecionada para o estudo biológico por ter diâmetro estável entre diferentes medidas consecutivas do mesmo lote, assim como entre diferentes lotes. Adicionalmente, a formulação apresentou estabilidade física de diâmetro, PDI, pH, potencial zeta e teor de fármaco. Apesar de apresentar uma taxa de encapsulação em torno de 20 %, o

caráter catiônico da superfície das partículas pode vir a ser uma vantagem adicional em termos de aplicação tópica, devido as suas características de mucoadesividade já relatadas na literatura (ANDREWS *et al.*, 2009; CUI *et al.*, 2006; NAGARWAL *et al.*, 2009).

## **5.2 Avaliação biológica do crescimento de pêlos em camundongos previamente depilados**

O estudo biológico comparativo do crescimento de pêlos foi realizado utilizando como modelo animal camundongos machos C57BL/J. Estes foram previamente depilados na véspera do início do experimento. Por tratar-se de uma formulação para uso capilar, optou-se pelo uso das nanopartículas na forma líquida, sem qualquer tipo de espessamento com bases semi-sólidas. As formulações do grupo controle negativo [NC(Cat) sem fármaco], controle positivo (solução aquosa de sulfato de minoxidil 4,26 mg/mL<sup>1</sup>) e formulação teste [NC(Cat) 3 mg/mL] foram aplicadas diariamente, por 21 dias.

Na Figura 11 estão apresentados os animais no dia zero, após a depilação. Pode-se verificar que alguns animais apresentaram sombras que foram consideradas como pêlo em fase anágena (fase de crescimento). Essas áreas mostraram um crescimento mais acelerado, que, no entanto não interferiram no andamento do experimento.

Ao longo do experimento, os animais foram classificados conforme a escala de crescimento definida (Tabela 9). Apesar da presença de sombras em alguns animais, verificadas no momento da depilação, todos foram considerados como tendo pele lisa sem pêlos no dia zero. Até o dia 10 não foi possível visualizar nenhuma diferença significativa entre os grupos, já que todos os animais apresentaram crescimento leve a esparso de pêlos. Entretanto, após 14 dias,

---

<sup>1</sup> Determinada por ensaios preliminares de Karl-Fischer, UV-Vis e HPLC.

percebeu-se um grande aumento no crescimento de pêlos em todos os grupos, sendo que este foi muito mais evidente no grupo das nanocápsulas, como pode ser visto na Figura 12. Em vista disso, para uma melhor visualização do efeito das formulações testadas, somente serão apresentadas as fotografias dos dias 0 e 14. O acompanhamento da evolução individual de cada animal ao longo dos 21 dias pode assim ser feito através da análise da Tabela 9.

Tabela 9: Classificação do crescimento de pêlos ao longo de 21 dias.

<b>Classificação</b>	<b>Grupo Controle Negativo (C-)</b>	<b>Grupo Controle Positivo (C+)</b>	<b>Grupo Teste (NC)</b>
<i>Dia 0</i>	0 0 0 0 0 0	0 0 0 0 0 0	0 0 0 0 0 0
<i>Dia 3</i>	0 0 0 0 1 1	2 0 1 0 2 0	1 1 0 0 1 1
<i>Dia 7</i>	0 1 1 1 2 2	3 1 1 0 2 0	1 1 0 0 1 1
<i>Dia 10</i>	1 1 1 1 2 2	4 1 1 0 2 0	1 1 0 0 1 1
<i>Dia 14</i>	5 5 1 1 2 2	5 2 4 4 3 4	4 5 5 5 5 5
<i>Dia 17</i>	5 5 1 2 3 2	5 3 5 4 3 4	5 5 5 5 5 5
<i>Dia 21</i>	5 5 2 2 3 3	5 4 5 5 4 5	5 5 5 5 5 5

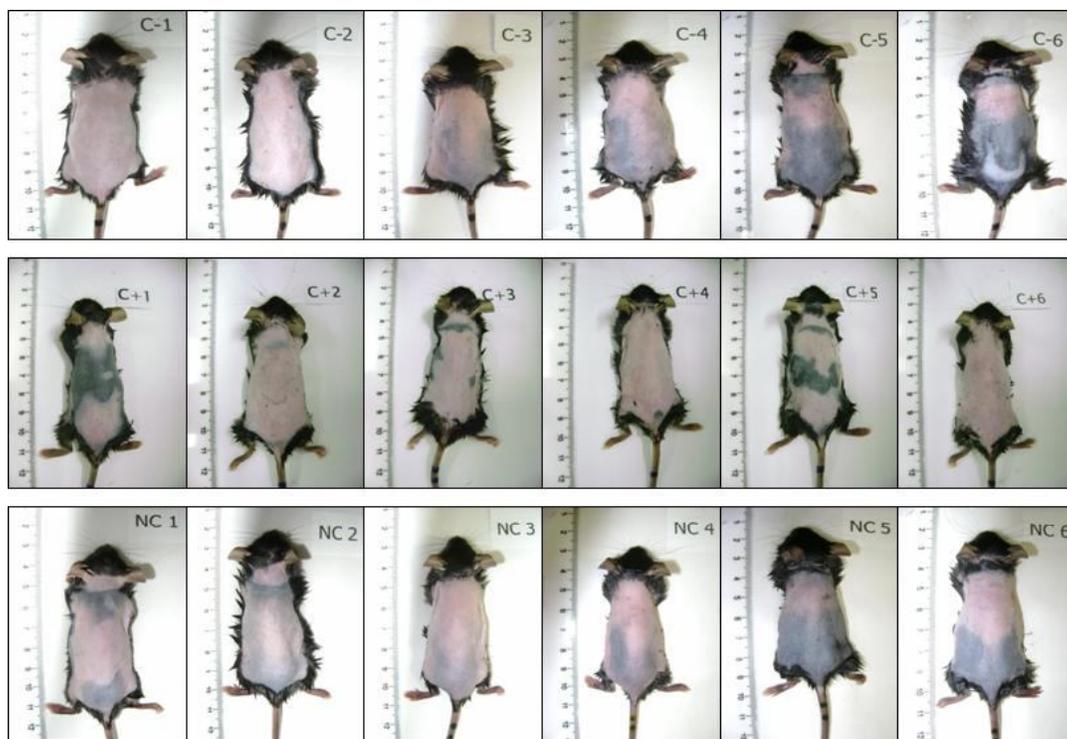


Figura 11: Dia zero, após depilação. Grupo controle negativo (C-, linha superior), grupo controle positivo (C+, linha central) e grupo teste (NC, linha inferior).

No grupo Controle Negativo, o crescimento dos pêlos foi visivelmente inferior aos demais grupos. Em 14 dias de experimento, à exceção de 2 animais, que também apresentaram o rápido crescimento entre os dias 10 e 14, os demais animais mostraram pêlos em estado inicial (1) ou pêlo curto visível (2). Já no grupo Controle Positivo, somente 1 animal apresentou completo crescimento de pêlos (5), sendo que os outros tiveram um pêlo longo, mas variando entre esparso (3) ou denso (4). Os melhores resultados foram obtidos no grupo das nanocápsulas, em que 5 dos animais apresentaram completo crescimento de pêlos e apenas 1 mostrou pêlos longos densos.

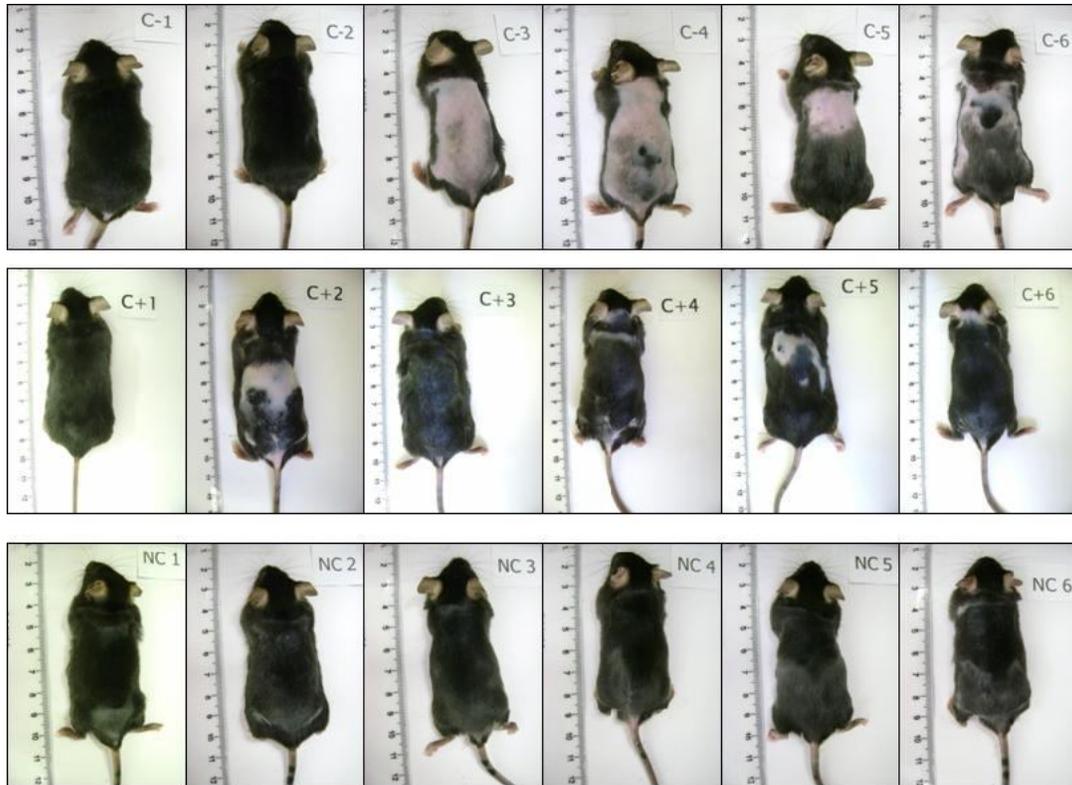


Figura 12: Após 14 dias de tratamento. Grupo controle negativo (C-, linha superior), grupo controle positivo (C+, linha central) e grupo teste (NC, linha inferior).

JUN-BO e colaboradores (2007) avaliaram o efeito de etossomas de minoxidil (sistemas vesiculares lipídicos com relativamente alta concentração de etanol) na liberação dérmica e no ciclo capilar de camundongos C57BL. Após 18 dias de tratamento, pêlos cresceram na pele do grupo tratado com os etossomas, sendo que no grupo controle com solução de minoxidil os pêlos ainda não haviam atingido a superfície, embora a coloração da pele começasse a escurecer. A pele dorsal do grupo branco permanece rosada. Análises histológicas dessas peles indicaram que, no grupo tratado, os folículos pilosos aumentaram, e a papila capilar tornou-se completamente rodeada por bulbos capilares.

TOUITOU e colaboradores (2000), ao sugerirem este novo modelo de sistema, realizaram também teste *in vitro* de liberação de etossomas de minoxidil, encontrando uma significativa diferença estatística de permeação entre estes e as 3 formulações controle, todas contendo 0,5 % de minoxidil (solução

etanólica de fosfolídeos, solução etanólica a 30 % e etanol absoluto).

Em estudo biológico e de penetração cutânea, SHIM e colaboradores (2004) comprovaram que nanopartículas facilitam a penetração do minoxidil. Entretanto, no experimento *in vivo*, não foram encontradas diferenças significativas entre as nanopartículas e os grupos controle. A hipótese dos autores, de que a fina espessura do estrato córneo e da pele de camundongos C57BL sejam as causas da diminuição das diferenças *in vivo*, poderia ser questionada com os resultados encontrados neste presente trabalho.

As nanopartículas com superfície catiônica testadas mostraram-se eficientes para o crescimento de pêlos, em um curto período de 14 dias. Este crescimento foi mais acelerado do que ambos os grupos controle, evidenciando o vantajoso efeito farmacológico das nanocápsulas, além de uma possível redução no risco de reações cutâneas indesejadas, já que estas são geralmente causadas pelo veículo hidroalcoólico ou pelo co-solvente propilenoglicol, que são componentes das formulações convencionais.

### **5.3 Detecção de minoxidil nas amostras de plasma**

Visando confirmar que o método analítico já validado apresentava resultados reprodutíveis e confiáveis para a quantificação de minoxidil em plasma, o parâmetro de exatidão foi avaliado por meio de amostras com quantidades conhecidas do analito em questão (FDA, 2001).

A

Tabela 10 demonstra as faixas de concentração e as concentrações médias determinadas, bem como a exatidão em relação às concentrações teóricas.

Tabela 10: Avaliação da exatidão do método analítico de doseamento do minoxidil em plasma (n = 9)

Concentração teórica (µg/mL)	Faixa de conc. determinada (µg/mL)	Média (µg/mL)	D.P.	Exatidão (%)
5,0	4,3 – 4,3	4,3	0,0	85,1 – 85,2
10,0	9,1 – 10,8	9,7	1,0	90,5 – 108,3
30,0	27,1 – 31,4	29,1	2,1	90,3 – 104,6

A FDA preconiza que a variação entre o valor real e o valor teórico das amostras deve se manter em torno de 15 % para um mínimo de 5 determinações (FDA, 2001). Pode-se observar que a exatidão calculada para as amostras não apresentou variação superior a 15 %, indicando que o método é exato para a faixa de concentração analisada.

As amostras de plasma de cada grupo coletadas ao final do experimento foram então analisadas, em triplicata, conforme metodologia descrita no item 4.2.3.3 (n=18 por grupo). Os animais do grupo controle positivo apresentaram níveis de minoxidil abaixo do limite de detecção (0,3 µg/mL), sendo possível perceber a existência de proeminências, no tempo de retenção do fármaco, em 8 amostras, havendo ausência nas restantes. Já nos animais do grupo teste (NC), os cromatogramas apontaram a existência de minoxidil em todas as amostras, sendo que somente uma amostra (NC 2, com 0,45 µg/mL) apresentou níveis entre o limite de detecção e o de quantificação. Resultados semelhantes foram obtidos por MIYAZAKI e colaboradores (2003), que avaliaram a capacidade de liberação sistêmica de nanocápsulas contendo indometacina e poli(cianoacrilato de *n*-butila) (PNBCA). Foram encontrados maiores níveis plasmáticos de indometacina após 6 h da aplicação tópica, confirmando o que já havia sido observado pelos autores em ensaio de permeação *in vitro*. Estes resultados mostraram que, ao contrário esperado, a aplicação das nanopartículas aumentou a disponibilidade sistêmica da indometacina. Os autores sugerem que nanocápsulas de PNBCA, devido ao seu tamanho de partícula e características hidrofílicas e hidrofóbicas de superfície, podem penetrar através do estrato córneo e da epiderme, alcançando a circulação sanguínea. HAGENS e colaboradores (2007) relatam diversos estudos que sugerem

a permeabilidade da pele a nanomateriais com distintas propriedades físico-químicas (tamanho, forma, carga, material). Estes estudos reportam dados indicando que a migração de nanopartículas através da pele é possível, especialmente quando uma fricção mecânica é aplicada na pele, podendo alcançar a circulação sistêmica (HAGENS *et al.*,2007; CEVC, 2004).

Por outro lado, a influência da superfície das partículas no processo de absorção transdérmica foi analisada por KOHLI e ALPAR (2004), onde partículas de látex negativamente carregadas (diâmetros entre 50 e 500 nm) foram capazes de penetrar a epiderme, o que não ocorreu com partículas de superfície neutra ou positiva. Entretanto, os próprios autores reconhecem que os resultados encontrados são contraditórios aos preceitos de seletividade de penetração da pele, já que esta, por apresentar cargas negativas, favoreceria a passagem de espécies catiônicas. Esta seletividade foi também demonstrada por MARRO e colaboradores (2001), ao estudarem as propriedades de permeação iontoforéticas da pele humana e de porco.

No presente trabalho, objetivou-se desenvolver uma formulação de nanocápsulas contendo minoxidil para o uso tópico no tratamento da calvície. Diferentes formulações foram preparadas e caracterizadas, através de variações nos componentes, já que estas alterações poderiam afetar a atividade farmacológica do minoxidil nanoencapsulado. A formulação NC(Cat), preparada sem monoestearato de sorbitano e com Eudragit RS 100, foi então selecionada para o estudo biológico, mostrando excelentes resultados quando comparada aos grupos controle. Foi possível também detectar o minoxidil em amostras de plasma do grupo tratado, o que indica que provavelmente as nanocápsulas foram capazes de penetrar no folículo piloso e liberar o minoxidil nas camadas mais profundas da pele e/ou, ainda, provavelmente serem captadas pelas células dendríticas sendo absorvidas sistemicamente.

## 6 CONCLUSÕES

- Foi possível obter suspensões de nanocápsulas com diferentes superfícies iônicas e contendo minoxidil, preparadas pelo método de deposição interfacial do polímero pré-formado, apresentando diâmetros médio de partícula nanométricos e índices de polidispersão abaixo de 0,2. A formulação selecionada para os ensaios biológicos apresentou partição de minoxidil entre as nanocápsulas e a fase aquosa, sendo a taxa de encapsulação de 20 %.
- No estudo para o aumento da taxa de encapsulação da formulação NC(Cat), as formulações preparadas com concentrações de minoxidil de 5, 10 e 15 mg/mL mostraram teores totais muito inferiores a 100 % logo após preparo, com decaimento elevado após 14 dias. No caso das suspensões preparadas com concentrações de fármaco de 1, 2 e 3 mg/mL, os teores foram de aproximadamente 100 % e a taxa de encapsulação foi similar para todas as formulações (20 %).
- As análises de retroespalhamento, através de Turbiscan LAb® demonstraram que NC(Cat), preparadas com concentrações de fármaco de 1, 2 e 3 mg/mL, apresentam-se satisfatoriamente estáveis.
- O estudo biológico realizado para verificar o re-crescimento de pêlos em camundongos apresentou excelentes resultados no grupo teste (NC), quando comparado aos grupos controle positivo (C+) e negativo (C-). O crescimento foi visualmente mais acelerado e praticamente completo em apenas 14 dias, o que não ocorreu nos grupos controle.
- As amostras de plasma coletadas ao término do experimento sugerem a absorção sistêmica do minoxidil nos animais do grupo NC. Entretanto, os baixos valores encontrados foram inferiores ao limite de quantificação. Nas amostras do grupo C+, alguns animais mostraram evidências de absorção, porém com valores muito abaixo do limite de detecção.

- A avaliação do conjunto dos resultados obtidos demonstra que a formulação NC(Cat) apresenta excelente ação farmacológica, sendo potencialmente aplicável no tratamento tópico da calvície, como alternativa às soluções de minoxidil atualmente comercializados.

## **PERSPECTIVA**

Verificar a eficácia da formulação NC(Cat) após aplicação de doses menores e/ou alteração de protocolo de tratamento para aplicação da dose em dias alternados, visando diminuir a absorção sistêmica de minoxidil.

## 7 REFERÊNCIAS

ADAMS, A. I. H. Desenvolvimento de métodos alternativos para controle de qualidade do cetoconazol, flutamida, minoxidil e cloridrato de sertralina em farmácias de manipulação. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, UFRGS, 2001.

ALVAREZ-ROMÁN, R.; NAIK, A.; KALIA, Y.; GUY, R.; FESSI, H. Skin penetration and distribution of polymeric nanoparticles. **Journal of Controlled Release**, v. 99, p. 53-62, 2004.

ALVES, M. P.; SCARRONE, A. L.; SANTOS, M.; POHLMANN, A. R.; GUTERRES, S. S. Human skin penetration and distribution of nimesulide from hydrophilic gels containing nanocarriers. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 341, p. 215-220, 2007.

ANDREWS, G. P.; LAVERTY, T. P.; JONES, D. S. Mucoadhesive polymeric platforms for controlled drug delivery. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 71, p. 505-518, 2009.

AZEMA, N. Sedimentation behaviour study by three optical methods – granulometric and electrophoresis measurements, dispersion optical analyser. **Powder Technology**, v. 165, p. 133-139, 2006.

AZULAY & AZULAY. **Dermatologia**. 2ª Edição Revisada e Ampliada. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan S.A., 1999. p. 433-438.

BARRATT, G. Colloidal drug carriers: achievements and perspectives. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 560, p. 21-37, 2003.

BODMEIER, R.; MAINCENT, P. In: LIEBERMAN, H. A.; RIEGER, M. M.; BANKER, G. S. (Ed.) **Pharmaceutical Dosage Forms: Disperse Systems**. New York: Marcel Dekker, Inc., 1998. p. 87-127.

BONNETBLANC, J.-M. Item 288 – Troubles des phanères: alopecie. **Annales de dermatologie et de vénéréologie**, v. 135S, p. F200-F204, 2008.

BP 1999. **British Pharmacopoeia**. London: The Stationery Office, 1999. Vol. 1. p. 992-993

BRASIL. Resolução – RE nº 899, de 29 de maio de 2003. Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos. Diário Oficial [da República Federativa do Brasil], Brasília, DF, 02/06/2003.

CASH, T. F. The psychology of hair loss and its implications for patient care. **Clinics in Dermatology**, v. 19, p. 161-166, 2001.

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

CHEN, C.-H.; SHEU, M.-T.; WU, A.-B.; LIN, K.-P.; HO, H.-O. Simultaneous effects of tocopheryl polyethylene glycol succinate (TPGS) on local hair growth promotion and systemic absorption of topically applied minoxidil in a mouse model. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 306, p. 91-98, 2005.

COSAT- UFRGS. PGR - Plano de Gerenciamento de Resíduos. Porto Alegre, 2007. Disponível em: <<http://www.ufrgs.br/farmacia/cosat>>, acesso em 10/08/2007.

COUVREUR, P.; DUBERNET, C.; PUISIEUX, F. Controlled drug delivery with nanoparticles: current possibilities and future trends. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, Vol. 41, n. 1, p. 2-13, 1995.

COUVREUR, P.; GILLIAN, B.; FATTAL, E.; LEGRAND, P.; VAUTHIER, V. Nanocapsule Technology: A Review. **Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems**, v. 19, n. 2, p. 99-134, 2002.

CRUZ, L. Estudo físico-químico comparativo de sistemas nanoestruturados contendo indometacina ou seu éster etílico e avaliação *In Vivo* da atividade antiedematogênica. 2005. 109p. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas). Curso de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre.

CRUZ, L.; SOARES, L. U.; DALLA COSTA, T.; MEZZALIRA, G.; SILVEIRA, N. P.; GUTERRES, S. S.; POHLMANN, A. R. Diffusion and mathematical modeling of release profiles from nanocarriers. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 313, p. 198-205, 2006.

CUI, F.; QIAN, F.; YIN, C. Preparation and characterization of mucoadhesive polymer-coated nanoparticles. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 316, p. 154-161, 2006.

DEVISSAGUET, J-P.; SEINE, N.; FESSI, H.; PUISIEUX, F.; ALFORT, M. Process for the preparation of dispersible colloidal systems of a substance in the form of nanocapsules. **US Patent**, n. PI 5049322, 17 sep., 1991.

DILLEN, K.; VANDERVOORT, J.; VAN DER MOOTER, G.; LUDWIG, A. Evaluation of ciprofloxacin-loaded Eudragit<sup>®</sup> RS100 or RL100/PLGA nanoparticles. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 314, p. 72-82, 2006.

DU VIVIER, A. **Dermatologia prática**. 1<sup>a</sup> Edição. São Paulo: Editora Manole Ltda, 1996. p. 211-217.

FDA. Guidance for Industry. **Bioanalytical Method Validation**. May 2001. Disponível em: <<http://www.fda.gov/cder/guidance/4252fnl.htm>>, acesso em 12/01/2009.

FERRY, J. J.; SHEPARD, J. H.; SZPUNAR, G. J. Relationship between contact time of applied dose and percutaneous absorption of minoxidil from a topical solution. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v.79, n. 6, p. 483-486, 1990.

FESSI, H.; PUISIEUX, F.; DEVISSAGUET, J-P. Procédé de préparation de systèmes colloïdaux dispersibles d'une substance sous forme de nanocapsules. **European Patent**, 0274961 A1, 1988.

FESSI, H.; PUISIEUX, F.; DEVISSAGUET, J-P.; AMMOURY, N.; BENITA, S. Nanocapsules formation by interfacial polymer deposition following solvent displacement. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 55, p. 25-28, 1989.

FRIEDMAN, E. S.; FRIEDMAN, P. M.; COHEN, D. E.; WASHENIK, K. Allergic contact dermatitis to topical minoxidil solution: Etiology and treatment. **Journal of American Academy of Dermatology**, v. 46, n. 2, p. 309-312, 2002.

FUJIMORI, J.; YOSHIHASHI, Y.; YONEMOCHI, E.; TERADA, K. Application of Eudragit RS to thermo-sensitive drug delivery systems. II. Effect of temperature on drug permeability through membrane consisting of Eudragit RS/PEG 400 blend polymers. **Journal of Controlled Release**, v. 102, p.49-57, 2005.

GUTERRES, S.S. Étude pharmacotechnique, pharmacocinetique et de tolerances digestive et tissulaire des nanocapsules de diclofenac. Paris: Faculté de Pharmacie de Chatenay-Malabry, 1995. Tese (Doutorado em Farmácia).

GUTERRES, S. S.; ALVES, M. P.; POHLMANN, A. R. Polymeric nanoparticles, nanospheres and naocapsules for cutaneous applications. **Drug Target Insights**, v. 2, p. 1-11, 2007.

GUZZO, C. Distúrbios dos Cabelos. In: BONDI, JEGASOTHY & LAZARUS. **Dermatologia: diagnóstico e tratamento**. Porto Alegre: Editora Artes Médicas, 1993. Cap. 16. p. 347-363.

HAGENS, W. I.; OOMEN, A. G.; DE JONG, W. H.; CASSEE, F. R.; SIPS, A. J. A. M. What do we (need to) know about the kinetic properties of nanoparticles in the body? **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v. 49, p. 217-229, 2007.

HARDMAN, J. G.; LIMBIRD, L. E. (Ed). **Goodman & Gilman. As bases farmacológicas da terapêutica**. 10<sup>a</sup> Edição. Rio de Janeiro: McGraw-Hill Interamericana, 2003. p. 669-670.

HORDINSKY, M. K. Alopecias. In: BOLOGNIA, J. L.; JORIZZO, J. L.; RAPINI, R. P. **Dermatology**. 1<sup>a</sup> Edição. Toronto: Editora Mosby, 2003. Cap. 69. p.1033-1050.

ICH Guideline. Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology. United States of America, 2005. Disponível em: <<http://www.ich.org/cache/compo/363-272-1.html#Q2A>>, acesso em 15/12/2007.

JÄGER, A.; STEFANI, V.; GUTERRES, S. S.; POHLMANN, A. R. Physico-chemical characterization of nanocapsule polymeric wall using fluorescent benzazole probes. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 338, p. 297-305, 2007.

JUN-BO, T.; ZHUANG-QUN, Y.; XI-JING, H.; YING, X.; YONG, S.; ZHE, X.; TAO, C. Effect of ethosomal minoxidil on dermal delivery and hair cycle of C57BL/6 mice. **Journal of Dermatological Science**, v. 45, p. 135-137, 2007.

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

- KOHLI, A. K. e ALPAR, H. O. Potential use of nanoparticles for transcutaneous vaccine delivery: effect of particle size and charge. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 275, p. 13-17, 2004.
- LADEMANN, J.; RICHTER, H.; TEICHMANN, A.; OTBERG, N.; BLUME-PEYTAVI, U.; LUENGO, J.; WEIß, B.; SCHAEFER, U. F.; LEHR, C. M.; WEPF, R.; STERRY, W. Nanoparticles – An efficient carrier for drug delivery into the hair follicles. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, Vol. 66, p. 159-164, 2007.
- LADEMANN, J.; RICHTER, H.; JACOB, U.; PATZELT, A.; HUEBER-BECKER, F.; RIBAUD, C; BENECH-KIEFFER, F.; DUFOUR, E. K.; STERRY, W.; SCHAEFER, H.; LECLAIRE, J.; TOUTAIN, H.; NOHYNEK, G .J. Human percutaneous absorption of a direct hair dye comparing in vitro and vivo results: Implications for safety assessment and animal testing. **Food and Chemical Toxicology**. v. 46, p. 2214-2223, 2008.
- LEGRAND, P.; BARRATT, G.; MOSQUEIRA, V.; FESSI, H.; DEVISSAGUET, J-P. Polymeric nanocapsules as drug delivery systems. A Review. **S.T.P. Pharma Sciences**, v. 9, p. 414-418, 1999.
- LEMARCHAND, C.; COUVREUR, P.; VAUTHIER, C.; CONSTANTINI, D.; GREF, R. Study of emulsion stabilization by graft copolymers using the optical analyzer Turbiscan. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 254, p. 77-82, 2003.
- MAGENHEIM, B.; BENITA, S. Nanoparticles characterization: a comprehensive physicochemical approach. **S. T. P. Pharma Sciences**, Vol.1, n.4, p. 221-241, 1991.
- MALVERN INSTRUMENTS LTD. Dynamic Light Scattering: An introduction in 30 minutes. **DLS Technical Note - MRK656-01**, p. 1-8.
- MARRO, D.; GUY, R. H.; DELGADO-CHARRO, M. B. Characterization of the iontophoretic permselectivity properties of human and pig skin. **Journal of Controlled Release**, v. 70, p. 213-217, 2001.
- MENGUAL, O.; MEUNIER, G.; CAYRÉ, I.; PUECH, K.; SNABRE, P. TURBISCAN MA 2000: multiple light scattering measurement for concentrated emulsion and suspension instability analysis. **Talanta**, v. 50, p. 445-546, 1999.
- MESSENGER, A. G.; RUNDEGREN, J. Minoxidil: mechanisms of action on hair growth. **British Journal of Dermatology**, v. 150, p. 186-194, 2004.

MICROMEDEX. DRUGDEX® Drug Point. Disponível em <<http://www.thomsonhc.com/hcs/librarian>>, acesso em 10.05.2007.

MIYAZAKI, S.; TAKAHASHI, A.; KUBO, W.; BACHYNSKY, J.; LÖBENBERG, R. Poly n-butylcyanoacrylate (PNBCA) nanocapsules as a carrier for NSAIDs: *in vitro* release and *in vivo* skin penetration. **Journal of Pharmacy & Pharmaceutical Sciences**, v. 6, n. 2, p. 240-245, 2003.

MÜLLER-GOYMAN, C. C. Physicochemical characterization of colloidal drug delivery systems such as reverse micelles, vesicles, liquid crystals and nanoparticles for topical administration. **European Journal of Pharmaceutics Biopharmaceutics**, v. 58, n. 2, p. 343-346, 2004.

NAGARWAL, R. C.; KANT, S.; SINGH, P. N.; MAITI, P.; PANDIT, J. K. Polymeric nanoparticulate system: A potential approach for ocular drug delivery. **Journal of Controlled Release**, v. 136, n. 1, p. 2-13, 2009.

NAKAYA, Y.; HAMAOKA, H., KATO, S.; ARASE, S. Effect of minoxidil sulfate and pinacidil on single potassium channel current in cultured human outer root sheath cells and dermal papilla cells. **Journal of Dermatological Science**, v. 7 Supplement 1, p. S104-S108, 1994.

OLIVEIRA, H. P.; ALBUQUERQUE JR, J. J. F.; NOGUEIRAS, C.; RIEUMONT, J. Physical chemistry behavior of enteric polymer in drug release systems. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 366, p. 185-189, 2009.

PAESE, K. Desenvolvimento tecnológico, estudo da fotoestabilidade e avaliação da permeação cutânea *In Vitro* da benzofenona-3 a partir de nanocápsulas poliméricas incorporadas em diferentes veículos semi-sólidos. 2008. 185p. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas). Curso de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre.

PAUS, R & PEKER, S. Biology of hair and nails. In: BOLOGNIA, J. L.; JORIZZO, J. L.; RAPINI, R. P. **Dermatology**. 1ª Edição. Toronto: Editora Mosby, 2003. Cap. 68. p.1007-1023.

POHLMANN, A. R.; MEZZALIRA, G.; VENTURINI, C. G.; CRUZ, L.; BERNARDI, A.; JÄGER, E.; BATTASTINI, A. M. O.; SILVEIRA, N. P.; GUTERRES, S. S. Determining the simultaneous presence of drug nanocrystals in drug-loaded polymeric nanocapsule aqueous suspensions: A relation between light scattering and drug content. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 359, p. 288-293, 2008.

POZEBON, D.; DRESSLER, V. L.; CURTIS, A. J. Análise de cabelo: uma revisão dos procedimentos para a determinação de elementos traço e aplicações. **Química Nova**, v. 22 (6), p. 838-846, 1999.

REYGAGNE, P.; DE LACHARRIÈRE, O. Alopecia. In: BOUILLON, C. & WILKINSON, J. **The Science of Hair Care**. 2ª Edição. USA: CRC Press Taylor & Francis Group, 2005. Cap. 19. p. 559-582

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

ROLAND, I.; PIEL, G.; DELATTRE, L.; EVRARD, B. Systematic characterization of oil-in-water emulsions for formulation design. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 263, p. 85-94, 2003.

SCHAFFAZICK, S. R.; GUTERRES, S. S.; FREITAS, L. L.; POHLMANN, A. R. Caracterização e estabilidade físico-química de sistemas poliméricos nanoparticulados para administração de fármacos. **Química Nova**, v. 26, n. 5, p. 726-737, 2003.

SCHMUTZ, J-L.; BARBAUD, A.; TRÉCHOT, P. Effets systémiques du minoxidil à 2 % par voie topique chez des enfants. **Annales de dermatologie et de vénéréologie**, Note de Pharmacovigilance, v. 135, p. 629, 2008.

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

SIQUEIRA, N. M. Desenvolvimento tecnológico e avaliação da penetração cutânea de benzofenona-3 a partir de nanocápsulas revestidas com quitosana. 2008. 106p. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas). Curso de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre.

SOPPIMATH, K. S.; ABINABHAVI, T. M.; KULKARNI, A. R.; RUDZINSKI, W. E. Biodegradable polymeric nanoparticles as drug delivery devices. **Journal of Controlled Release**, v. 70, p. 1-20, 2001.

TATA, S.; WEINER, N.; FLYNN, G. Relative influence of ethanol and propylene glycol cosolvents on deposition of minoxidil into the skin. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 83, n. 10, p. 1508-1510, 1994.

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

TSUJIMOTO, H.; HARA, K.; TSUKADA, Y.; HUANG, C. C.; KAWASHIMA, Y.; ARAKAKI, M.; OKAYASU, H.; MIMURA, H.; MIWA, N. Evaluation of the permeability of hair growing ingredient encapsulated PLGA nanospheres to hair follicles and their hair growing effects. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 17, p. 4771-4777, 2007.

TURBISCAN. Nouveaux produits, nouveaux équipements. **Biofutur**, v. 159, p. 55, 1996.

UBRICH, N.; SCHMIDT, C.; BODMEIER, R. HOFFMAN, M.; MAINCENT, P. Oral evaluation in rabbits of cyclosporin-loaded Eudragit RS or RL nanoparticles. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 288, p. 169-175, 2005.

USP 27. **The United States Pharmacopoeia**. 27<sup>a</sup> Ed. Rockville: Unites States Pharmacopoeial Convention, 2004. p. 1249-1250.

VALENTA, C.; AUNER, B. G. The use of polymers for dermal and transdermal delivery. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 58, p. 279-289, 2004.

VERVOORT, L. e KINGET, R. *In vitro* degradation by colonic bacteria of inulinHP incorporated in Eudragit RS films. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 129, p. 185-190, 1996.

## 8 ANEXOS

### Anexo 1

#### **Validação do método analítico para doseamento do minoxidil em nanocápsulas.**

O objetivo de uma validação é demonstrar que o método é apropriado para a finalidade pretendida, ou seja, a determinação qualitativa, semi-quantitativa e/ou quantitativa de fármacos e outras substâncias em produtos farmacêuticos. Deve garantir, por meio de estudos experimentais, que o método atenda às exigências das aplicações analíticas, assegurando a confiabilidade dos resultados (BRASIL, 2003).

##### *1.1 Linearidade*

É a capacidade de uma metodologia analítica de demonstrar que os resultados obtidos são diretamente proporcionais à concentração do analito na amostra, dentro de um intervalo especificado. Após avaliação visual do gráfico, se houver relação linear aparente, os resultados deverão ser tratados por métodos estatísticos apropriados para determinação do coeficiente de correlação, intersecção com o eixo Y, coeficiente angular, soma residual dos quadrados mínimos da regressão linear e o desvio padrão relativo (BRASIL, 2003). No intervalo de 0,5 µg/mL à 50 µg/mL, a quantificação do minoxidil foi linear, apresentando um coeficiente de correlação superior a 0,99, intersecção com o eixo Y igual a 7927,6 e coeficiente angular de 140829, demonstrando estar de acordo com as normas preconizadas nos guias de validação vigentes (BRASIL, 2003; ICH, 2005) (Figura

13).

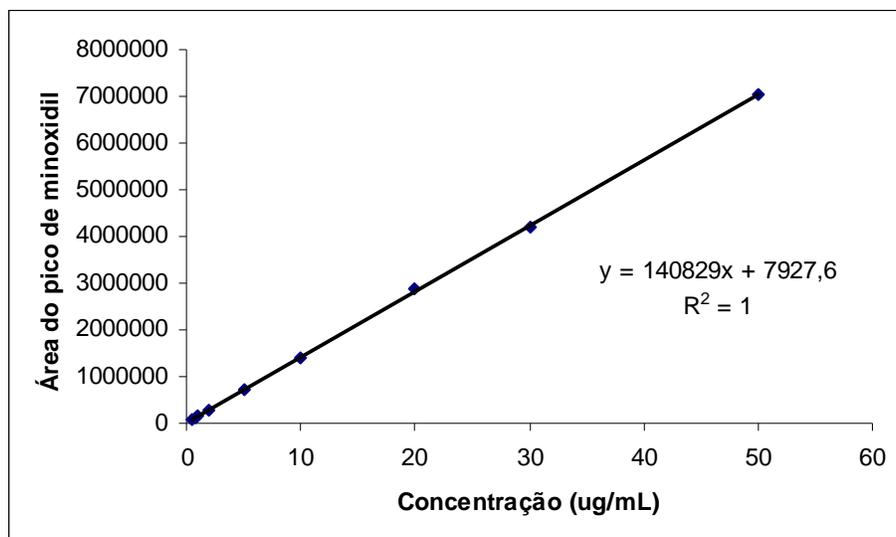


Figura 13: Representação gráfica da curva média do minoxidil, quantificado por CLAE (n = 5, para cada ponto da curva).

O valor de F (155266,87) da ANOVA da regressão foi maior que o F tabelado (4,11) para  $P < 0,05$ , indicando a existência de regressão linear entre as variáveis relacionadas (Tabela 11).

Tabela 11: Cálculo de ANOVA para análise da linearidade do método analítico de quantificação do minoxidil em nanocápsulas

Fontes de variação	GL	SQ	Variância	F calc	F tab
<i>Entre</i>	8	2,33E+14	2,91E+13	3736,48	2,21
<i>Regressão linear</i>	1	2,33E+14	2,33E+14	155266,87	4,11
<i>Desvio linearidade</i>	7	10510605229	1501515033	0,19	2,28
<i>Dentro</i>	36	2,80788E+11	7799653447		
<i>Total</i>	44				

### 1.2. Precisão

A precisão é a avaliação da proximidade dos resultados obtidos em uma série de medidas de uma amostragem múltipla de uma mesma amostra (BRASIL, 2003). A precisão intra-corrída (ou repetibilidade) é a concordância entre os resultados dentro de um curto período de tempo, com o mesmo analista e mesma instrumentação. A avaliação do coeficiente de variação a cada dia da validação (Tabela 12) demonstra uma pequena variação na análise de amostras de mesma concentração em um mesmo dia. A precisão intermediária, ou precisão inter-corrídas, considera a concordância entre os resultados obtidos em dias diferentes de análise. Neste caso, o CV inter-dia não ultrapassou 3 %, sendo inferior ao limite máximo de 5% estabelecido pelos códigos oficiais (BRASIL, 2003; ICH, 2005).

Tabela 12: Avaliação dos coeficientes de variação intra e inter-dia do método analítico para doseamento do minoxidil em nanocápsulas (n = 6).

Dia de validação	10,0 µg/mL de minoxidil	
	Média (µg/mL)	CV %
1	11,49	2,05
2	11,47	2,02
3	12,00	2,73
<i>Inter-dia</i>	11,66	2,53

### 1.3. Exatidão

Para um método analítico, a exatidão significa a proximidade dos resultados obtidos pelo método em estudo em relação ao valor verdadeiro (BRASIL, 2003). Amostras de NC foram contaminadas com minoxidil, resultando nas concentrações finais de 3, 9 e 17 µg/mL. Os valores percentuais de minoxidil recuperados a partir

das soluções-amostra encontraram-se dentro dos intervalos permitidos (ICH, 2005), conforme observado na Tabela 13.

Tabela 13: Avaliação da exatidão do método analítico de doseamento do minoxidil em nanocápsulas (n = 9)

Concentração de minoxidil ( $\mu\text{g/mL}$ )	Conc. $\pm$ DP	Exatidão %
3,0	$3,08 \pm 0,04$	102,8
9,0	$9,14 \pm 0,28$	101,6
17,0	$16,90 \pm 0,68$	99,4

#### 1.4. Especificidade

A especificidade é a capacidade que um método possui de medir exatamente um composto em presença de outros componentes tais como impurezas, produtos de degradação e componentes da matriz (BRASIL, 2003).

Os cromatogramas apresentados na Figura 14 mostram que o método é específico para a quantificação do minoxidil em suspensões de nanocápsulas, não sendo observada nenhuma interferência dos demais componentes da formulação.

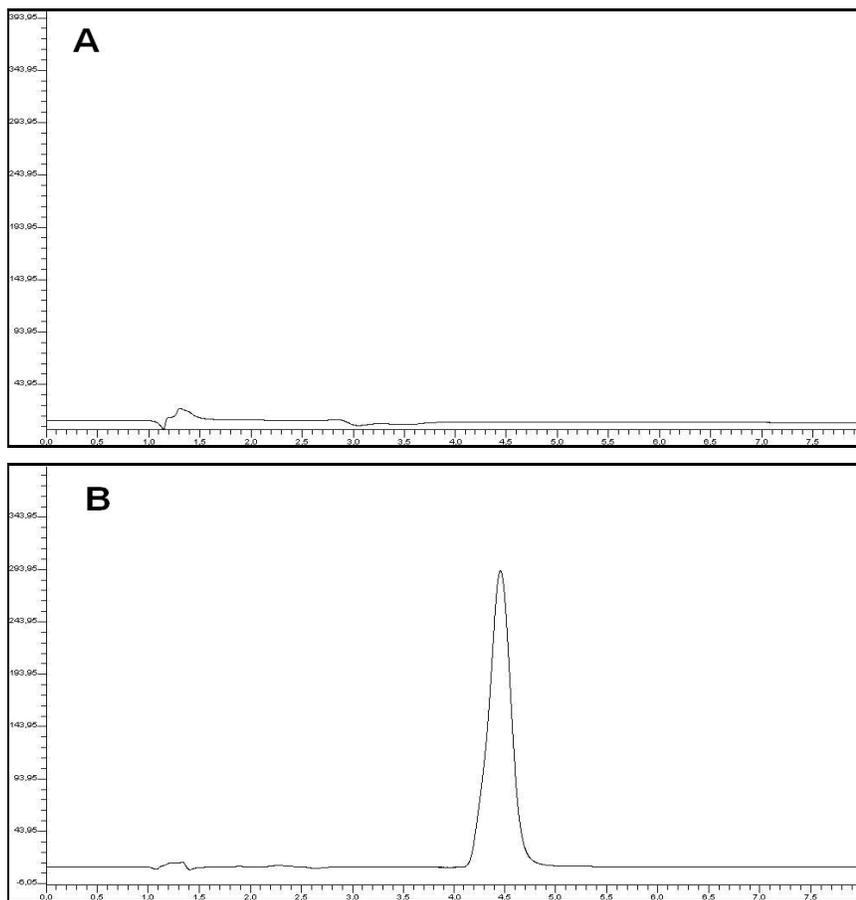


Figura 14: Cromatogramas obtidos na detecção das nanocápsulas sem minoxidil (A) e das nanocápsulas com minoxidil (B).

### 1.5 Limite de Detecção (LD) e Limite de Quantificação (LQ)

O Limite de detecção (LD) é a menor quantidade do analito presente em uma amostra que pode ser detectado, porém não necessariamente quantificado, sob as condições experimentais estabelecidas. No caso de métodos instrumentais como CLAE, a estimativa do limite de detecção pode ser feita com base na relação de 3 vezes o ruído da linha de base, podendo ser determinado pela equação:  $LD = (DPa \times 3) / IC$ , onde: DPa é o desvio padrão do intercepto com o eixo do Y de, no mínimo, 3 curvas de calibração construídas contendo concentrações do fármaco próximas ao

suposto limite de quantificação e IC é a inclinação da curva de calibração (BRASIL, 2003).

Já o Limite de Quantificação (LQ) é a menor quantidade do analito em uma amostra que pode ser determinada com precisão e exatidão aceitáveis sob as condições experimentais estabelecidas. Pode também ser expresso pela equação  $LQ = (DPa \times 10) / IC$  (BRASIL, 2003).

Através das equações acima, determinou-se o limite de detecção do minoxidil em 0,30 µg/mL, sendo o limite de quantificação 0,92 µg/mL.

Considerando-se que os parâmetros usados para a validação do método analítico de quantificação do minoxidil em suspensões de nanocápsulas encontram-se em concordância com as especificações oficiais, o método avaliado foi considerado linear, preciso, exato e específico, sendo adequado para a determinação do minoxidil nas amostras de nanocápsulas.

## Anexo 2



PRÓ-REITORIA DE PESQUISA  
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA  
CARTA DE APROVAÇÃO

prospesq

O Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal do Rio Grande do Sul analisou o projeto:

**Número :** 2007840

**Título :** Obtenção, caracterização físico-química e avaliação biológica de nanopartículas poliméricas contendo minoxidil

**Pesquisador (es) :**

<u>NOME</u>	<u>PARTICIPAÇÃO</u>	<u>EMAIL</u>	<u>FONE</u>
SILVIA STANISCUASKI GUTERRES	PESQ RESPONSÁVEL	00006741@ufrgs.br	33095218
ADRIANA RAFFIN POHLMANN	PESQUISADOR	pohlmann@iq.ufrgs.br	33086280

O mesmo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da UFRGS, reunião nº 24 , ata nº 104 , de 17/4/2008 , por estar adequado ética e metodologicamente e de acordo com a Resolução 196/96 e complementares do Conselho Nacional de Saúde.

Porto Alegre, quarta-feira, 23 de abril de 2008

  
ALINA SIMONI BERLIN DA SILVA  
Coordenadora do CEP-UFRGS

quarta-feira, 23 de abril de 2008

Página 5 de 6