

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
FACULDADE DE FARMÁCIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

CAMILA MONTEIRO CRUZ

**DESENVOLVIMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE UM
SISTEMA DE LIBERAÇÃO TRANSDÉRMICA DE
SUBSTANCIA QUÍMICA HIDROFÍLICA COM POTENCIAL
VASODILATADOR PARA TRATAMENTO DA ALOPÉCIA**

Belo Horizonte
2018

CAMILA MONTEIRO CRUZ

**DESENVOLVIMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE UM SISTEMA DE LIBERAÇÃO
TRANSDÉRMICA DE SUBSTANCIA QUÍMICA HIDROFÍLICA COM POTENCIAL
VASODILATADOR PARA TRATAMENTO DA ALOPÉCIA**

Dissertação, como requisito parcial para obter o grau de mestre em Ciências Farmacêuticas, submetida ao Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Minas Gerais.

Orientador Prof. Dr. André Augusto Gomes Faraco
– UFMG

Belo Horizonte – MG

2018

C957d Cruz, Camila Monteiro.
Desenvolvimento e caracterização de um sistema de liberação transdérmica de substância química hidrofílica com potencial vasodilatador para tratamento da alopecia / Camila Monteiro Cruz – 2018.
104 f. : il.

Orientador: André Augusto Gomes Faraco.

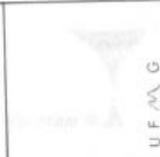
Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Farmácia, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas.

1. Cabelo – Teses. 2. Alopecia – Teses. 3. Calvície – Teses. 4. Terapia medicamentosa – Teses. 5. Medicamentos – Formas farmacêuticas – Teses. 6. Vasodilatadores – Teses. I. Faraco, André Augusto Gomes. II. Universidade Federal de Minas Gerais. Faculdade de Farmácia. III. Título.

CDD: 616.546



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS



FOLHA DE APROVAÇÃO

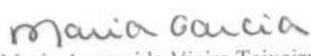
**DESENVOLVIMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE UM SISTEMA DE LIBERAÇÃO
TRANSDÉRMICA DE SUBSTÂNCIA QUÍMICA HIDROFÍLICA COM POTENCIAL
VASODILATADOR PARA TRATAMENTO DA ALOPÉCIA**

CAMILA MONTEIRO CRUZ

Dissertação submetida à Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS, como requisito para obtenção do grau de Mestra em CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS, área de concentração CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS.

Aprovada em 28 de fevereiro de 2018, pela banca constituída pelos membros:


Prof. Andre Augusto Gomes Faraco - Orientador
UFMG


Profa. Maria Aparecida Vieira Teixeira Garcia
UFMG


Profa. Flávia de Marco Almeida
CTF/UFMG

Belo Horizonte, 28 de fevereiro de 2018.

“Lembre-se que as pessoas podem tirar tudo de você, menos o seu conhecimento”

Albert Einstein

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar eu agradeço aos meus pais pelo suporte em tudo que conquistei até hoje.

Agradeço aos colegas do LTF, desde que comecei minha jornada em 2010. Cada um de vocês fez parte da construção da profissional que sou hoje. Agradeço especialmente ao Daniel, que me apresentou o laboratório e também agradeço especialmente à Aina, por todos os experimentos que me ajudou a fazer e por toda a ajuda.

Agradeço ao meu orientador, André Faraco, pelo conhecimento compartilhado, pelos momentos em que foi quase um psicólogo e por ter aceitado me orientar.

Agradeço também aos colegas da CTIT, pelos momentos de descontração diários e pelos esclarecimentos que foram essenciais para boa parte deste trabalho.

Agradeço ainda por todos que suportaram os momentos, não muito raros de estresse e mau humor que foram obrigados a aguentar.

Finalmente agradeço a Deus, pela minha vida, e por ter me dado forças para suportar os últimos dois anos de trabalho intenso.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: representação esquemática das camadas da pele com os anexos	15
Figura 2: ciclo germinativo do folículo piloso	17
Figura 3: (a) alopecia areata unifocal, (b) alopecia areata multifocal e (c) alopecia <i>areata ofisiasis</i>	19
Figura 4: padrão de evolução da alopecia androgenética masculina	21
Figura 5: afinamento difuso em função da miniaturização dos folículos	22
Figura 6: Imagem de biópsia visual do couro cabeludo indicando presença de pelos terminais (<i>terminal</i>), <i>velus (vellus)</i> e miniaturizados (<i>miniaturized</i>).	23
Figura 7: pelo em ponto de exclamação ou pelo peládico.	25
Figura 8: estrutura química do aceturato de diminazeno	42
Figura 9: estrutura química de uma benzamidina <i>para</i> -substituída, onde X são grupos funcionais polares.....	42
Figura 10: a) demonstração da colocação da lâmina de peso aferido em 5 gramas sobre a gotícula de gel. Acima das placas estão os pesos de massas aferidas em 2, 5 e 10 gramas, respectivamente;(b) a forma como os pesos são colocados por cima da lâmina.....	50
Figura 11: gráfico demonstrativo dos valores de densidade de massa encontrados para o gel-creme branco e o gel-creme amostra. (*) indica grupos estatisticamente semelhantes ao nível de significância de 1%.	59
Figura 12: gráfico demonstrativo dos valores de viscosidade em Poise (P) em função da velocidade de rotação em RPM. Os grupos foram estatisticamente diferentes ao nível de significância de 1%.	63
Figura 13: demonstração gráfica dos resultados médios de espalhabilidade com desvio padrão. (*) indica grupos estatisticamente semelhantes ao nível de significância de 1%	67

Figura 14: representação gráfica dos valores de teor encontrados, com a média e desvio padrão.....	70
Figura 15: representação gráfica do resultado do teste de liberação da substância teste em célula de Franz.....	72
Figura 16: (a) à esquerda a regressão linear dos valores de $[A]_t$ em função da raiz quadrada do tempo, e (b) à direita a distribuição dos resíduos padronizados.....	74
Figura 17: regressão linear dos valores de $\log(t)$ em função de $\log(f)$	76
Figura 18: (a) à esquerda a regressão linear dos valores de $\log(Q_t)$ em função de $\log(t)$, e (b) à direita a distribuição dos resíduos padronizados.	77
Figura 19: Espectro de absorção no UV da substância teste na região entre 200 e 400 nm ..	80
Figura 20: representação gráfica das respostas em função da concentração da substância teste	86
Figura 21: Representação gráfica da análise de normalidade dos resíduos padronizados da regressão linear, pelo método dos mínimos quadrados ordinários, das respostas em função da concentração da da substância teste.	87

LISTA DE TABELAS E QUADROS

Quadro 1: constituintes propostos para a formação do gel-creme produzido.....	47
Tabela 1: resultados de densidade relativa ($d_{relativa}$), densidade de massa (ρ), ρ média e desvio padrão (SD).....	58
Tabela 2: resultados de pH com média.....	61
Tabela 3: resultados médios de viscosidade em Poise (P) com desvio padrão (SD).....	62
Tabela 4: média dos resultados de espalhabilidade em mm² com desvio padrão (SD).....	66
Tabela 5: Valores de teor, determinados por espectrofotometria no UV, para as formulações fabricadas com média e desvio padrão (SD).....	69
Tabela 6: Concentrações da substância teste e valores de absorvância média para a construção da curva analítica do método de quantificação utilizando espectroscopia de absorção na região do ultravioleta.....	84
Tabela 7: Validação de método de quantificação da substância teste: repetibilidade.....	88
Tabela 8: Validação de método analítico para quantificação da substância teste: exatidão... 	89

LISTA DE SIGLAS E SÍMBOLOS

3 β -HSD	3 β -hidroxiesteroide desidrogenase
ρ	Densidade de massa
A/O	Água em óleo
Ang(1-7)	Angiotensina(1-7)
ATP	Adenosina trifosfato
CD8	Cluster de diferenciação tipo 8
CTC	Células T citolíticas
DHEA	di-hidroepiandrosterona
DHT	di-hidrotestosterona
DPR	Desvio padrão relativo
ECA2	Enzima conversora de angiotensina 2
HGF	Fator de crescimento de hepatócitos
IGF	Fator de crescimento semelhante à insulina
IL	Interleucina
INF- γ	Interferon- γ
NK	<i>Natural Killer</i>
O/A	Óleo em água
P	Poise
pH	Potencial hidrogeniônico
rpm	Rotações por minuto
SD	Desvio padrão
SRA	Sistema renina-angiotensina
TGF- β 1	Fator de transformação do crescimento β 1
TH	<i>T-helper</i>
UV	Ultravioleta
VEGF	Fator de crescimento endotelial vascular
Vis	Visível

RESUMO

A alopecia é uma doença caracterizada por perda de cabelo, que pode ter fisiopatologia autoimune ou relacionada ao metabolismo hormonal de andrógenos, sendo denominada alopecia areata e androgenética, respectivamente. Os tratamentos medicamentosos descritos têm se mostrado eficazes na indução do crescimento capilar. Porém, é necessário o uso contínuo, sendo relatado reaparecimento dos sintomas caso o tratamento seja interrompido, não sendo raros os casos em que o tratamento é descontinuado em função de efeitos adversos graves. Nesse trabalho foi formulado e caracterizado um gel-creme transdérmico, contendo uma substância química vasodilatadora, cuja readequação farmacológica é uma proposta de nova alternativa para proporcionar aos pacientes um tratamento mais eficaz. A caracterização físico-química, contemplou aferição de cremação, pH, densidade, viscosidade, espalhabilidade, assim como doseamento e teste de liberação *in vitro* por método validado. Foi encontrado pH levemente ácido, compatível com a aplicação na pele, assim como perfil reológico adequado às condições de armazenamento e uso propostas. O perfil de liberação encontrado demonstra a capacidade do sistema de veiculação de cerca de 90% do ativo durante um período de aproximadamente 10 horas, com velocidade de liberação adequada para efeito local.

Palavras-chave: Alopecia. Calvície. Terapia medicamentosa. Medicamentos. Formas farmacêuticas. Vasodilatadores.

ABSTRACT

Alopecia is a disease characterized by hair loss, whose pathophysiology can be related to hormonal metabolism of androgens or autoimmunity, being called androgenetic or areata alopecia, respectively. The drug treatments previously described have been effective in capillary growth induction. However, continuous use is required, and the symptoms tend to recur if the treatment is discontinued, and treatment is commonly discontinued because of serious adverse effects. In this work, a transdermal gel-cream containing a vasodilating chemical substance was formulated and characterized. The pharmacological re-adaptation proposed herein may be a new alternative to provide a more effective treatment option for patients. The physico-chemical characterization included determination of pH, cremation, density, viscosity, spreadability, as well as dosing and *in vitro* release profile tested by a validated method. A slightly acidic pH was found, which is compatible with the application on the skin, and the rheological profile was adequate for the proposed storage and use conditions. The release profile demonstrates the capacity of the delivery system to liberate about 90% of the active compound over a period of approximately 10 hours with a suitable release rate for a local effect.

Key-words: Alopecia. Baldness. Medicinal therapy. Medicines. Pharmaceutical forms. Vasodilators.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO E RELEVÂNCIA DO TEMA.....	13
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	15
2.1	A pele e o ciclo do crescimento capilar.....	15
2.2	Alopécia.....	18
2.3	Tratamento da Alopécia	24
3	JUSTIFICATIVA	32
4	OBJETIVOS	33
4.1	Objetivo geral.....	33
4.2	Objetivos específicos.....	33
	CAPÍTULO I.....	34
5	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA DO CAPÍTULO I.....	35
5.1	Uso tópico de medicamentos.....	35
5.2	Promotores de absorção	40
5.3	Benzamidas <i>para</i> -substituídas.....	41
6	MATERIAIS E MÉTODOS.....	45
6.1	Materiais	45
6.2	Manipulação do gel-creme.....	46
6.3	Avaliação da estabilidade física	47
6.4	Mensuração de densidade de massa e densidade relativa	48
6.5	Aferição do pH de superfície	48
6.6	Determinação da viscosidade do gel-creme	49
6.7	Determinação da espalhabilidade do gel-creme.....	49
6.8	Doseamento	51
6.9	Teste de liberação <i>in vitro</i>	51

7	RESULTADOS E DISCUSSÃO	53
7.1	Estabilidade física	56
7.2	Densidade de massa e densidade relativa do gel-creme	58
7.3	pH de superfície do gel-creme	60
7.4	Viscosidade do gel-creme	62
7.5	Espalhabilidade do gel-creme	66
7.6	Doseamento	69
7.7	Perfil de liberação <i>in vitro</i> e cinética de liberação	70
	CAPÍTULO II	78
8	DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DO MÉTODO ANALÍTICO PARA QUANTIFICAÇÃO DA SUBSTÂNCIA TESTE	79
8.1	Materiais	80
8.2	Método desenvolvido	81
8.3	Validação do método	82
8.3.1	Intervalo	83
8.3.2	Linearidade	84
8.3.3	Precisão	87
8.3.4	Exatidão	89
9	CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS FUTURAS	91
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	92-104

1 INTRODUÇÃO E RELEVÂNCIA DO TEMA

A alopecia é uma doença caracterizada por perda de cabelo que ainda pode ser subdividida em alopecia areata e alopecia androgenética. A alopecia areata é uma doença autoimune que afeta crianças e adultos, sendo mais comum na população entre 3 e 30 anos, e é indiferente à cor do cabelo. A alopecia androgenética é o tipo mais comum de perda de cabelo, e sua causa tem sido relacionada a fatores genéticos que levam a um aumento da quantidade de diidrotestosterona nos folículos que culminam em miniaturização progressiva e, posteriormente, queda capilar. A alopecia androgenética afeta cerca de 50% dos caucasianos do sexo masculino com mais de 40 anos, sendo menos comum e mais suave em mulheres.

Os tratamentos medicamentosos para alopecia areata ou androgenética disponíveis atualmente são uso tópico de minoxidil e uso oral de finasterida. Outras estratégias relatadas envolvem uso de anti-inflamatórios pelas vias oral, tópica ou intralesional, uso de vasodilatadores e de inibidores de Janus quinase. A maioria dos tratamentos tem se mostrado eficazes na indução do crescimento capilar, porém é necessário o uso contínuo, sendo relatado reaparecimento dos sintomas caso o tratamento seja interrompido. Associado a isso, não são raros os casos em que o tratamento é descontinuado em função de efeitos adversos graves como desbalanço do metabolismo androgênico ou adrenal, desordens cardiovasculares e piora de hipertensão ou diabetes.

Tanto para os casos de alopecia areata como para os de alopecia androgenética é de extrema importância controlar processos inflamatórios instaurados assim como prevenir recorrência e agravamento dos casos. Por ter um padrão de ataque que ainda não foi completamente elucidado, se torna de extrema importância o estudo de novos fármacos a fim de proporcionar aos pacientes uma possibilidade de tratamento mais eficaz.

A readequação farmacológica tem se mostrado uma alternativa extremamente relevante no que tange a descoberta de novas ações terapêuticas para substâncias já descritas. Existem inúmeras substâncias cuja segurança já foi demonstrada mas cujo mecanismo de ação ainda não é completamente descrito. Assim, podem ser utilizadas para o tratamento de doenças alvo que não foram o motivo de suas descobertas, principalmente aquelas que ainda não têm sua fisiopatologia conhecida a fundo, como a alopecia.

O novo uso encontrado para essas substâncias pode, ainda, ser associado a sistemas de liberação, como por exemplo, sistemas tópicos de administração. Neste sentido, géis transdérmicos têm sido usados como alternativas ao tratamento por via oral ou por via intralesional no caso de doenças que atingem a pele, pois reduzem a possibilidade de efeitos colaterais sistêmicos. Esses sistemas são importantes em casos de fármacos com intenso efeito de primeira passagem ou com pequena janela terapêutica, podendo atuar também reduzindo o desconforto do paciente, e conseqüentemente, aumentando a aderência ao tratamento.

Portanto, o desenvolvimento de formulações para liberação na pele de substâncias já descritas, com atividade diferente da atividade que originou seu desenvolvimento, está em acordo com o conceito de readequação farmacológica.

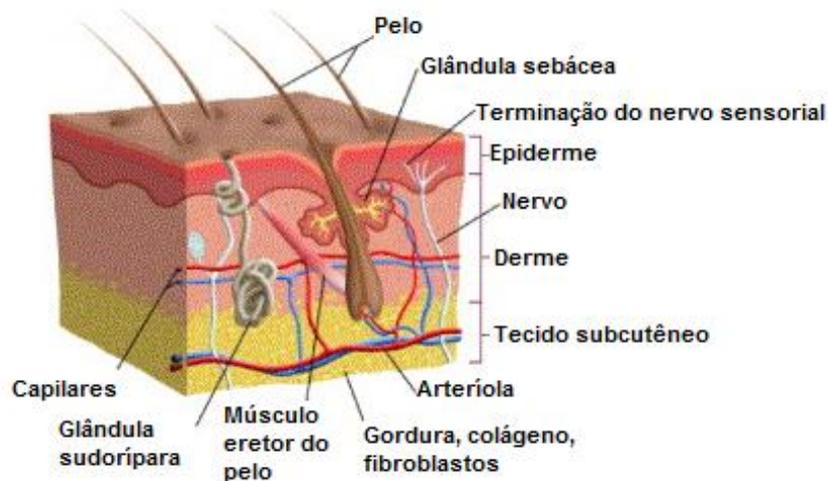
Neste contexto, este trabalho teve por objetivo o desenvolvimento de formulação transdérmica para uso tópico, tendo como substância ativa uma benzamidina. Esta substância vem sendo utilizada como vasodilatadora por nosso grupo de pesquisa há 4 anos para liberação ocular e neste trabalho a via de administração escolhida foi a pele para o potencial emprego no tratamento da alopecia areata e androgenética, podendo ser uma estratégia relevante nesta abordagem terapêutica.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 A pele e o ciclo do crescimento capilar

A pele é composta por duas camadas tissulares principais, a derme e a epiderme, sendo essas compostas, respectivamente, por epitélio pavimentoso estratificado e tecido conjuntivo denso (**Figura 1**). Logo após a derme há tecido celular subcutâneo rico em tecido adiposo que constitui a hipoderme (PRISTA *et al.*, 2003).

Figura 1: representação esquemática das camadas da pele com os anexos



A epiderme é ainda subdividida em várias camadas ou estratos, sendo estes, de fora pra dentro: o estrato córneo, o estrato lúcido, o estrato granuloso e o estrato germinativo (SWARBRICK, 2007; JUNQUEIRA e CARNEIRO, 2013).

O estrato córneo, a camada mais externa da pele, tem como principal função ser uma barreira à difusão de substâncias sendo que, não só protege o corpo de influências externas, como também evita a perda de água transepidérmica. O estrato córneo é composto por células mortas ou em degenerência, os corneócitos, sendo 40% composto por proteínas, principalmente queratina, 40% água e 20% uma mistura de lipídeos (SWARBRICK, 2007). A função de barreira é atribuída, principalmente aos

lipídios intercelulares, que envolvem os corneócitos mortos e formam membranas multilamelares complexas (EICHNER *et al.*, 2017; PRISTA *et al.*, 2003).

Abaixo do estrato córneo há o estrato lúcido, formado por células translúcidas ricas em eleidina, o precursor químico da queratina. Na sequência há o estrato granuloso, formado por células losangulares com alto teor de glicoproteínas, precursoras da eleidina (SWARBRIC, 2007; PRISTA *et al.*, 2003). Finalmente, o estrato germinativo é a camada viva da epiderme, cuja proliferação constante das células é responsável pela renovação epitelial. À medida que as células vão se transformando, há um deslocamento para as camadas mais superficiais, o que leva à formação dos estratos e manutenção da epiderme (SWARBRIC, 2007; PRISTA *et al.*, 2003).

A derme, a camada que vem logo abaixo da epiderme, é flexível e elástica e é composta por duas camadas de tecido conjuntivo. Nessa camada estão presentes numerosos nervos e vasos sanguíneos e linfáticos. Nas camadas mais profundas da derme encontram-se os anexos, as glândulas sudoríparas e sebáceas e os folículos pilosos. A vascularização dos anexos é feita pela microcirculação presente (JUNQUEIRA e CARNEIRO, 2013).

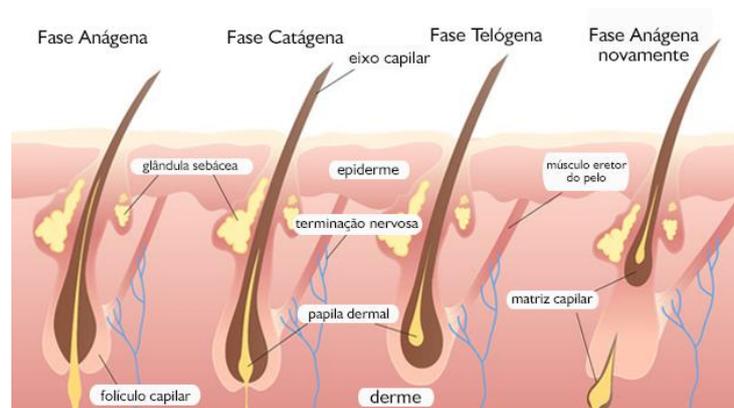
Os folículos pilosos são invaginações do epitélio presentes na derme, que envolvem a raiz dos pelos e o bulbo. Do folículo, a haste do pelo se projeta para fora através da superfície da pele (JUNQUEIRA e CARNEIRO, 2013).

Ao final de cada folículo, na parte mais profunda da derme, existe uma pequena saliência, chamada papila. Nela se encontram numerosos vasos sanguíneos e terminações nervosas (JUNQUEIRA e CARNEIRO, 2013). Ao redor da papila se encontra o bulbo piloso, uma estrutura de textura mais mole e esbranquiçada, onde se encontra a matriz germinativa, cujas células indiferenciadas são responsáveis pela

formação do pelo e da melanina, e pela manutenção das células do próprio folículo (JUNQUEIRA e CARNEIRO, 2013).

A matriz germinativa tem a função primordial de produzir fibra capilar e seu funcionamento é cíclico. Isso resulta num ciclo capilar dividido em três fases, crescimento, regressão e repouso (**Figura 2**). A grande maioria dos pelos que compõem o cabelo se encontra em fase de crescimento. Do restante grande parte está em fase de repouso, e apenas uma pequena parte está em fase de regressão (PARK *et al.*, 2017).

Figura 2: ciclo germinativo do folículo piloso



A fase de crescimento, também chamada de anágena, é caracterizada pela proliferação contínua da matriz germinativa, o que resulta em um crescimento progressivo do pelo. Esta é a fase mais longa do ciclo e a sua duração varia de um indivíduo para o outro, assim como depende do local do corpo onde está o folículo piloso. Por exemplo, no cabelo, este ciclo costuma durar cerca de três anos (PARK *et al.*, 2017; SEMALTY *et al.*, 2011).

Na fase seguinte, a de regressão, ou catágena, a atividade do folículo vai parando lentamente (SEMALTY *et al.*, 2011). O folículo inicia um processo de atrofia e a base do pelo começa a perder o contato com a papila e deslocar-se progressivamente em direção à superfície (SEMALTY *et al.*, 2011). Finalmente,

quando o folículo se encontra completamente atrofiado, ocorre a parada completa da atividade folicular, o que caracteriza a fase de repouso, ou telógena. Essa fase dura cerca de três ou quatro meses e resulta na queda do pelo (SEMALTY *et al.*, 2011).

Um novo ciclo se inicia quando uma nova matriz generativa se forma, a qual entra em atividade e dá início ao crescimento de um novo pelo, o qual progressivamente empurra o pelo em fase telógena, que ocupa a porção mais superficial do folículo, até a parte externa do corpo (SEMALTY *et al.*, 2011).

2.2 Alopecia

A alopecia é uma doença caracterizada pela perda de cabelo, havendo duas formas, a alopecia areata e a alopecia androgenética. A alopecia areata é uma doença autoimune que consiste na perda de cabelo em áreas bem delimitadas com pele aparentemente normal, geralmente no couro cabeludo e na região da barba (Gilhar, Etzioni e Paus, 2012). Pode estar presente uma única placa alopecica, quando se define como alopecia areata unifocal (**Figura 3a**), ou ainda podem estar presentes múltiplas placas alopecicas, quando se define como alopecia areata multifocal (**Figura 3b**) (RIVITTI, 2005). A doença apresenta uma rápida evolução e o paciente pode apresentar perda de cabelo em todo o couro cabeludo, quando se define como *alopecia areata totalis* ou total, ou mesmo no corpo inteiro, caracterizando-se a alopecia areata *universalis* ou universal (GILHAR, ETZIONI E PAUS, 2012; RIVITTI, 2005). Nesse caso, as áreas afetadas são o couro cabeludo, os cílios, supercílios, a barba e o bigode, axilas e áreas genitais (GILHAR, ETZIONI E PAUS, 2012; RIVITTI, 2005).

Há algumas variantes desta doença que são denominadas de alopecia *areata oíasis* (**Figura 3c**) e alopecia *areata sisáifo*. No primeiro caso a região comprometida é a temporo-occipital, ou seja, as margens inferiores do couro cabeludo.

Figura 3: (a) alopecia areata unifocal, (b) alopecia areata multifocal e (c) alopecia areata ofisiasis.



O segundo caso é quando ocorre o inverso, ou seja, há perda de cabelo em todo o couro cabeludo exceto na margem inferior (RIVITTI, 2005). Há ainda as formas difusas de alopecia, em que a perda de cabelo ocorre de forma aguda e difusa, casos estes que costumam evoluir rapidamente para quadros mais graves de alopecia total ou mesmo universal (RIVITTI, 2005).

A alopecia areata afeta crianças e adultos e é indiferente à cor do cabelo (LIU *et al.*, 2017). Embora seja incomum em crianças com menos de 3 anos, a maioria dos pacientes é relativamente jovem, sendo que mais de 66% dos pacientes tem menos de 30 anos e apenas 20% tem mais de 40 (GILHAR, ETZIONI e PAUS, 2012).

Acredita-se que a fisiopatologia da alopecia areata está relacionada a distúrbios do ciclo de crescimento folicular em que células inflamatórias atacam os folículos pilosos em fase anágena, que em seguida entram precocemente na fase catágena (GILHAR, ETZIONI e PAUS, 2012). A distrofia folicular induzida por inflamação causa uma perda progressiva da capacidade do folículo de manter o fio firmemente ancorado, o que leva à queda (GILHAR, ETZIONI e PAUS, 2012). O folículo piloso atacado na alopecia areata mantém sua capacidade de iniciar novos ciclos, uma vez que as células germinativas não são destruídas, portanto a desordem do ciclo de crescimento é, em princípio, reversível (GILHAR, ETZIONI e PAUS, 2012).

A alopecia areata pode ser considerada uma doença autoimune órgão-específica, uma vez que afeta apenas folículos pilosos, unhas e raramente epitélio de pigmento da retina (GILHAR, ETZIONI e PAUS, 2012). Dessa forma, o conhecimento dos auto antígenos presentes nesses tecidos são importantes para a elucidação da fisiopatologia da doença (GILHAR, ETZIONI e PAUS, 2012).

Já foi demonstrada a presença de infiltrado imunológico nas adjacências dos folículos pilosos afetados, composto por células T citolíticas (CTC), células *T-helper* (TH) ativadas e células *natural killer* (NK), caracterizando uma resposta inflamatória tipo TH1 (PETUKHOVA *et al.*, 2010).

Em estudos mais recentes, de XING L. e colaboradores (2014), foi identificado no infiltrado inflamatório adjacente aos folículos afetados por alopecia areata a presença de linfócitos T do tipo CD8⁺NKG2D⁺, assim como uma superexpressão, nos próprios folículos, de dois ligantes de NKG2D, ULBP3 e MICA5, cuja associação à patogênese tem sido sugerida em estudos genômicos (PETUKHOVA *et al.*, 2010; XING *et al.*, 2014). Dessa forma, linfócitos T CD8⁺NKG2D⁺, cuja ativação decorre da superexpressão de ULBP3 nos folículos, reconhecem por meio de células apresentadoras de antígenos alguns antígenos presentes nos folículos, desencadeando reação imunológica autoimune (PETUKHOVA *et al.*, 2010; RIVITTI, 2005; XING *et al.*, 2014).

XING L. e colaboradores (2014) identificaram ainda, em pele lesional de pacientes com alopecia areata, três fatores gênicos associados à ocorrência de alopecia areata. A expressão de genes de resposta a Interferon- γ (IFN- γ), tais como aqueles que codificam as quimiocinas da família CXC, como a CXCL-9, CXCL-10 e CXCL-11, induzidas por IFN; a expressão de fatores de transição específicos de CTL,

tais como aqueles que codificam as citocinas CD8A; e a expressão de fatores de transição para interleucina-2 (IL-2) e IL-15 (LIU *et al.*, 2017; XING *et al.*, 2014).

Em resumo, a expressão de genes codificadores de NKG2D em células T CD8+ se mostra um ponto central na patogênese da alopecia, causando superexpressão de IL-2 e IL-15 nos folículos pilosos e finalmente produção de INF- γ , que marca os folículos para o ataque (LIU *et al.*, 2017; XING *et al.*, 2014).

A Alopecia androgenética, por sua vez, o tipo mais comum de perda de cabelo, é menos comum e mais suave em mulheres, mas chega a afetar cerca de 50% dos caucasianos do sexo masculino com mais de 40 anos (ADIL e GODWIN, 2017). Nos homens há uma variação na gravidade com piora contínua do quadro, sendo que o início dos sintomas pode acontecer ainda no final da adolescência (ADIL e GODWIN, 2017). Em um primeiro momento há queda nas laterais da linha de frente que evolui para perda difusa dos cabelos no topo da cabeça até o estágio mais avançado em que só há cabelo ao longo das margens temporal e occipital (**Figura 4**) (ADIL e GODWIN, 2017).

Figura 4: padrão de evolução da alopecia androgenética masculina

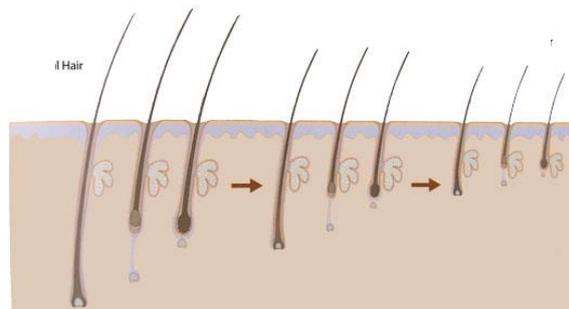


Na alopecia androgenética a fisiopatologia está relacionada à di-hidrotestosterona (DHT) (ADIL e GODWIN, 2017; NAGASAWA *et al.*, 2016). O alvo da ação dos andrógenos no folículo piloso está provavelmente na papila dérmica, sendo que os receptores específicos, ainda desconhecidos, apresentam baixa afinidade pela di-hidroepiandrosterona (DHEA) e alta afinidade por testosterona e

DHT, sendo a afinidade por DHT até 5 vezes maior que por testosterona (MULINARI-BRENNER, SEIDEL e HEPP, 2011).

Os folículos pilosos têm algumas enzimas capazes de converter esteroides sexuais circulantes (MULINARI-BRENNER, SEIDEL e HEPP, 2011). A 3 β -hidroxiesteroide desidrogenase (3 β -HSD) é responsável pela conversão de andrógenos fracos em DHT, a qual é capaz de induzir a miniaturização do folículo piloso seguida por afinamento difuso do cabelo e posterior perda de volume capilar, conforme demonstrado na **Figura 5** (ADIL E GODWIN, 2017; MULINARI-BRENNER, SEIDEL e HEPP, 2011; NAGASAWA *et al.*, 2016). Já foi demonstrada uma superexpressão da 3 β -HSD nas áreas calvas de pacientes acometidos por alopecia androgenética (MULINARI-BRENNER, SEIDEL e HEPP, 2011). A presença de maior quantidade de 3 β -HSD nas áreas calvas de pacientes acometidos por alopecia androgenética, especialmente nos folículos frontais em comparação com os occipitais, pode explicar inclusive o padrão de evolução da doença (MULINARI-BRENNER, SEIDEL e HEPP, 2011).

Figura 5: afinamento difuso em função da miniaturização dos folículos

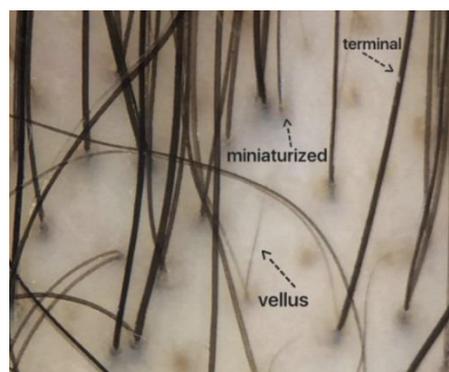


Os folículos miniaturizados resultam no crescimento de pelos muito finos e sem pigmento, os chamados pelos *velus* (KAUFMAN, 2002). A miniaturização resulta em ascensão do folículo do retículo dermal para a papila dérmica, onde ocorrem rápidos ciclos de crescimento compostos pelas fases anágena e catágena com crescimento e

queda de pelos muito finos e sem pigmento (KAUFMAN, 2002). Assim como na alopecia areata, a situação é reversível (NAGASAWA *et al.*, 2016) e um tratamento efetivo pode transformar um folículo miniaturizado de volta em um folículo terminal, com retorno para o retículo dermal e desenvolvimento de pelos terminais normais (KAUFMAN, 2002).

O diagnóstico confirmatório de alopecia androgenética é feito por meio de biópsia, em que se pode observar a miniaturização dos folículos com transformação dos pelos terminais em pelos *velus* (**Figura 6**), maior número de folículos telógenos, diminuição de folículos na hipoderme, glândulas sebáceas com volume aumentado, diâmetro da haste do pelo alterado ou aumento do número de tratos fibrosos (MULINARI-BRENNER, SEIDEL e HEPP, 2011). Uma razão de pelos terminal:*velus* de 7:1 é considerada normal, mas quando se observa valores menores ou iguais a 3:1 tem-se um diagnóstico de alopecia androgenética (MULINARI-BRENNER, SEIDEL e HEPP, 2011).

Figura 6: Imagem de biópsia visual do couro cabeludo indicando presença de pelos terminais (*terminal*), *velus* (*vellus*) e miniaturizados (*miniaturized*).



Frequentemente, a miniaturização folicular está acompanhada de processo inflamatório perifolicular, sendo evidenciada na biópsia a presença de infiltrado linfocítico com eventual fibrose. As causas da presença de inflamação variam, sendo

reportada colonização ou presença de toxinas bacterianas ou exposição de antígenos foliculares (MULINARI-BRENNER, SEIDEL e HEPP, 2011).

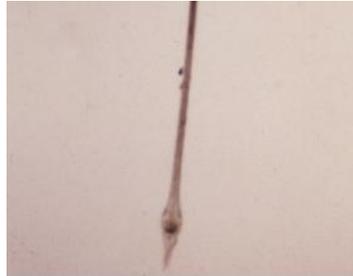
2.3 Tratamento da Alopecia

O principal desafio do tratamento da alopecia, androgenética ou areata, é reduzir o infiltrado inflamatório já estabelecido e prevenir tanto a recorrência quanto o surgimento de novas placas alopécicas, no caso da alopecia areata (GILHAR, ETZIONI e PAUS, 2012). Segundo GORDON e TOSTI (2011), os tratamentos atualmente disponíveis podem induzir o crescimento do cabelo, mas nunca foi provada na literatura, a mudança no curso da doença, especialmente nos casos mais graves (ADIL e GODWIN, 2017; GILHAR, ETZIONI e PAUS, 2012; GORDON e TOSTI, 2011; LIU *et al.*, 2017).

A aplicação de anti-inflamatórios esteroides intralesionais, como o acetato de triancinolona na concentração de 2,5 a 5 mg/mL, um tratamento invasivo e extremamente desconfortável para o paciente, é o tratamento de primeira escolha nos casos de alopecia areata uni ou multifocal, podendo ainda ser usado em casos mais graves associada a outros tratamentos (STRAZZULLA *et al.*, 2018). A taxa de sucesso do tratamento é variável, no entanto há evidências que sugerem que o tratamento com anti-inflamatórios esteroidais intralesionais tem maiores taxas de sucesso em pacientes mais novos, que tem alopecia há menos tempo e em áreas menores, assim como naqueles que apresentam sinais de inflamação nos folículos tais como pelos em ponto de exclamação (**Figura 7**) (STRAZZULLA *et al.*, 2018). Podem ocorrer efeitos adversos como atrofia da epiderme no local da inflamação, que pode ser evitada com ajuste da dose ou revertida após descontinuação da terapia, e há ainda um pequeno risco de aumento da pressão intraocular, glaucoma e catarata quando a aplicação é

feita próxima aos olhos, por exemplo na região das sobrancelhas (STRAZZULLA *et al.*, 2018).

Figura 7: pelo em ponto de exclamação ou pelo peládico.



O uso de anti-inflamatórios esteroidais em formulações tópicas é mais bem aceito pelos pacientes, principalmente os pediátricos, sendo usados diversos tipos de formulação como géis; loções e cremes, assim como diferentes ativos, incluindo mometasona, fluocinolona e proprionato de clobetasol, sendo reportado o crescimento capilar em até 89% da área tratada (STRAZZULLA *et al.*, 2018). Os efeitos adversos dessa terapia incluem prurido suave, queimação, erupção acneiforme que pode estar associada a excipientes comedogênicos em pomadas e cremes, estrias, telangiectasia e atrofia da pele (STRAZZULLA *et al.*, 2018).

Anti-inflamatórios esteroides sistêmicos, utilizados diária, semanal ou mensalmente apresentam variável sucesso na indução de recrescimento e redução da perda de cabelo em pacientes na fase aguda. (TOSTI, PIRACCINI e SOLI, 2001). Strazzulla LC e colaboradores (2018) cita um estudo que avaliou a eficácia do uso de prednisona 0,8 mg/kg durante 6 meses em 32 pacientes, no qual 47% dos pacientes, alguns com mais de 75% de perda capilar, mostraram recrescimento capilar em mais de 25% da área afetada (OLSEN, CARSON e TURNEY, 1992 apud STRAZZULLA *et al.*, 2018).

A utilização de esteróides sistêmicos é limitada pela ocorrência frequente de recaídas após o fim do tratamento (TOSTI, PIRACCINI e SOLI, 2001), e efeitos

adversos graves que impedem o uso contínuo, como supressão do eixo pituitária e adrenal, efeitos no crescimento ou integridade óssea, alterações oculares e piora de hipertensão ou diabetes (STRAZZULLA *et al.*, 2018).

A imunoterapia tópica com difenilciclopropenona ou dibutiléster de ácido esquárico é uma boa opção em alopecia grave, incluindo alopecia total e universalis (GORDON e TOSTI, 2011). O objetivo do tratamento é induzir a dermatite de contato suave no couro cabeludo, ou seja, é um tratamento desconfortável para o paciente (GORDON e TOSTI, 2011). Apesar disso, a eficácia da difenilciclopropenona tem sido comprovada por estudos que demonstraram o crescimento do cabelo limitado à metade tratada (GORDON e TOSTI, 2011).

Alguns grupos de pesquisa, baseados em descobertas recentes dos mecanismos fisiopatológicos do desenvolvimento da alopecia areata, têm proposto abordagens usando inibidores de Janus quinase (JAK) para o tratamento desta doença (HAREL *et al.*, 2015; LIU *et al.*, 2017). Estudos com formulações orais e tópicos de tofacitinib e barbacitinib mostraram resultados promissores e em estudo, Liu e colaboradores (2017) mostraram que o tratamento oral por 4 a 18 meses com tofacitinib alcançou resposta clinicamente satisfatória em 77% dos pacientes, incluindo pacientes com casos graves de alopecia areata, total e universal (LIU *et al.*, 2017). Os efeitos adversos desse tipo de terapia incluem aumento da ocorrência de infecções, dor de cabeça, acne, fadiga, ganho de peso, leucopenia e aumento dos níveis séricos de triglicerídeos, colesterol total e colesterol de baixa densidade (LIU *et al.*, 2017).

Em complementação aos tratamentos, há reportado na literatura o uso de fitoterápicos para tratamento da alopecia. Segundo Chung e colaboradores (2017), um complexo herbal composto por *Houttuynia cordata*, *Perilla frutescens* e chá verde,

tem sido usado tradicionalmente em países asiáticos, especialmente na Coreia do Sul, para o tratamento por via oral de pacientes com alopecia (CHUNG *et al.*, 2017). O estudo controlado em animais mostrou que o uso do complexo, já disponível comercialmente na Coreia, é capaz de promover o crescimento capilar de pelos em fase anágena, provavelmente por modulação de IGF-1 e TGF- β 1 (CHUNG *et al.*, 2017).

Loções capilares contendo Pilocarpina, uma substância presente em extratos de folhas de Jaborandi, têm seu uso relatado isoladamente ou em associação com outros ativos (MEIDAN e TOUITOU, 2001). A Pilocarpina é um agonista de acetilcolina e, portanto, causa vasodilatação via liberação de óxido nítrico. Ainda, já foi depositada uma patente abordando o uso de extratos de *Hypericum erectum* para o tratamento de queda capilar, sendo o mecanismo de ação também baseado na propriedade vasodilatadora dos extratos (KAO CORPORATION, 1995). Dados da literatura mostram que a terapia a base de plantas tem grande potencial, mas são necessários estudos mais aprofundados para suportar as evidências observadas clinicamente (MEIDAN e TOUITOU, 2001).

Não obstante às diversas formas de tratamento até o momento descritas, as únicas aprovadas pelo FDA, para o tratamento de alopecia, são aquelas empregando medicamentos contendo o Minoxidil ou a Finasterida, do ponto de vista químico, e ainda o tratamento por meio de *low-level laser light therapy*, do ponto de vista físico (CHUNG *et al.*, 2017; NAGASAWA *et al.*, 2016).

A Finasterida, aprovada pelo FDA, pela ANVISA e pela maioria dos países Europeus para tratamento da alopecia androgenética, tem sido usada em homens em estágios iniciais de alopecia androgenética (Chung *et al.*, 2017; Tosti, Piraccini e Soli, 2001). Sendo um inibidor da 5 α -redutase, responsável pela conversão de testosterona

em diidrotestosterona, já foi demonstrada a capacidade da finasterida de aumentar o crescimento capilar em homens, observando-se inclusive aumento da quantidade de cabelo nas regiões frontal e do vértex do couro cabeludo (GOODMAN *et al.*, 2007). A principal preocupação em relação ao seu uso está relacionada à ocorrência de efeitos adversos sexuais graves em 0,5 a 2% dos pacientes (GOODMAN *et al.*, 2007). Além disso, a finasterida não deve ser usada por mulheres em idade fértil devido à ocorrência de anormalidades em fetos do sexo masculino quando o medicamento é usado em gestantes (GOODMAN *et al.*, 2007). A descontinuação do uso da finasterida resulta em interrupção do efeito desejado (GOODMAN *et al.*, 2007; TOSTI, PIRACCINI e SOLI, 2001).

O uso do Minoxidil para tratamento de alopecia areata ou androgenética se iniciou pela observação de aumento do crescimento capilar como um efeito adverso do produto quando usado oralmente para tratamento de hipertensão (RANUGHA e BETKERUR, 2018; SEMALTY *et al.*, 2011). O minoxidil administrado por via oral reduz a pressão arterial por relaxamento do músculo liso vascular. O seu metabólito sulfatado, o sulfato de minoxidil, atua abrindo canais de potássio sensíveis à adenosina trifosfato (ATP) promovendo vasodilatação e conseqüente redução da pressão arterial (SEMALTY *et al.*, 2011).

Quando o minoxidil é usado topicamente, a conversão para a forma ativa sulfatada ocorre em maior proporção nos folículos pilosos em relação à pele adjacente, favorecendo sua atuação no crescimento capilar (RANUGHA e BETKERUR, 2018). O mecanismo de ação do minoxidil para promoção de crescimento capilar ainda não é elucidado, no entanto propõe-se que o efeito decorra por mecanismos diversos. A abertura de canais de potássio sensíveis a ATP promove vasodilatação e redução da entrada de cálcio nas células do folículo capilar,

prevenindo a inibição do crescimento capilar induzida por fator de crescimento epidérmico. O minoxidil também aumenta a quantidade local de ATP, o que promove liberação de adenosina, que estimula o fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), um promotor do crescimento do cabelo. O minoxidil ainda ativa a prostaglandina sintase-1 citoprotectora, uma enzima que pode estimular o crescimento do cabelo. E além disso, o minoxidil aumenta a expressão do m-RNA de factor de crescimento de hepatócitos (HGF), outro promotor de crescimento de cabelo capilar (RANUGHA e BETKEKUR, 2018)

O uso do minoxidil tópico resulta em alguns efeitos adversos que, por vezes determinam a necessidade de descontinuar o tratamento (SEMALTY *et al.*, 2011). Estes efeitos incluem prurido e formigamento, dores de cabeça, vertigem e até irregularidades cardíacas, especialmente da frequência cardíaca (RANUGHA e BETKEKUR, 2018; SEMALTY *et al.*, 2011). Embora aparentemente seguro quando esfregado no couro cabeludo, uma vez que apenas uma pequena quantidade é absorvida sistemicamente, o minoxidil é um vasodilatador e por isso seu uso não é recomendado em pessoas com problemas cardíacos (RANUGHA e BETKERUR, 2018).

Há relatos do sucesso do tratamento de alopecia areata e androgenética com soluções alcoólicas de minoxidil a 2 ou 5% aplicadas duas vezes ao dia (SEMALTY *et al.*, 2011). A redução da aplicação para uma vez ao dia já é o suficiente para desencadear recaída com perda capilar (SEMALTY *et al.*, 2011), enquanto a descontinuação do uso induz um eflúvio telógeno, que é a entrada precoce dos fios na fase telógena (fase de repouso à qual se segue queda capilar). Dessa forma, após cerca de 1 a 6 meses do fim do tratamento, observa-se perda capilar acentuada e

difusa, com retorno ao quadro precedente ao tratamento (SEMALTY *et al.*, 2011; MEIDAN e TOUITOU, 2001).

Resumidamente, angiogênese, antagonismo androgênico, inibição de processo inflamatório e inibição da 5 α -redutase e vasodilatação, são as estratégias não-cirúrgicas mais usadas para o tratamento de alopecia (CHUNG *et al.*, 2017; SEMALTY *et al.*, 2011).

Sabe-se que a redução do aporte sanguíneo periférico, tem como primeiro sinal a perda de cabelo, e também é conhecido que o fluxo sanguíneo subcutâneo está significativamente reduzido em pacientes nos estágios iniciais da alopecia, principalmente da alopecia androgenética (KLEMP e PETERS, 1989; VAROTHAI e BERGFELD, 2014).

Apesar da distinta fisiopatologia, fármacos vasodilatadores têm se mostrado eficazes no tratamento de ambas as formas de alopecia, ou ainda se mostraram capazes de aumentar os resultados de outras terapias quando usados em associação (NAGASAWA *et al.*, 2016; VAROTHAI e BERGFELD, 2014).

Assim, terapias que abordem tratamentos que possam conduzir a uma maior adesão do paciente e ocasionar melhora dos sintomas da alopecia são preferidas. Talvez, dentre estas abordagens, a mais conservadora e menos susceptível a efeitos colaterais indesejados ao paciente seja a utilização de fármacos vasodilatadores. Nos casos mais graves, a associação de vasodilatadores a outros tratamentos poderia permitir redução de doses, com provável redução de efeitos adversos, mas ao mesmo tempo aumentando significativamente os resultados clínicos alcançados.

Para isso, é necessário que os fármacos sejam veiculados em formas farmacêuticas adequadas a fim de viabilizar o transporte pela via mais difícil de

penetração no corpo humano: a via transdérmica, onde o objetivo principal é atingir sítios de ação sistêmica ou, no caso da alopecia, no maior órgão do corpo humano: a pele.

3 JUSTIFICATIVA

Avaliando o disposto acima, podemos inferir que um dos motivos do não sucesso dos tratamentos disponíveis, é a falta de adesão do paciente devido ao desconforto gerado por alguns tratamentos, seja pelo modo de aplicação ou por efeitos adversos frequentes. Ainda, os tratamentos menos invasivos disponíveis mostram recaídas após o término do tratamento além de demasiados e graves efeitos adversos.

O tratamento com uma formulação tópica contendo uma substância química vasodilatadora e inibidora da ECA2, e de rápida depuração possui características interessantes tendo, portanto, potencial para ser utilizado no tratamento da alopecia.

4 OBJETIVOS

4.1 Objetivo geral

- Desenvolvimento e caracterização de sistema polimérico do tipo gel-creme transdérmico para liberação de substância química vasodilatadora hidrofílica na pele.

4.2 Objetivos específicos

- Desenvolver e validar métodos analíticos para quantificação de substância teste em estudos de desempenho de formulação farmacêutica.
- Desenvolver um gel-creme transdérmico para liberação da substância teste.
- Caracterizar físico-quimicamente o gel-creme transdérmico pelas técnicas de determinação de densidade de massa e densidade relativa, avaliação da estabilidade física, determinação do pH, viscosidade e espalhabilidade, com e sem a substância teste.
- Determinar o perfil de liberação da substância teste pelas formulações obtidas em estudo *in vitro* em célula de Franz com membrana de acetato de celulose hidrofílica.

CAPÍTULO I

**DESENVOLVIMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE UM SISTEMA DE
LIBERAÇÃO TRANSDÉRMICA DE SUBSTANCIA QUÍMICA HIDROFÍLICA
COM POTENCIAL VASODILATADOR PARA TRATAMENTO DA ALOPÉCIA**

5 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA DO CAPÍTULO I

5.1 Uso tópico de medicamentos

A aplicação tópica de medicamentos tem sido usada para o tratamento de diversas patologias, sendo a eficácia diretamente relacionada à permeação do ativo nas camadas mais internas da pele (ROSSI *et al.*, 2008). Um sistema de veiculação de fármacos deve considerar todas as características da substância ativa veiculada assim como o objetivo terapêutico. Assim, para o tratamento tópico de doenças é necessário que a formulação seja conveniente para o uso pelo paciente, assim como seja capaz de veicular os ativos até o local de ação na pele. Para isso, por vezes se faz necessário vencer temporariamente as barreiras de proteção da pele.

Os maiores desafios à permeação de substância através da pele são: (1) o caráter hidrofílico dos fármacos ou uso de peptídeos e macromoléculas, (2) irritação e sensibilidade quando ocorre uma perturbação muito grande do estrato córneo e (3) absorção variada em condições de pele diferentes, tais como feridas (AGHAZADEH-HABASHI *et al.*, 2015). Abordagens farmacotécnicas diferentes devem ser abordadas de acordo com o insumo farmacêutico ativo que se deseja veicular, assim como o local de aplicação da formulação.

A viabilidade de permeação cutânea de fármacos depende de vários fatores, como a concentração do fármaco no veículo e as propriedades físico-químicas da substância, como massa molecular, solubilidade, coeficiente de partição (estrato córneo/veículo) e constante de dissociação (SWARBRIC, 2007; ANSEL, POPOVICH e ALLEN, 2000; PRISTA *et al.*, 2006). A solubilidade do fármaco determina a concentração a ser alcançada no local de absorção, enquanto o coeficiente de partição determina a velocidade de transporte entre uma camada e outra (ANSEL, POPOVICH e ALLEN, 2000). Existem na pele barreiras tanto hidro quanto lipofílicas

sugerindo que compostos com coeficientes de partição entre 1 e 3, ou seja, capazes de dissolver tanto em óleo como em água teriam permeação mais rápida (SWARBRIC, 2007). Sabe-se ainda que substâncias com baixo peso molecular têm facilidade de permear a pele (AGHAZADEH-HABASHI *et al.*, 2015).

A permeação cutânea de um fármaco enfrenta duas barreiras principais, são elas o estrato córneo e a película lipídica que está sobre a epiderme. Uma vez vencidas essas barreiras, o fármaco alcança as camadas seguintes e pode ser encontrado, mesmo que em pequenas quantidades no aparelho vascular papilar (PRISTA *et al.*, 2003).

A permeação pode ainda ocorrer por meio de apêndices da pele, incluindo as glândulas sebáceas e os folículos pilosos. Este tipo de permeação não costuma ser abordada em formulações transdérmicas uma vez que os apêndices representam apenas cerca de 0,1 a 1,0% da área total da pele. No entanto, esta distribuição não é uniforme, sendo a quantidade de folículos pilosos consideravelmente maior no couro cabeludo (SWARBRIC, 2007).

Na invaginação presente em cada folículo piloso, a camada córnea se torna menos espessa, sendo que na base do folículo é encontrada apenas uma camada de células não queratinizadas. Por esse motivo, a permeação cutânea de fármacos é maior nos folículos pilosos. Em menor grau, ocorre a permeação transepidérmica. Tendo isso em vista, uma vez vencida a barreira interposta pelo sebo presente no folículo piloso, há grande chance de uma substância alcançar a derme (PRISTA *et al.*, 2003).

Alguns compostos têm capacidade intrínseca de atravessar a pele, sendo esta característica diretamente relacionada ao coeficiente de partição dos mesmos (PRISTA *et al.*, 2003). Compostos polares atravessam muito mais rapidamente as

camadas da epiderme e da derme do que o estrato córneo (EICHNER *et al.*, 2017; PRISTA *et al.*, 2003). Isso é justificado pela composição da camada mais externa, que é essencialmente ácidos gordos e colesterol, sendo a quantidade de água muito baixa, variando entre 7 e 20%. (EICHNER *et al.*, 2017; PRISTA *et al.*, 2003). Assim, compostos hidrofílicos, que não terão capacidade intrínseca de atravessar o estrato córneo, podem ser veiculados em sistemas que provoquem uma desestabilização nesta barreira inicial por intermédio de artifícios farmacotécnicos (PRISTA *et al.*, 2003).

A queratina, presente também em grande quantidade no estrato córneo, é higroscópica e quando há uma grande quantidade de água presente, a queratina é capaz de fixá-la e, por consequência, amolece (ANSEL, POPOVICH e ALLEN, 2000; PRISTA *et al.*, 2003). A evaporação da água fixada é controlada conforme a circunstância e a necessidade fisiológica da pele. Compostos muito polares se difundem rapidamente na água presente na forma livre, enquanto compostos menos polares têm mais afinidade pela água presente em coacervados (ANSEL, POPOVICH e ALLEN, 2000; PRISTA *et al.*, 2003).

Uma formulação capaz de aumentar a retenção cutânea de água poderia, portanto aumentar a quantidade de água presente no estrato córneo e possivelmente aumentar a permeação cutânea de fármacos hidrofílicos (ANSEL, POPOVICH e ALLEN, 2000; PRISTA *et al.*, 2003).

Soluções e loções são formas farmacêuticas líquidas para aplicação externa na pele (ANSEL, POPOVICH e ALLEN, 2000). Uma solução é composta por um veículo no qual os solutos estão meramente dissolvidos. As loções, por sua vez contêm pós finos em suspensão ou uma fase líquida imiscível dispersada por emulsificantes. Ambas as formas farmacêuticas são, com frequência, aquosas (

ANSEL, POPOVICH e ALLEN, 2000). A baixa viscosidade dessas formas farmacêuticas dificulta sua aplicação em áreas bem delimitadas assim como reduzem a fricção ou massagem feitos pelo paciente após aplicação, o que diminui a permeação cutânea do ativo carregado (ANSEL, POPOVICH e ALLEN, 2000).

Uma alternativa a essa dificuldade são as formas farmacêuticas semissólidas como géis e cremes (ANSEL, POPOVICH e ALLEN, 2000). Géis são dispersões, aquosas ou não, de substâncias geralmente poliméricas com grande massa molecular capazes de formar macroagregados interpenetrados pelo veículo originando um aumento na viscosidade da formulação. (ANSEL, POPOVICH e ALLEN, 2000). Os cremes, por outro lado são emulsões O/A ou A/O viscosas. Cremes cuja fase externa é aquosa costumam ser preferíveis pois são mais fáceis de remover e mais agradáveis ao tato além de terem ótima espalhabilidade, características essas que não se encontram nos cremes A/O (ANSEL, POPOVICH e ALLEN, 2000, 2000).

Atualmente tem sido relatado o uso de géis transdérmicos para veiculação transdérmica de fármacos. Exemplos não exaustivos são glibenclamida, anti-hipertensivos, anti-inflamatórios, cafeína e extratos vegetais para o tratamento das mais diversas doenças (AHAD, AQIL e ALI, 2014; KANG e SHIN, 2010; KAUR, RAINA e SINGH, 2014; RANADE e GAUD, 2016).

Foram encontrados poucos estudos na literatura sobre a veiculação transdérmica de fármacos hidrofílicos, provavelmente em decorrência da dificuldade de permeação dos mesmos através da pele.

MA e colaboradores (2015), estudaram propriedades de veiculação transdérmica de cafeína e Rodamina B, substâncias hidrofílicas, por meio de microemulsão usando um gel de hidroxipropilcelulose como controle, tendo observado maior permeação através de pele de orelha de porco em célula de Franz pela

microemulsão em comparação ao gel (MA *et al.*, 2015). O gel formulado pelos autores continha apenas o ativo, o polímero e água, uma vez que foi usado como controle (MA *et al.*, 2015). O uso de um promotor de absorção poderia aumentar significativamente o perfil de liberação da formulação, permitindo a obtenção de uma formulação tópica transdérmica por meio de um processo muito mais simples e barato (MA *et al.*, 2015).

Um estudo de KAUR D e colaboradores (2014) avaliou a propriedade de aumento de absorção transdérmica de glibenclamida, uma substância hidrofóbica (KAUR, RAINA e SINGH, 2014), em gel de carbopol contendo propilenoglicol e ácido oleico como promotores de absorção. Em estudos de difusão através de membrana semipermeável foi observado que o aumento da concentração de propilenoglicol e ácido oleico aumentava a permeação da glibenclamida, sendo a formulação proposta um bom sistema de liberação transdérmica de fármacos hidrofóbicos (KAUR, RAINA e SINGH, 2014).

Até o momento, as descrições realizadas restringem a veiculação de uma ou outra formulação como gel ou como creme. Há a possibilidade farmacotécnica de se produzir uma formulação intermediária a estas duas formas farmacêuticas, em que é possível unir as melhores características de uma e de outra produzindo uma formulação mais completa: o gel-creme.

Um gel-creme é uma emulsão O/A em que, na fase aquosa externa há um polímero gelificante capaz de aumentar a viscosidade e, portanto, aumentar a estabilidade da emulsão e reduzir a quantidade necessária de fase oleosa na composição, melhorando suas características físicoquímicas e efeitos adversos locais, referentes a excesso de aplicação de óleos e lipídios, tais como comedogenicidade (ANSEL, POPOVICH e ALLEN, 2000; PRISTA *et al.*, 2006). Além disso, por conter

duas fases, o gel-creme permite a obtenção de formulações mais elaboradas e com melhor desempenho farmacotécnico.

5.2 Promotores de absorção

Considerando que o gel-creme desenvolvido visa a veiculação de uma substância química hidrofílica, se faz necessária a utilização de um promotor de permeação, uma vez que, conforme já citado, fármacos muito polares têm dificuldade em atravessar o estrato córneo (AGHAZADEH-HABASHI *et al.*, 2015; ENGELBRECHT *et al.*, 2012).

Há diversos veículos, lipofílicos e hidrofílicos usados em sistemas de veiculação transdérmica de fármacos com a finalidade de aumentar a absorção do fármaco, são exemplos oleato de etila, etanol, propilenoglicol e miristato de isopropila. Estes compostos aumentam a permeação dos fármacos no estrato córneo pelo aumento do coeficiente de partição pele/veículo e ainda alterando a barreira de proteção da pele (TUNTIYASAWASDIKUL *et al.*, 2014).

Estudos anteriores mostram que o miristato de isopropila em formulações semissólidas é capaz de aumentar significativamente a penetração de fármacos em pele humana (WIECHERS *et al.*, 2012; ZIDAN *et al.*, 2017).

Sabe-se que compostos muito hidrossolúveis são repelidos pela camada lipídica que fica sobre o estrato córneo e, portanto uma formulação exclusivamente com compostos dessa natureza não seria capaz de interagir com as camadas externas da epiderme. O miristato de isopropila é uma cera líquida conhecida por aumentar a taxa de permeação de fármacos através da pele quando presente em formulações tópicas. Embora seja uma molécula lipofílica, apresenta uma pequena

porção polar devido à presença do grupo éster (ENGELBRECHT *et al.*, 2012; PRISTA *et al.*, 2006).

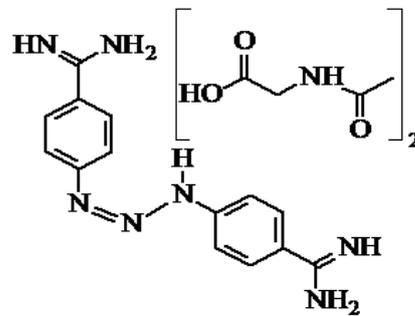
O miristato de isopropila atua como um agente de permeação por mecanismos ainda não esclarecidos. Sabe-se que após incorporação ao estrato córneo, ele é capaz de causar perturbação do arranjo lipídico multilamelar, possivelmente por interação com as cabeças polares dos lipídeos de membrana, provocando desordenamento do estrato córneo (EICHNER *et al.*, 2017; ENGELBRECHT *et al.*, 2012). Sabe-se também que o miristato de isopropila é capaz de liquefazer parcialmente as membranas intercelulares do estrato córneo (EICHNER *et al.*, 2017). Esses efeitos, em conjunto, resultam em redução da capacidade de barreira do estrato córneo, favorecendo a permeação de fármacos (EICHNER *et al.*, 2017; ENGELBRECHT *et al.*, 2012).

5.3 Benzamidas *para*-substituídas

O sistema Renina-Angiotensina (SRA), responsável pela regulação da pressão arterial e do equilíbrio hidroeletrólítico, é muito conhecido por sua associação a doenças cardiovasculares, tais como hipertensão e insuficiência cardíaca (FERRARIO, 2006). Estudos da literatura têm associado o SRA à regulação de processos inflamatórios e imunológicos, inclusive de autoimunidade (LV *et al.*, 2018; PLATTEN *et al.*, 2009; CAPETTINI *et al.*, 2012) associando-o inclusive a doenças como glaucoma, síndrome metabólica, distrofia muscular, neuropatia diabética, doenças inflamatórias e artrite reumatoide (ÇOBANKARA *et al.*, 2005; FOUREAUX *et al.*, 2016; LAUTRETTE *et al.*, 2005; TAN *et al.*, 2018). Ainda, estudos já demonstraram a presença de componentes do SRA em tecidos como cérebro, glândula adrenal, ovários, tecido adiposo visceral, coração e tecido vascular (SWARBRICK, 2007).

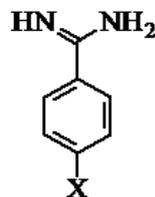
Namazi e colaboradores (2014) estudaram o envolvimento do SRA na fisiopatologia da alopecia areata, tendo encontrado uma atividade da enzima conversora de angiotensina 1 (ECA1) 17% maior no plasma dos pacientes com alopecia areata em comparação aos controles, apesar de não haver diferença estatisticamente significativa entre os grupos. Os autores inferem que este aumento da atividade da enzima conversora de angiotensina pode indicar envolvimento local do SRA na fisiopatologia da alopecia areata (NAMAZI *et al.*, 2014).

Figura 8: estrutura química do aceturato de diminazeno



Nosso grupo de pesquisa tem trabalhado (estudos ainda não publicados) com substâncias derivadas do aceturato de diminazeno (**Figura 8**), especialmente benzamidas *para*-substituídas (**Figura 9**).

Figura 9: estrutura química de uma benzamida *para*-substituída, onde X são grupos funcionais polares



O aceturato de diminazeno é relatado na literatura como um ativador da Enzima conversora de Angiotensina 2 (ECA2), responsável pela conversão de Angiotensina II em Angiotensina(1-7) (FOUREAUX *et al.*, 2013). O aumento da atividade da ECA2, pode aumentar a concentração local de Angiotensina(1-7) que, através do eixo

ECA2/Ang(1-7)/Mas, pode reduzir efeitos da Angiotensina II em receptores AT₁, tais como vasoconstrição acentuada, modulação do crescimento e atividade pró-inflamatória (FOUREAUX *et al.*, 2013).

Por outro lado, documentos de patente sobre o tema relatam que animais tratados com formulações contendo Ang(1-7) apresentaram crescimento de pelos significativamente maior em relação aos controles tratados somente com veículo, enquanto que o uso de um inibidor do receptor Mas reduz o crescimento de pelos, sugerindo então que a modulação do eixo ECA2/Ang(1-7)/Mas pode ser benéfica no tratamento de alopecia (DANIEL CAMPOS VILELA e cotitulares, 2015; UFMG, 2016).

Há relatos na literatura do uso de benzamidas como inibidores de serinoprotease (GADWAL *et al.*, 2014; SERINE *et al.*, 2017). Em estudos ainda não publicados, realizados por nosso grupo de pesquisa, um derivado *para*-substituído de benzamidas tem mostrado atividade biológica vasodilatadora. Esta substância será denominada como substância teste no presente trabalho e sua estrutura não será revelada por se tratar de propriedade intelectual em sigilo.

Levando em conta que a redução de processos inflamatórios e a vasodilatação podem ser benéficas no tratamento da alopecia, tanto androgenética como areata, e ainda, as evidências supracitadas de associação de mecanismos fisiopatológicos da alopecia areata com o SRA, hipotetiza-se que um tratamento tópico contendo a substância teste poderia ser benéfico no tratamento de alopecia.

Assim, a utilização de substâncias novas com atividade biológica promissora e o emprego de formas farmacêuticas que possibilitem uma fácil adesão ao tratamento e manipulação por parte do paciente com diminuição de efeitos colaterais sistêmicos se torna promissor no tratamento de doenças como a alopecia areata e androgenética.

Portanto, neste trabalho objetivou-se desenvolver um gel-creme contendo uma substancia vasodilatadora, a substância teste, para o potencial uso no tratamento da alopecia.

6 MATERIAIS E MÉTODOS

A proposta para o desenvolvimento do presente trabalho é a obtenção de um gel-creme a partir da mistura de um gel de base aquosa com um polímero derivado da celulose, a hidroxietilcelulose, e um creme de formulação simples obtido de cera autoemulsionante composta por álcool cetosteárico e álcool cetosteárico etoxilado. O gel-creme contém ainda um promotor de absorção, neste caso o miristato de isopropila, a substância teste, a glicerina como umectante, uma solução alcoólica de brometo de cetilmetilamônio como conservante e água.

6.1 Materiais

Para a realização dos experimentos descritos no presente capítulo, foram utilizados substância teste, fornecida pela Sigma-Aldrich (Islândia); hidroxietilcelulose, fornecida pela Denver-Cotia Indústria e Comércio Ltda. (Cotia, Brasil; ácido cetosteárico e ácido cetosteárico etoxilado fornecidos pela Oxiteno (São Paulo, Brasil); glicerina, fosfato de potássio monobásico anidro e fosfato de sódio dibásico anidro, fornecidos pela Synth (Diadema, Brasil), miristato de isopropila e brometo de cetilmetilamônio fornecidos pela Neon (São Paulo, Brasil); fitas UniversalIndikator[®] MColorpHast fornecidas pela Merk (Alemanha) e membrana de celulose hidrofílica com diâmetro de 47 mm e tamanho de poros de 0,45 µm fornecida pela Millipore[®] (EUA). Também foram utilizadas duas lâminas de vidro com peso aproximado de 5,0 gramas, pesos aferidos de 2, 5 e 10 gramas, uma folha de papel milimetrado, microcubetas de quartzo com caminho óptico de 1 cm, altura de 45 mm, e capacidade para 700 µL (SysCroma) e células de Franz de vidro com capacidade para 5 mL de solução acceptora.

Em todos os experimentos, foi utilizada água tratada por osmose reversa em aparelho água milliQ (Marca Millipore, modelo Direct-Q, Morshem, França). Demais

reagentes fazem parte da grade do laboratório e apresentam grau analítico não tendo sido purificados para sua utilização.

Os equipamentos utilizados foram o Agitador de hélice IKA® Eurostar modelo Power-basic (GROB-WERKE GmbH & Co. KG, Alemanha), Viscosímetro de Brookfield, modelo LVDVI+ (Brookfield Eng. Labs. Inc. Stoughton, EUA), microcentrífuga modelo Espresso Personal Microcentrifuge (Thermo Fisher Scientific Inc, EUA), o circulador de imersão com aquecimento modelo Ecoline E100 (LAUDA DR. R. WOBSE GmbH & Co. KG, Alemanha) e Espectrofotômetro UV-Visível modelo Evolution 201 (Thermo Fisher Scientific Inc, EUA).

6.2 Manipulação do gel-creme

Levando em conta a necessidade de uma formulação não irritante, preferencialmente com baixo teor de lipídeos e contendo um promotor de absorção para a substância química veiculada, um gel-creme composto por cera autoemulsionante não iônica na concentração de 6%, uma fase gel composta por um derivado de celulose não iônico e miristato de isopropila como promotor de absorção se mostra como um promissor veículo. Os excipientes usados, assim como a quantidade de cada componente foram definidos com base nas concentrações sugeridas no Handbook de excipientes farmacêuticos e em formulações sugeridas no Formulário Nacional da Farmacopéia Brasileira (ROWE, SHESKEY e QUINN, 2009; BRASIL, 2012). Os detalhes da formulação do gel creme desenvolvido estão apresentados no **Quadro 1**.

Para o preparo do gel-creme adicionou-se, em um béquer de volume adequado, o álcool cetoestearílico, o álcool cetoestearílico etoxilado e o miristato de isopropila, e aqueceu-se em banho maria até a completa fusão dos componentes. Sobre a mistura fundida, verteu-se 34,1 g de água a 80°C e então agitou-se a 1300

rpm com hélice do tipo “agitador dissolvente”, para obtenção de uma emulsão até o seu resfriamento à temperatura ambiente. Após arrefecimento, o creme formado foi reservado. Em outro béquer, de tamanho adequado, adicionou-se 43 g de água e aqueceu-se até aproximadamente 70°C. Neste béquer, sob agitação de 300 rpm com hélice do tipo “agitador de turbina”, foi adicionada lentamente a hidroxietilcelulose para obtenção de um gel. A agitação foi mantida por 10 minutos. Após arrefecimento, adicionou-se a este gel, a substância teste, a glicerina e a solução conservante sendo mantida agitação a 500 rpm por 5 minutos. Após a completa homogeneização do gel, o creme obtido anteriormente foi vertido sob o gel e a mistura foi agitada a 700 rpm por 10 minutos, com a mesma hélice usada para obtenção do gel.

Quadro 1: constituintes propostos para a formação do gel-creme produzido

Componente	Quantidade (g)	Porcentagem (%)
Álcool cetosteárico etoxilado	2,0 g	2
Álcool cetosteárico	4,0 g	4
Miristato de isopropila	10 g	10
Hidroxietilcelulose	0,84 g	0,84
Glicerina	5,0 g	5
Substância vasodilatadora	0,100 g	0,1
Solução conservante ^a	1,0 g	1
Água	qsp 100 g	qsp 100

^a A solução conservante consiste em uma solução alcóolica a 5 g/mL de brometo de cetilmetilamônio

6.3 Avaliação da estabilidade física

A estabilidade física do gel-creme foi avaliada pelo teste da centrífuga (FRIEDRICH *et al.*, 2007) em que foram adicionados cerca de 1,5 mL de gel-creme em tubos de microcentrífuga de 2,0 mL. Estes tubos foram submetidos à centrifugação por 30 minutos a 5000 rpm em microcentrífuga. Decorrido o tempo determinado não deve ser perceptível qualquer separação de fases, pois isso indicaria a ocorrência de floculação ou coalescência (PRISTA *et al.*, 2003). O teste foi realizado em triplicata.

6.4 Mensuração de densidade de massa e densidade relativa

A densidade, de massa e relativa, foi determinada de acordo com o método do picnômetro descrito na Farmacopeia Brasileira, 5ª edição (BRASIL, 2010). O picnômetro utilizado foi o de alumínio. O teste foi realizado em triplicata.

A massa da amostra foi calculada através da diferença entre o peso do picnômetro cheio e vazio. A partir dessa massa calculou-se a densidade relativa da amostra (**Equação I**), que é a razão de sua massa pela massa de igual volume de água:

$$d_{20}^{20} = \frac{m_{\text{amostra}}}{m_{\text{água}}} \quad \text{Equação I}$$

Onde d_{20}^{20} é a densidade relativa a 20°C, e m é a massa (BRASIL, 2010).

A partir do valor de densidade relativa (d_{20}^{20}) se obtém o valor da densidade de massa, de acordo com a **Equação II**:

$$\rho_t = d_{\text{água}} \times d_{20}^{20} + 0,0012 \quad \text{Equação II}$$

Onde ρ_t é a densidade de massa da amostra, $d_{\text{água}}$ é a densidade da água a 20°C e d_{20}^{20} é a densidade relativa da amostra a 20°C (BRASIL, 2010).

6.5 Aferição do pH de superfície

O pH de superfície das formulações foi determinado de acordo com o método colorimétrico descrito na Farmacopeia Brasileira, 5ª edição (BRASIL, 2010).

Com uma seringa de 1 mL, adiciona-se 0,1 mL de amostra à um vidro de penicilina e em seguida adiciona-se 1,0 mL de água mili-Q. Em seguida a solução é homogeneizada e o pH aferido com fitas indicadoras. O teste foi realizado em triplicata.

6.6 Determinação da viscosidade do gel-creme

A viscosidade da formulação foi determinada em viscosímetro de Brookfield de acordo com o método descrito na Farmacopeia Brasileira, 5ª edição (BRASIL, 2010).

Nesse método adiciona-se a amostra a ser analisada ao recipiente apropriado até a marca indicadora e programa-se o aparelho de acordo com a rotação a ser testada e, em seguida, imerge-se o *spindle* na amostra e aciona-se o aparelho. Foi utilizado o *spindle* de número 31, usando o adaptador para pequenas amostras. As rotações testadas foram aquelas apropriadas para se obter valores mensuráveis pelo aparelho, ou seja, com o torque entre 10 e 90%, sendo que valores precisos foram considerados aqueles com o torque entre 30 e 70%. As leituras foram realizadas em temperatura controlada a 20°C.

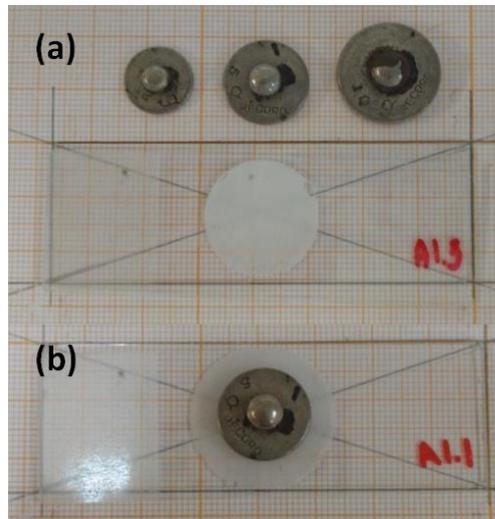
Quando em condições apropriadas, o valor da viscosidade começa a crescer até que se atinge um valor máximo que depois começa a cair. Este valor máximo é o valor da viscosidade para a rotação programada. O teste foi realizado em triplicata.

6.7 Determinação da espalhabilidade do gel-creme

A espalhabilidade foi determinada pelo método da lâmina de vidro descrito por Souza (2007) e aprimorado por esse mesmo grupo de pesquisa (CRUZ, 2013; SOUZA, 2007).

Em uma folha de papel milimetrado traçaram-se os lados de uma lâmina de vidro assim como suas diagonais para marcação do ponto central. Com o auxílio do desenho feito e de uma pipeta, foram colocados 10 mg de gel-creme (0,01mL) no centro da lâmina. Em seguida, a outra lâmina de vidro, de peso equivalente a 5 g, foi posicionada, suavemente sobre a gota de gel-creme depositada. (**Figura 10a**)

Figura 10: a) demonstração da coloca o da lâmina de peso aferido em 5 gramas sobre a gotícula de gel. Acima das placas estão os pesos de massas aferidas em 2, 5 e 10 gramas, respectivamente;(b) a forma como os pesos são colocados por cima da lâmina.



Imediatamente e após um minuto, o raio do círculo formado foi medido. Sobre a lâmina de vidro superior foi colocado um peso aferido de 2 gramas, sendo o raio do círculo formado aferido após um minuto. O mesmo procedimento foi seguido com pesos aferidos de 5 e 10 gramas, nesta ordem, posicionando-os sobre a segunda lâmina de vidro (**Figura 10b**). O raio foi medido sempre um minuto após o posicionamento do peso.

As áreas m dias das superfícies correspondentes foram calculadas por meio da Equa o III:

$$A = \pi \cdot r^2 \quad \text{Equa o III}$$

Onde A   a área, π   3,14 e r o raio médio da circunferência proveniente do espalhamento da formula o (SOUZA, 20017; CRUZ, 2013).

O gráfico de espalhabilidade, onde y   a espalhabilidade em mm² e x o peso em gramas, foi obtido com as m dias das áreas. O teste foi realizado em triplicata.

6.8 Doseamento

O doseamento do fármaco foi realizado por método espectrofotométrico desenvolvido e validado conforme descrito no capítulo 2 deste trabalho.

Em balão volumétrico de 10 mL, adicionou-se com o auxílio de uma seringa, aproximadamente 0,1000 g de formulação e o valor exato foi anotado. O gel-creme foi então dissolvido em tampão fosfato pH 5,9 por meio de agitação vigorosa e o volume foi completado com o mesmo solvente. Uma alíquota foi retirada, filtrada em microfiltro PES com tamanho de poro de 0,22 μm , e submetida à leitura em espectrofotômetro em 293 nm em microcubeta de quartzo. Foi usada solução tampão fosfato pH 5,9 como branco. O teste foi realizado em triplicata.

6.9 Teste de liberação *in vitro*

O ensaio de liberação *in vitro* do gel foi realizado em aparato de vidro denominado *Vertical Diffusion Franz Cell*, ou célula de Franz.

Foram utilizadas células de difusão de Franz de vidro de 15 mm com dois compartimentos, o doador superior e o receptor inferior. O compartimento receptor inferior apresenta capacidade para um volume de 5 mL de solução aceptora. A célula conta ainda com um braço de amostragem e camisas de circulação de água para padronização da temperatura. A solução aceptora usada foi tampão fosfato pH 5,9. A cada amostragem retirada para quantificação, todo o volume do compartimento receptor foi coletado e substituído por tampão fosfato pH 5,9 recém-preparado. Esta metodologia visa manter a condição “*sink*”, ou seja, garantir que haja concentração zero da substância a ser dosada/formulação no compartimento inferior. A membrana usada foi de acetato de celulose com tamanho de poros de 0,45 μm com diâmetro de 27 mm.

O sistema de célula de Franz foi montado com estabilização de temperatura em $37,0 \pm 0,5$ °C. A membrana de celulose hidrofílica anteriormente descrita foi utilizada como simulador da pele. O gel-creme em teste foi colocado na porção superior da membrana, já posicionada na câmara doadora da célula de difusão, a qual foi então ocluída com parafilme. O fluido receptor foi colocado no outro lado da membrana até completar o volume total da câmara, sendo removidas todas as bolhas. Durante todo o ensaio foram mantidas a circulação de água a $37,0 \pm 0,5$ °C nas camisas das células e a agitação magnética na solução receptora. A difusão do fármaco através da membrana foi monitorada por quantificação do fármaco nas amostras recolhidas sequencialmente do fluido receptor, por espectrometria no UV. Foram realizados ensaios de liberação com amostras coletadas em 30, 60, 90, 120, 180, 240, 300, 360, 420, 480, 540, 600 minutos e 24 horas.

7 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Existem diversas composições de ceras auto-emulsionantes propostas no Handbook de excipientes farmacêuticos (ROWE, SHESKEY e QUINN, 2009), e no Formulário nacional da Farmacopéia Brasileira (BRASIL, 2012), tanto iônicas quanto não-iônicas. Uma cera auto-emulsionante não iônica é, segundo o USP32-NF27, uma mistura de álcool cetosteárilico e derivados de polioxietileno de um éster de ácido graxo ou de sorbitano, como o álcool cetosteárilico etoxilado, sendo notável a existência de diversas ceras autoemulsionantes similares compostas por diferentes surfactantes não iônicos e álcoois de ácidos graxos.

O álcool cetosteárilico etoxilado, também conhecido como *Ceteareth-20*, $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{15}(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_y\text{OH}$ em que y varia de 10 a 60, é um surfactante não iônico usado em formulações farmacêuticas tópicas, especialmente em emulsões O/A (ROWE, SHESKEY e QUINN, 2009). Seu uso ainda inclui a solubilização de componentes lipossolúveis em veículos aquosos (ROWE, SHESKEY e QUINN, 2009).

O álcool cetosteárilico é uma mistura de álcoois alifáticos sólidos sendo pelo menos 90% composto por uma mistura de álcool estearílico ($\text{C}_{18}\text{H}_{38}\text{O}$) e álcool cetílico ($\text{C}_{16}\text{H}_{34}\text{O}$), sendo a proporção entre eles variável em torno 50 a 70% de álcool estearílico e 20-35% de álcool cetílico (ROWE, SHESKEY e QUINN, 2009). O álcool cetosteárilico é usado em formulações farmacêuticas tópicas para aumento de viscosidade e como co-emulsionante em emulsões O/A, sendo capaz de aumentar a estabilidade de emulsões diminuindo a quantidade de surfactante necessária (ROWE, SHESKEY e QUINN, 2009).

A cera autoemulsionante proposta para o gel-creme foi formulada visando a menor concentração possível de fase oleosa, que fosse estável fisicamente e suficiente para solubilizar o miristato de isopropila a 10%.

Dentre os polímeros gelificantes não iônicos mais utilizados estão os derivados da celulose, especialmente a hidroxietilcelulose, um polímero não iônico, solúvel em água e extensivamente usado em formulações tópicas em concentrações de 1 a 5% (ROWE, SHESKEY e QUINN, 2009; Brasil, 2012). A concentração de 0,84% objetivou a obtenção de um gel a 1% na fase externa do gel-creme, visando a estabilidade da formulação assim como um perfil reológico adequado à aplicação na pele. Foram testadas concentrações de hidroxietilcelulose de 1 a 2%, sendo escolhida a maior pela facilidade de espalhamento na pele, consequência de sua menor viscosidade.

Também foi incluída na formulação a glicerina a 5% (p/p) como agente umectante e emoliente. A Glicerina tem sido usada em formulações para uso tópico, inclusive como co-solvente em géis e emulsões e, portanto, não se espera que sua presença seja capaz de desestabilizar a malha polimérica ou a emulsão formadas (ROWE, SHESKEY e QUINN, 2009). Ainda, a glicerina não tem relatada capacidade de perturbar a barreira do estrado córneo, sendo possível seu uso juntamente com o miristato de isopropila sem expectativa de demasiada irritação, como poderia ocorrer caso fosse utilizado, por exemplo, o propilenoglicol (ROWE, SHESKEY e QUINN, 2009). Apesar disso, a sua capacidade emoliente pode aumentar a retenção de água da epiderme e aumentar a permeação de substâncias hidrofílicas.

Foi usada também uma solução alcoólica de brometo de hexadeciltrimetilamônio como solução conservante a 1% (p/v) (ROWE, SHESKEY e QUINN, 2009). Inicialmente foi utilizada a solução conservante de parabens descrita no Formulário Nacional da Farmacopéia Brasileira (BRASIL, 2012). Por serem substâncias aromáticas disubstituídas, os parabens apresentam expressiva absorção na região do ultravioleta (UV), o que impossibilitou a validação de um método de quantificação da substância teste por espectrometria UV na presença de

parabenos. Por isso, utilizou-se uma solução conservante que consiste em uma solução alcóolica a 5g/mL de brometo de cetilmetilamônio (ROWE, SHESKEY e QUINN, 2009).

A obtenção da formulação foi dividida em três etapas: obtenção do creme, obtenção do gel e incorporação do creme ao gel, respectivamente.

Para a obtenção do creme foi utilizado um agitador dissolvente, que proporciona um fluxo radial na preparação. Este fluxo tem a função de deslocar o material a ser misturado do topo para o fundo enquanto gera alta turbulência e altas forças de cisalhamento. Este efeito gera uma redução de partículas e formação das micelas. Este tipo de agitador é o ideal para obtenção de emulsões.

Para obtenção do gel, assim como para a incorporação do creme ao gel optou-se pelo agitador de turbina. Este agitador é utilizado para deslocar o material a ser misturado a partir da parte de cima enquanto gera fluxo axial no frasco. Como gera forças de cisalhamento mínimas é o ideal para manipulação de géis, pois reduz o risco de cisalhamento das malhas poliméricas quando utilizado em velocidades de média a alta. A obtenção inicial do gel foi possível em velocidade baixa, em torno de 300 rpm. No entanto à medida que a viscosidade da formulação aumenta, devido à formação do gel ou incorporação do creme, é necessário aumentar a velocidade de agitação, sendo que os ajustes foram feitos para 500 e 700 rpm, respectivamente.

Com estas etapas, foi possível obter a formulação gel-creme proposta no **Quadro 1** de forma estável e reprodutível. Uma vez terminada a fase de preparação do gel, procedeu-se aos testes de caracterização da formulação.

7.1 Estabilidade física

Conforme já descrito anteriormente, um gel-creme é essencialmente uma emulsão O/A em que a fase externa, ao invés de ser água, passa a ser um gel, no caso, uma solução aquosa contendo hidroxietilcelulose. A formação das emulsões envolve a agitação vigorosa de duas fases imiscíveis na presença de tensoativos, com a intenção de formar gotículas ou micelas (LACHAMAN; LIEBERMAN; KANIG, 2001). Os tensoativos são moléculas anfifílicas capazes de interagir com ambas as fases, reduzindo a tensão superficial e, portanto, estabilizando as gotículas formadas (LACHAMAN; LIEBERMAN; KANIG, 2001). Esta estabilidade alcançada deve ser mantida ao longo do tempo, sendo necessário o correto planejamento farmacotécnico de forma a impedir que ocorra floculação, coalescência ou separação de fases (PRISTA *et al.*, 2003).

A floculação ocorre quando várias gotículas se aglomeram formando agregados ou flóculos que, por diferença de densidade podem sedimentar ou se deslocar para a superfície da emulsão (PRISTA *et al.*, 2003). A formação desses agregados leva à perda de homogeneidade da formulação, tanto no aspecto quanto na distribuição da substância ativa, o que não é de forma alguma desejável em um medicamento (PRISTA *et al.*, 2003). O processo de floculação poderia ser revertido pela simples agitação da formulação, mesmo assim sua ocorrência é indesejada (PRISTA *et al.*, 2003).

A coalescência, por sua vez, é um processo irreversível em que as gotículas se aderem umas às outras, reagrupando-se (PRISTA *et al.*, 2003). Uma vez iniciada a coalescência, o processo evolui rapidamente para a separação de fases e uma nova agitação não é capaz de dispersar novamente as fases, a não ser que seja adicionado mais tensoativo (PRISTA *et al.*, 2003). Quanto mais rígida e compacta for a película

formada pelo tensoativo na superfície das gotículas, maior será a sua capacidade de formar uma barreira à interação da porção interna da gotícula com o ambiente externo e, portanto mais lenta será a coalescência (PRISTA *et al.*, 2003).

A velocidade de sedimentação de partículas/micelas em uma dispersão é definida segundo a Lei de Stokes:

$$V = \frac{2r^2 (d_1 - d_2)g}{9 \eta} \quad \text{Equação IV}$$

Em que V é a velocidade de sedimentação, r é o raio das partículas, d₁ e d₂ representam a densidade das fases dispersa e dispersante, respectivamente, g a aceleração da gravidade e η a viscosidade da fase dispersante (ATKINS e PAULA, 2014; PRISTA *et al.*, 2003; VARSHOSAZ e HAJIAN, 2004). Em situação de estoque da formulação a aceleração da gravidade será constante, no entanto, para avaliar a estabilidade de uma emulsão utiliza-se da força centrífuga gerada artificialmente para acelerar algum dos processos citados acima. Uma vez que conforme a Lei de Stokes (**Equação IV**), quanto maior a aceleração (g) maior será a velocidade de sedimentação (V), o teste realizado em centrífuga permite a predição da estabilidade da emulsão em longo prazo (PRISTA *et al.*, 2003).

Após realização do teste em centrífuga com as formulações obtidas, nenhuma das amostras avaliadas sofreu separação de fases. Portanto, a emulsão foi considerada estável. O raio das partículas, cujo quadrado é diretamente proporcional à velocidade de sedimentação, não foi aferido, no entanto, a estabilidade da emulsão permite inferir que a velocidade de agitação utilizada para obtenção da emulsão está adequada e o tamanho das partículas formadas é tal que a emulsão tenha estabilidade física. De forma análoga, pode-se inferir que a densidade das fases não necessitaria de ajustes. A estabilidade da formulação também pode ser atribuída, em partes, à

elevada viscosidade da fase dispersante externa em função da presença da hidroxietilcelulose, uma vez que, conforme a Lei de Stokes, quanto maior a viscosidade da fase dispersante, menor a velocidade de sedimentação.

7.2 Densidade de massa e densidade relativa do gel-creme

As densidades de massa (ρ) e relativa (d_{relativa}) foram determinadas de acordo com o método do picnômetro descrito na Farmacopeia Brasileira, 5ª edição (BRASIL, 2010). O teste foi realizado em triplicata. Os resultados estão enumerados na **Tabela 1** e as médias dos resultados de densidade de massa estão demonstradas na **Figura 11**.

Tabela 1: resultados de densidade relativa (d_{relativa}), densidade de massa (ρ), ρ média e desvio padrão (SD).

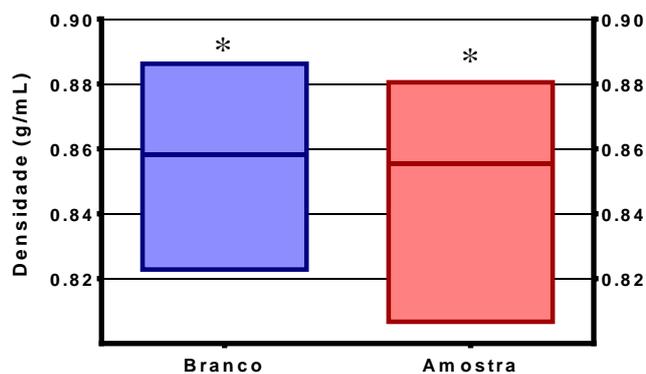
Amostra							
	d_{relativa}			ρ			ρ (média)
Amostra 1	0,827	0,8157	0,807	0,8267	0,8154	0,8067	0,8163
Amostra 2	0,8808	0,8804	0,8809	0,8804	0,8801	0,8805	0,8803
Amostra 3	0,8595	0,8542	0,8559	0,8591	0,8539	0,8555	0,8562
						Média	0,8509
						SD	0,0323
Branco							
	d_{relativa}			ρ			ρ (média)
Branco 1	0,8568	0,8637	0,8586	0,8565	0,8633	0,8583	0,8594
Branco 2	0,8388	0,8304	0,8231	0,8385	0,8301	0,8228	0,8304
Branco 3	0,8847	0,8858	0,8866	0,8843	0,8854	0,8862	0,8853
						Média	0,8584
						SD	0,0274

É possível perceber na tabela e na **Figura 11** a similaridade dos resultados para o gel-creme branco e para aquele contendo ativo, sendo que a diferença entre os resultados não foi estatisticamente significativa, com valor de p de 0,6251 para o teste *Two-way ANOVA*.

Os valores de densidade variam de acordo com o empacotamento espacial das moléculas. No caso de líquidos e semi-sólidos, a temperatura e a pressão podem afetar a densidade.

Quando há uma mistura de diversos componentes, como é o exemplo do gel-creme obtido, a densidade será influenciada pela proporção entre estes, sendo maior quanto maior for a quantidade daqueles mais densos. A formação de micelas muda o empacotamento espacial das moléculas, sendo esperada a mudança na densidade da mistura. A densidade irá depender ainda da quantidade de micelas formadas na emulsão e da quantidade de ar presente na formulação como consequência do tempo e velocidade de agitação, sendo que, quanto maior o número de micelas mais denso será o gel-creme e quanto maior a quantidade de ar incorporada menos denso será o gel-creme (ROWE, SHESKEY e QUINN, 2009).

Figura 11: gráfico demonstrativo dos valores de densidade de massa encontrados para o gel-creme branco e o gel-creme amostra. (*) indica grupos estatisticamente semelhantes ao nível de significância de 1%.



Fazendo uma média ponderada das densidades dos componentes do gel-creme, considerando a porcentagem como fator de ponderação, a densidade esperada da formulação seria em torno de 0,97 g/mL. Considerando que o componente presente em maior quantidade é a água, seria de se esperar que a densidade calculada estivesse próxima a 1,0 g/mL (ROWE, SHESKEY e QUINN,

2009). No entanto, o valor observado foi bem inferior. Isso pode ser explicado pela incorporação de ar durante a fabricação do gel-creme, especialmente durante a formação do creme, para a qual é necessária uma alta velocidade de agitação com geração de alta turbulência. O aumento da quantidade de ar na formulação reduz a viscosidade e, portanto, aumenta a espalhabilidade. Como será discutido detalhadamente mais abaixo, o aumento da espalhabilidade é capaz de aumentar a velocidade de difusão, conforme a 1ª Lei de Fick (Equação V).

7.3 pH de superfície do gel-creme

O pH de superfície das formulações foi determinado de acordo com o método colorimétrico descrito na Farmacopeia Brasileira, 5ª edição (BRASIL, 2010). Os resultados de pH estão na **Tabela 2**. Não foi calculado desvio padrão para o pH por se tratar de um teste qualitativo.

É perceptível que o pH de superfície aferido foi mais ácido nas formulações contendo o princípio ativo. Essa diferença foi estatisticamente significativa, tendo valor de $p < 0,0001$ de acordo com o teste *Two-way* ANOVA. Esta redução no pH de superfície pode ser justificada pelo uso da substância teste na forma de cloridrato de amina para obtenção das formulações. Íons de aminas quaternárias têm caráter de ácido fraco, podendo liberar íons de H^+ no meio, mesmo que em pequena quantidade, justificando a pequena redução do pH.

Uma vez que o gel-creme destina-se à aplicação tópica, o pH ideal da formulação está relacionado diretamente ao pH da pele, o qual depende de vários fatores como hidratação, intensidade e composição do suor e do sebo, fatores genéticos, gênero e idade (Ciszek, 2017). Estima-se que o pH da pele saudável varia entre 4,1 a 5,9, ou seja, ácido (GARBOSSA e MAIA CAMPOS, 2016; MAURO, DI *et al.*, 2017; SCHMID-WENDTNER e KORTING, 2006).

O filme lipídico que recobre o estrato córneo tem um papel importante não apenas como a principal barreira de proteção da pele, mas também na manutenção de sua acidez (CISZEK, 2017), atuando juntamente com um tampão de ácido láctico/lactato, ácidos dicarboxílicos do suor, componentes ácidos do sebo e elementos ácidos da queratina (PRISTA *et al.*, 2003).

Tabela 2: resultados de pH com média

	pH	Média		pH	Média
	4			5	
Amostra 1	4,5	4,2	Branco 1	5	5,0
	4			5	
	4			5	
Amostra 2	4	4,0	Branco 2	5	5,0
	4			5	
	4			5	
Amostra 3	4,5	4,3	Branco 3	5	5,0
	4,5			5	

Um aumento no pH do filme lipídico mais externo para faixas entre 6,5 a 8, ou seja, alcalino, é irritante e capaz de alterar o perfil da microbiota, assim como afetar a atividade enzimática das camadas mais externas. Essa alteração na homeostase, principalmente no que se refere às enzimas, afeta diretamente o metabolismo de lipídeos, como a ceramida (SCHMID-WENDTNER e KORTING, 2006), e pode interferir na hidratação da pele e na perda transepidermal de água, o que resulta em desidratação e até atrofia (CISZEK, 2017). Perturbações no pH tópico fisiológico ainda podem acarretar no surgimento de doenças como dermatite de contato, dermatite atópica, acne, ictiose e outras infecções, por exemplo por *Staphylococcus aureus*, *Candida albicans* e *Malassezia dermatites* (CISZEK, 2017). Sendo assim, é possível inferir que o ambiente ácido da pele tem um papel central na manutenção da saúde (SCHMID-WENDTNER e KORTING, 2006).

Dados da literatura mostram que formulações com pH ácido, tal como o gel-creme proposto, preferencialmente entre 4,5 e 5, são adequadas para aplicação tópica (FROELICH *et al.*, 2017; SCHMID-WENDTNER e KORTING, 2006).

7.4 Viscosidade do gel-creme

A viscosidade é definida, na Farmacopéia Brasileira, 5ª edição, como “a expressão da resistência de líquidos ao escoamento, ou seja, ao deslocamento de parte de suas moléculas sobre moléculas vizinhas.” (BRASIL, 2010).

Os resultados obtidos estão enumerados na **Tabela 3** e demonstrados na **Figura 12**.

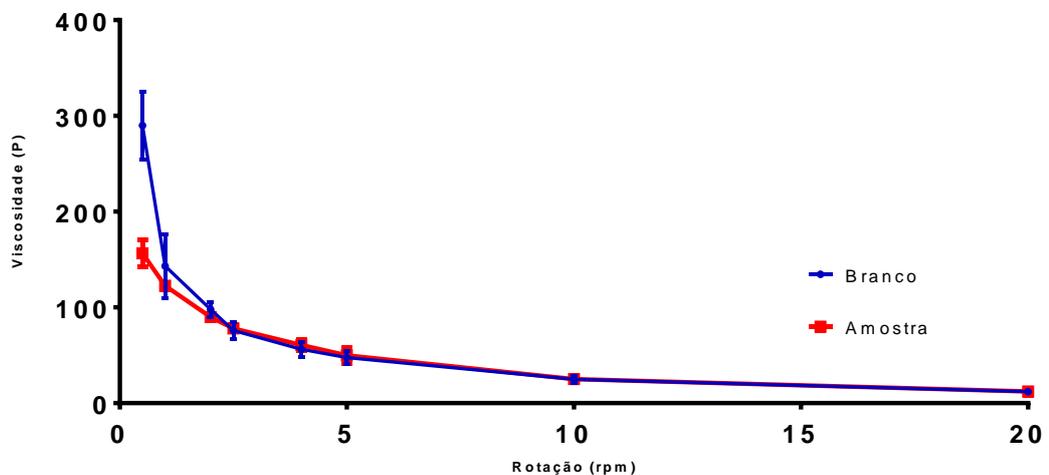
Tabela 3: resultados médios de viscosidade em Poise (P) com desvio padrão (SD)

Velocidade (rpm)	Branco		Amostra	
	Média (P)	SD	Média (P)	SD
0,5	289,90	35,77	156,50	13,74
1	143,10	33,08	122,67	1,50
2	98,03	7,85	89,91	1,79
2,5	75,84	8,54	78,05	3,64
4	56,22	7,70	60,70	6,22
5	47,60	7,18	49,86	8,20
10	24,81	3,59	25,12	4,88
20	12,01	1,77	12,14	2,19

Os princípios que regem a reologia se baseiam em duas leis fundamentais, a lei da elasticidade de Hooke e a lei da viscosidade de Newton. Essas leis podem ser aplicáveis em materiais com comportamento extremo, de pura deformação elástica, no caso dos materiais com comportamento Hookeano, ou de pura viscosidade Newtoniana. A deformação elástica pura ocorre quando um material retorna à forma original uma vez que a força seja retirada, enquanto que a viscosidade pura é observada quando um líquido flui à menor força aplicada e não retorna à sua forma original uma vez que a força cesse (GERBINO, 2005).

No século 19, surgiram evidências de que nem todos os materiais se comportam em um dos extremos, de forma que a classificação entre eles passou a compreender uma enorme quantidade de materiais com comportamentos intermediários, variando de acordo com a força aplicada e a sua duração (GERBINO, 2005).

Figura 12: gráfico demonstrativo dos valores de viscosidade em Poise (P) em função da velocidade de rotação em RPM. Os grupos foram estatisticamente diferentes ao nível de significância de 1%.



No caso do gel-creme desenvolvido, é possível perceber na **Figura 13** que há um perfil de comportamento não-newtoniano em que a viscosidade diminui à medida que a velocidade de agitação aumenta, em uma mesma temperatura. Este comportamento é explicado por vários eventos que ocorrem simultaneamente uma vez que um gel-creme é composto tanto por micelas características da emulsão quanto por longas cadeias poliméricas (GERBINO, 2005). Dados da literatura confirmam que, tipicamente, géis de derivados de celulose assim como cremes ou emulsões têm comportamento não-newtoniano (GUPTA e GARG, 2002; MATOS *et al.*, 2018; VILJOEN, BOTES e STEENEKAMP, 2018).

No caso de emulsões, o comportamento é semelhante ao de uma dispersão de partículas sólidas floculadas, em que as micelas formadas no processo de

emulsificação se comportam como partículas sólidas em suspensão, sendo que a força de atração entre as partículas é menor que a força de agitação aplicada. As ligações intermoleculares das micelas, mesmo em um sistema estável com reduzida tensão superficial, podem causar a formação de pequenos agregados de micelas (GERBINO, 2005). A agitação do *spindle* quebra esses agregados a uma taxa diretamente proporcional à velocidade (GERBINO, 2005). O movimento Browniano aleatório das partículas leva à formação de novos agregados a uma taxa independente da força de agitação (GERBINO, 2005). Para cada velocidade de agitação há um tamanho médio de agregados que se formam em um estado de equilíbrio. Esse tamanho diminui à medida em que a velocidade aumenta, resultando em uma menor resistência ao fluxo, ou seja, menor viscosidade (GERBINO, 2005).

Adicionalmente, o emaranhado de macromoléculas poliméricas contendo moléculas de água imobilizadas, responsável pela estrutura dos géis, tem um comportamento reológico semelhante, ou seja, não newtoniano (GERBINO, 2005). As moléculas de hidroxietilcelulose têm sua conformação típica sempre envolta por moléculas de hidratação. Num estado de repouso, a estrutura flexível da hidroxietilcelulose é atingida continuamente pelas moléculas de água e pelas micelas que estão se movimentando aleatoriamente ao seu redor, seguindo um movimento Browniano (GERBINO, 2005). Quando se inicia a agitação, uma força unidirecional laminar é superimposta à movimentação aleatória de todo o sistema. Como consequência, as cadeias do polímero, ao serem atingidas por partículas que se movimentam na direção do fluxo, tendem a se desemaranhar de acordo com esta mesma direção, oferecendo menor resistência ao fluxo, e paralelamente liberando as moléculas de água presas no interior de suas estruturas antes emaranhadas. O menor aprisionamento de água e o reduzido emaranhado polimérico reduzem o tamanho da

unidade de fluxo, o que reduz a resistência ao movimento do *spindle*, ou seja, reduz a viscosidade (GERBINO, 2005).

Todos esses fatores juntos culminam em redução da viscosidade à medida que a velocidade de agitação aumenta, comportamento chamado de pseudoplástico ou tixotrópico.

Outro evento notado na viscosidade, representado na **Figura 12**, é que, para as formulações brancas, a viscosidade é notavelmente maior que para as formulações contendo fármaco, sendo ainda essa diferença estatisticamente significativa, com valor de $p < 0,05$ no teste de *Two-way ANOVA*.

Considerando que, para soluções poliméricas, a viscosidade aumenta com o aumento da concentração, era esperado que a viscosidade das formulações brancas fosse maior. A presença do fármaco no gel-creme, uma molécula altamente polar, irá deslocar moléculas de água livres para o processo de solvatação, reduzindo o aprisionamento de água nas malhas polimérica e conseqüentemente reduzindo a viscosidade. Como o sistema não é uma simples solução contendo o soluto sólido, esse evento terá maior impacto nas menores velocidades de agitação em que os eventos que ocorrem com as micelas e com os emaranhados poliméricos, explicados acima, são menos significativos (GERBINO, 2005).

A aplicação do gel-creme será realizada em áreas bem determinadas, porém variadas de acordo com a necessidade de cada paciente (SOUZA, FREITAS, DE E MAIA CAMPOS, 2017). Para aplicação tópica, uma formulação deve ser relativamente viscosa quando em repouso e se tornar mais fluida quando esfregada na pele, ou seja, ser fácil de espalhar apenas após esfregada (NANUWI E TENGKU-AHMAD, 2015). Esta é uma das vantagens das formulações semissólidas em comparações às líquidas.

Este resultado prático esperado se reflete reologicamente em baixa viscosidade em alta velocidade de agitação acompanhada de comportamento não-newtoniano tixotrópico. (SOUZA, FREITAS e MAIA CAMPOS, 2017).

Formulações com valores de viscosidade entre 1,6 e 15,5 P, aferidos em altas taxas de cisalhamento, já foram consideradas adequadas para formulações destinadas à aplicação tópica (ANUWI e TENGKU-AHMAD, 2015).

Sendo assim, a presente formulação, que apresentou viscosidade média de 12,14 P em alta taxa de cisalhamento (20 rpm), como descrito na **Tabela 3**, e comportamento não newtoniano tixotrópico, como observado na **Figura 12**, pode ser considerada reologicamente adequada para a finalidade a que se propõe.

7.5 Espalhabilidade do gel-creme

Os valores de espalhabilidade encontrados estão enumerados na **Tabela 4**. O gráfico de espalhabilidade, onde y é a espalhabilidade em mm² e x o peso em gramas, está demonstrado na **Figura 13**.

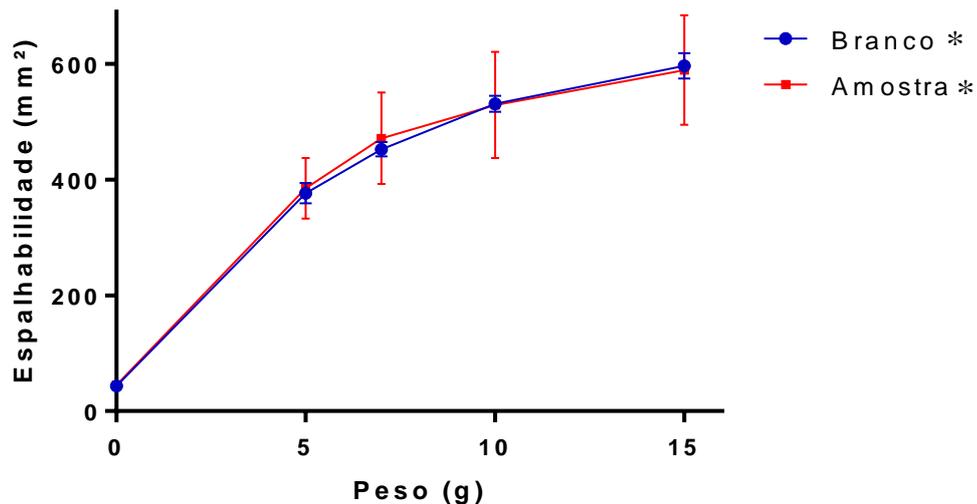
Tabela 4: média dos resultados de espalhabilidade em mm² com desvio padrão (SD)

Peso (g)	Branco		Amostra	
	Média (mm ²)	SD	Média (mm ²)	SD
0	43,5	2,3	45,0	6,0
5	380,3	6,7	364,8	38,4
7	462,1	19,6	445,8	42,0
10	534,4	7,9	506,7	34,0
15	605,0	14,7	568,0	39,6

Como pode ser observado na **Figura 13**, a espalhabilidade foi muito semelhante para as formulações com e sem o ativo. Esses resultados foram confirmados pelo teste *Two-way* ANOVA, em que o valor de p determinado foi de 0,8370, comprovando que os resultados são estatisticamente iguais.

Considerando que a viscosidade da formulação teve um comportamento reológico adequado à finalidade proposta, o padrão encontrado para a espalhabilidade já era esperado.

Figura 13: demonstração gráfica dos resultados médios de espalhabilidade com desvio padrão. (*) indica grupos estatisticamente semelhantes ao nível de significância de 1%.



A espalhabilidade é inversamente proporcional à viscosidade, ou seja, quanto menor viscosidade de uma formulação, maior será sua espalhabilidade. Isso se justifica pela menor resistência de uma formulação pouco viscosa ao deslizamento entre as placas de vidro, e posteriormente entre o dedo e a pele do paciente.

Conforme já demonstrado acima, a viscosidade do gel-creme proposto mostrou perfil reológico adequado para aplicação na pele, um indício de que o paciente apresentaria facilidade de espalhar o conteúdo na região a ser tratada. Os resultados de espalhabilidade fortalecem essa hipótese. Os valores baixos de viscosidade para altas taxas de cisalhamento (12,14 P a 20 rpm) estão em acordo, portanto, com os altos valores de espalhabilidade detectados neste experimento (aumento de 45 mm^2 para 568 mm^2).

A espalhabilidade é uma característica essencial para o sucesso do tratamento, uma vez que interfere diretamente na aceitação do mesmo por parte do paciente, principalmente aqueles com casos mais graves de alopecia multifocal ou até total, em que a aplicação pode ser necessária em grandes áreas (NIKOLIĆ, GOHLA e MÜLLER, 2011).

A espalhabilidade ainda interfere na velocidade de difusão através de uma membrana, ou mesmo através da pele. De acordo com a primeira lei de Fick (Equação V), a velocidade de difusão (V) pode ser definida como:

$$V = K \times P_c \times S \times \frac{dC}{dx} \quad \text{Equação V}$$

Onde K é o coeficiente de difusão do fármaco no veículo, P_c é o coeficiente de partição entre a membrana e o meio doador, S é a superfície de difusão, dC é a diferença de concentração da substância nos dois lados da membrana e dx é a espessura da membrana (ATKINS e PAULA, 2014; PRISTA *et al.*, 2006; VARSHOSAZ e HAJIAN, 2004).

A difusão da substância química através da formulação ainda será discutida mais detalhadamente, porém, com exceção de S os fatores que determinam a velocidade de difusão (**Equação V**) não podem ser controlados farmacotecnicamente. Estes dependem da dose a ser administrada, de características da substância a ser veiculada ou de características da pele.

Sendo assim, se uma formulação apresenta alta espalhabilidade e, portanto é capaz de ocupar uma grande área, sua velocidade de difusão através da pele será maior, fatos estes que são os descritos para esta formulação.

7.6 Doseamento

O doseamento do fármaco foi realizado por método desenvolvido e validado, conforme descrito no capítulo 2 deste trabalho, utilizando-se espectrômetro UV-Vis. O doseamento foi realizado em triplicata. Os resultados encontrados estão listados na

Tabela 5.

Tabela 5: Valores de teor, determinados por espectrofotometria no UV, para as formulações fabricadas com média e desvio padrão (SD)

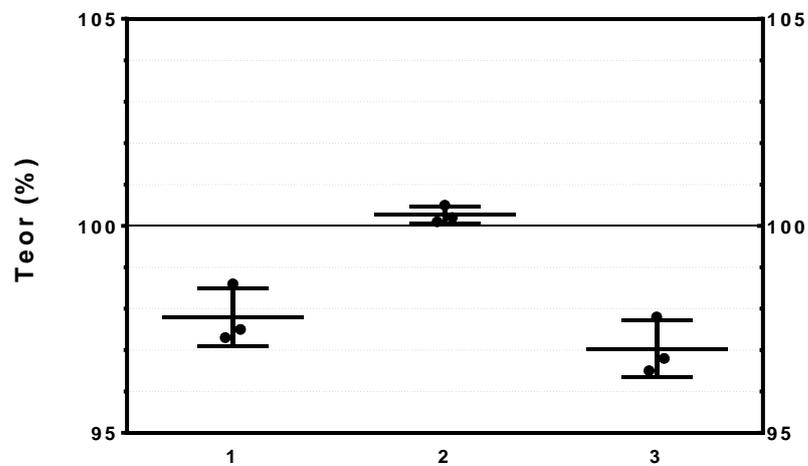
Amostra	Peso (g)	Absorvância	Resultado	Média	SD
1.1	0,116	0,946	97,5%		
1.2	0,1006	0,830	98,6%	97,8%	0,006303
1.3	0,1026	0,835	97,3%		
2.1	0,089	0,745	100,1%		
2.2	0,1029	0,865	100,5%	100,3%	0,002082
2.3	0,0965	0,808	100,2%		
3.1	0,0922	0,754	97,8%		
3.2	0,1072	0,865	96,5%	97,0%	0,006807
3.3	0,1071	0,867	96,8 %		

Com base em compêndios oficiais, como as Farmacopéias Brasileira, Européia e Americana, foi determinado que seriam aceitos valores de 95 a 105%. Conforme pode ser verificado na **Tabela 5**, todos os lotes fabricados passaram no teste. Isso significa que não houve perda da substância ativa durante o processo.

A carta controle apresentada abaixo (**Figura 14**) mostra os resultados encontrados na **Tabela 5** representados graficamente, facilitando a visualização dos mesmos. No eixo y, os valores 105 e 95 representam os desvios permitidos positivos e negativos ($\sigma+3$ e $\sigma-3$) da média (valor 100). As barras em cada ponto se referem aos desvios de cada leitura, feita em triplicata.

Considerando que os valores do doseamento para a formulação estão em acordo com os limites especificados nos compêndios oficiais, prosseguiu-se a realização do teste de liberação em célula de Franz com os lotes fabricados.

Figura 14: representação gráfica dos valores de teor encontrados, com a média e desvio padrão.



7.7 Perfil de liberação *in vitro* e cinética de liberação

Testes de liberação e permeação, geralmente, são realizados com membranas sintéticas e porções de pele, respectivamente (DUTRA, BIANCHETTI E STÜLP, 2013). O uso de pele humana enfrenta algumas dificuldades de aquisição e armazenamento, além de ter propriedades diferentes para diferentes regiões do corpo (GUIMARÃES, 2001). A permeabilidade na região do couro cabeludo humano é uma das maiores se comparado a outras regiões anatômicas ou a pele de outros animais (GUIMARÃES, 2001), dessa forma, a realização de estudos de liberação com amostras de pele que não fossem de couro cabeludo humano não seria uma simulação próxima da realidade.

Nesse sentido, a utilização de membranas artificiais sintéticas se torna interessante não apenas pela sua disponibilidade comercial como também pela facilidade de manuseio e uniformidade entre os lotes (GUIMARÃES, 2001). Com o uso de membranas sintéticas, a velocidade de liberação não depende da permeação pela membrana, mas do coeficiente de partição entre a formulação e o fluido receptor e da difusão da substância através da formulação (GUIMARÃES, 2001). Membranas

de acetato de celulose têm sido utilizadas em estudos preliminares de formulações tópicas (ANDRADE, 2013; DUTRA, BIANCHETTI e STÜLP, 2013; SILVA, DA *et al.*, 2009).

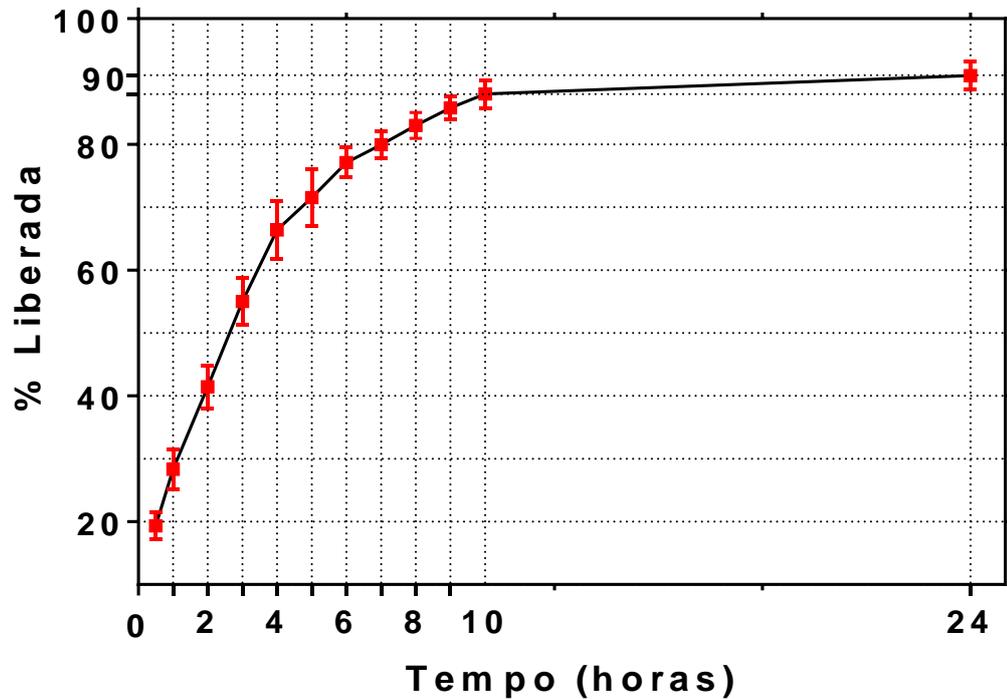
Na **Figura 15** está a representação gráfica dos resultados encontrados no teste de liberação. Pode-se observar uma rápida liberação do fármaco nas primeiras 4 horas de liberação. É possível observar que em 30 minutos foi liberado cerca de 20 % do ativo e em três horas houve a liberação de pouco mais de 50%. De uma forma geral, para um sistema de liberação de fármacos não é interessante uma liberação muito rápida do ativo, pois isso pode ocasionar efeito *burst*, definido como a liberação de mais de 80% do ativo em 30 minutos, havendo então disponibilidade de uma quantidade elevada da substância ativa (BRAZEL e HUANG, 2004).

A liberação da substância teste pode ser dividida em duas fases, a primeira que vai até cerca de quatro horas e uma segunda a partir daí. A primeira fase da liberação é caracterizada por uma liberação mais rápida da substância ativa vasodilatadora, sendo ainda mais rápida nos primeiros 30 minutos. Isso pode ser uma consequência da grande hidrofília da substância ativa fazendo com que a mesma interaja prontamente, na forma de uma dispersão molecular, com a estrutura gelificada da fase externa do gel creme. Posteriormente, em contato com o filtro de acetato de celulose, esta substância penetra facilmente os poros não interagindo com os mesmos. Nas horas subsequentes, há o processo de difusão da substância ativa através da formulação (FAISANT *et al.*, 2002; PATEL *et al.*, 2018).

De 4 horas em diante, a taxa de liberação diminui até que atinge um platô, a partir de 7 horas. Essa redução da taxa de liberação se dá mais provavelmente por dois fatores. Primeiro uma provável dificuldade de difusão da substancia ativa através do gel-creme, devido à viscosidade da formulação, o que pode ser minimizado pelo

espalhamento voluntário realizado pelo paciente no momento da aplicação. Segundo por uma provável saturação da membrana pela alta carga lipídica da formulação.

Figura 15: representação gráfica do resultado do teste de liberação da substância teste em célula de Franz



A membrana de acetato de celulose é uma membrana de celulose hidrofílica, dessa forma, substâncias hidrofóbicas interagem com os poros da membrana e são retidas, sendo removidas apenas pela passagem de solventes menos polares, o que não ocorreu na realização dos estudos de liberação. Dessa forma, a fase oleosa do gel-creme, no decorrer do ensaio foi se acumulando nos poros da membrana, podendo ter ocasionado seu entupimento. As camadas mais externas da pele são hidrofóbicas e, por isso, capazes de interagir com a fase oleosa do gel-creme, sendo inferior a possibilidade de redução da velocidade de permeação. As camadas mais internas da pele, por sua vez, são vivas e por isso são capazes de remover qualquer substância que se acumule. Sendo assim, a provável saturação da membrana

ocorrida pela alta carga lipídica da formulação não deve ocorrer na ocasião de aplicação em pele humana.

Considerando que o gel-creme é para uso em áreas acometidas por alopecia, geralmente o couro cabeludo, é interessante que a formulação apresente rápida liberação, uma vez que a área pode estar em contato constante com chapéus ou com as próprias mãos do paciente, que poderiam remover a formulação do local aplicado. Ainda, a área será exposta a higienização durante os banhos do paciente que removeriam resíduos não liberados ainda no dia da aplicação.

Dessa forma, pode-se considerar positiva a liberação de cerca de 88% da formulação em 10 horas de contato, com uma liberação de mais de 50% antes de 3 horas.

Com base nos dados obtidos, realizou-se um estudo do mecanismo de liberação do fármaco. Existem modelos matemáticos de cinética de liberação que são apropriados para avaliação da liberação de substâncias químicas por dispositivos farmacêuticos de liberação de fármacos. A maioria desses modelos é baseado na Lei de Fick (**Equação V**), que descreve matematicamente a forma como ocorre difusão de matéria ou de energia em condições em que não há equilíbrio químico ou energético.

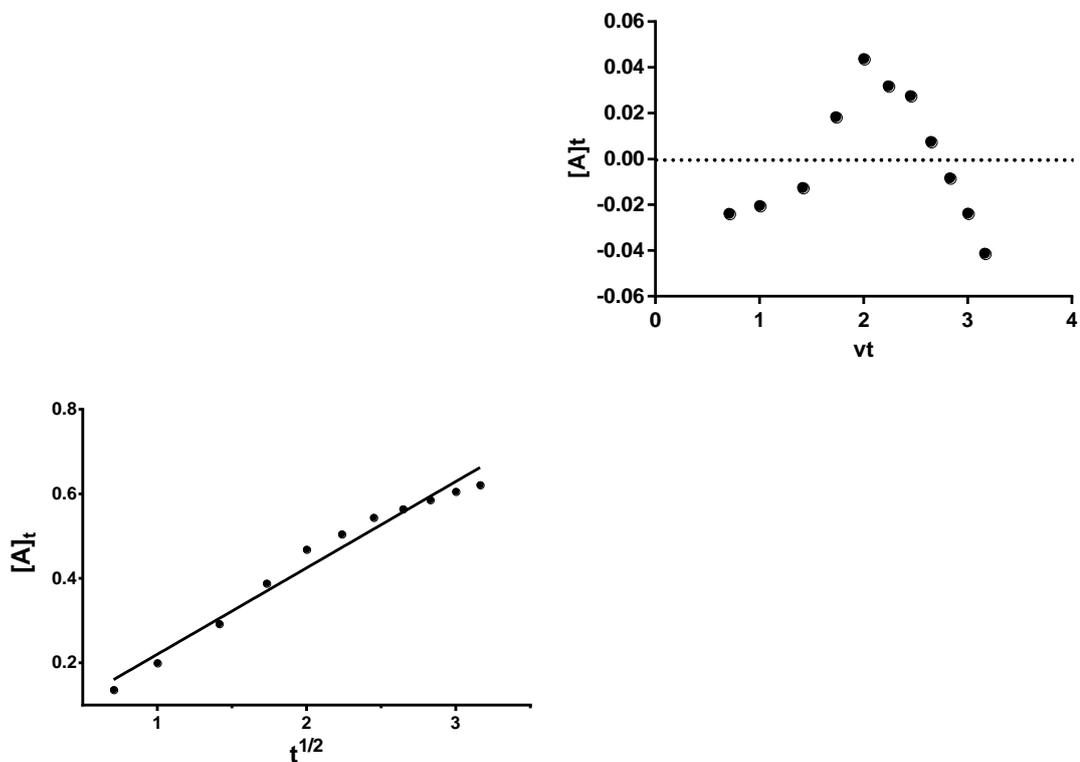
Nesses modelos, a quantidade de substância liberada (A) é expressa como uma função do tempo (t), sendo descritos modelos de ordem zero, primeira, segunda e terceira ordem (COSTA e LOBO, 2001). O modelo mais apropriado, que representa a cinética mais provável, é aquele que resulta na regressão linear de melhor qualidade no intervalo de tempo avaliado (CESAR, 2015).

Existem diversos modelos teóricos desenvolvidos por Higuchi para o estudo da liberação de substâncias hidrofílicas a partir de sistemas semissólidos de liberação (Costa e Lobo, 2001). Segundo um dos modelos, baseado na primeira Lei de Fick (Equação V), a quantidade de substância liberada, assumindo superfície de avaliação constante e condição *sink*, pode ser resumida na Equação VI:

$$[A]_t = k \cdot \sqrt{t} \quad \text{Equação VI}$$

Onde $[A]_t$ é a concentração de substância ativa liberada no tempo (t) e k é a constante de difusão da substância no veículo (Costa e Lobo, 2001). Com base nesse modelo, é possível obter o valor de k plotando-se $[A]_t$ em função da raiz quadrada de t, sendo k o valor do intercepto encontrado por regressão linear dos dados (**Figura 16a**).

Figura 16: (a) à esquerda a regressão linear dos valores de $[A]_t$ em função da raiz quadrada do tempo, e (b) à direita a distribuição dos resíduos padronizados.



A análise por regressão linear dos valores de liberação obtidos obteve valor de r^2 de 0,9736. No entanto, a distribuição dos resíduos padronizados não tem indícios de homocedasticidade (**Figura 16b**). Dessa forma, o modelo pode ser usado para descrever apenas parcialmente a cinética de liberação da formulação estudada. Este modelo tem sido usado na avaliação de sistemas de liberação transdérmicos e sistemas matriciais para liberação de fármacos hidrofílicos (COSTA e LOBO, 2001).

De forma a aprofundar a análise, foi feita uma análise matemática de acordo com o modelo de Korsmeyer-Peppas (**Equação VII**), o qual estabelece que:

$$\frac{M_t}{M_\infty} = kt^n \quad \text{Equação VII}$$

Onde M_t é a quantidade de substância liberada no tempo t , M_∞ é a quantidade total de substância liberada após um longo período de tempo, k é a constante cinética e n é a função que representa o mecanismo de liberação da substância (COSTA e LOBO, 2001; KIM e FASSIHI, 1997).

Para a determinação do expoente n deve-se considerar a porção da curva em que M_t/M_∞ é menor que 0,6 (COSTA e LOBO, 2001). Portanto, considerando a fração M_t/M_∞ como f e transformando a equação em logarítmica temos a Equação VIII (KIM e FASSIHI, 1997):

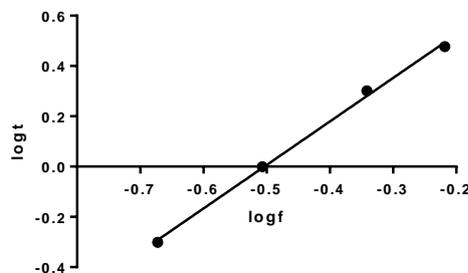
$$\log f = \log k + n \cdot \log t \quad \text{Equação VIII}$$

A partir dessa equação, é possível encontrar o valor de n plotando-se $\log f$ em função do $\log t$, sendo n o multiplicador de $\log t$ encontrado na regressão linear. Segundo Peppas (1985), valor de n igual a 0,5 indica liberação por difusão Fickiana; valores entre 0,5 e 1,0 indicam transferência de massa não-Fickiana correspondente à ocorrência simultânea de difusão e relaxamento da malha polimérica; e valor de n igual a 1,0 indica liberação não-Fickiana de ordem zero (COSTA e LOBO, 2001). Esse

modelo é também conhecido como *Power Law* e tem sido usado para descrever o mecanismo de liberação de diversas formas farmacêuticas (KIM e FASSIHI, 1997).

Após os cálculos, foi encontrado valor de n igual a 0,5766, sendo o valor de r^2 da regressão linear igual a 0,9977 (**Figura 17**). Portanto, o gel-creme desenvolvido apresenta o mecanismo de liberação do ativo mais provável por transferência de massa não-Fickiana, correspondente à ocorrência simultânea de difusão, conforme previsto parcialmente pelo modelo de Higuchi, e relaxamento da malha polimérica.

Figura 17: regressão linear dos valores de $\log(t)$ em função de $\log(f)$



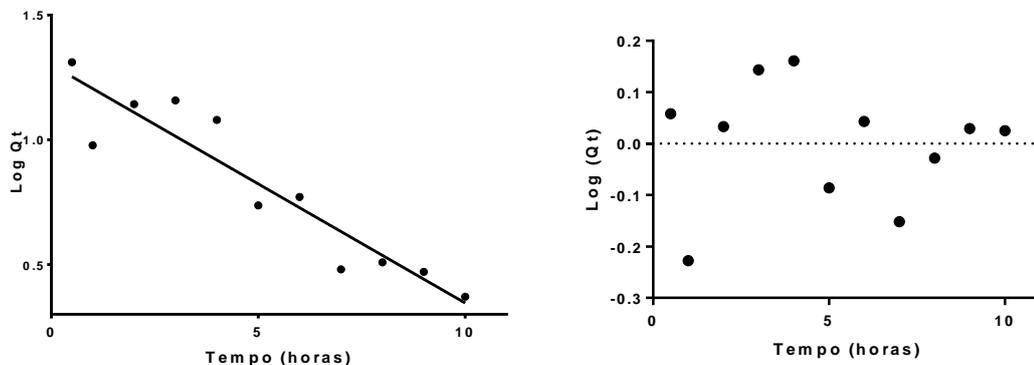
A difusão é um processo que ocorre em função da diferença do gradiente de concentração, enquanto o relaxamento da malha polimérica ocorre em função da hidratação progressiva da formulação, mediada pelo líquido acceptor contido na célula de Franz. Este líquido fica em constante contato com a membrana onde se encontra a formulação. Assim, quanto maior a quantidade de água absorvida pela formulação, menos entrelaçadas estarão as malhas poliméricas, facilitando a passagem da substância.

O último modelo considerado para a análise dos resultados foi o modelo de Hixson-Crowell, um modelo de 1ª ordem que tem sido usado para explicar a liberação de fármacos hidrofílicos por matrizes porosas (COSTA e LOBO, 2001). Segundo o modelo de Hixson-Crowell:

$$\log Q_t = \log Q_0 + \frac{K_1 t}{2,303} \quad \text{Equação XIX}$$

Onde Q_t é a quantidade de substância liberada no tempo t , Q_0 é a quantidade inicial de substância, K_1 é a constante de primeira ordem e t é o tempo (COSTA e LOBO, 2001). A regressão linear do $\log Q_t$ em função do tempo permite verificar a adequabilidade do modelo aos dados. De acordo com a análise realizada (**Figura 18**), o modelo pode explicar a liberação do gel-creme obtido, uma vez que a regressão apresenta alto valor de r^2 (0,8748) e os resíduos padronizados têm indício de homocedasticidade.

Figura 18: (a) à esquerda a regressão linear dos valores de $\log(Q_t)$ em função de $\log(t)$, e (b) à direita a distribuição dos resíduos padronizados.



As formas farmacêuticas com liberação conforme o modelo de Hixson-Crowell apresenta liberação proporcional à quantidade de substância remanescente em cada tempo, de forma que a quantidade de substância liberada por unidade de tempo, ou seja, a velocidade de liberação, diminui com o passar do tempo. Esse resultado está de acordo com o perfil de liberação observado (**Figura 15**).

CAPÍTULO II

DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODO ANALÍTICO PARA QUANTIFICAÇÃO DA SUBSTÂNCIA TESTE

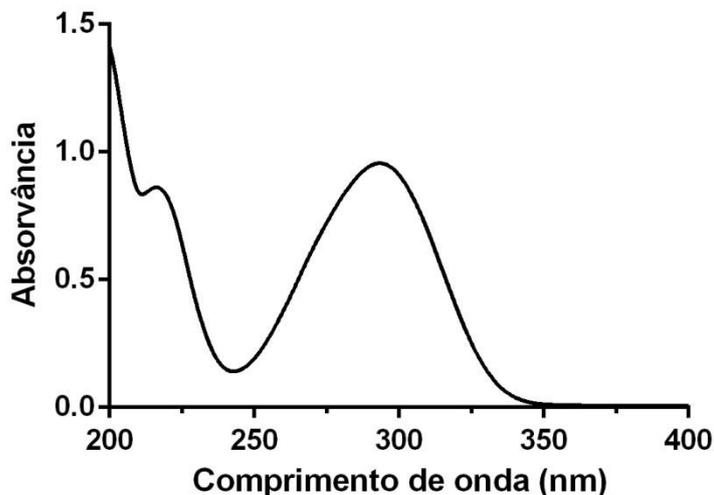
8 DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DO MÉTODO ANALÍTICO PARA QUANTIFICAÇÃO DA SUBSTÂNCIA TESTE

Para a quantificação da substância teste no gel-creme, foi necessário desenvolvimento e a validação de método analítico. A da substância teste estudada no presente trabalho tem reportada na literatura atividade inibitória de serino-proteases (GADWAL *et al.*, 2014; SERINE *et al.*, 2017), não tendo sido atribuído, ainda, atividade biológica de interesse para a indústria farmacêutica e sua cadeia de produção. Ela se encontra em uso comercial como reagente químico para uso, principalmente, em laboratórios de pesquisa. Nosso grupo, como dito anteriormente no capítulo 1 deste trabalho, tem trabalhado com esta substância química há quatro anos e tem descoberto atividade promissora no campo das doenças que ocasionam hipertensão. O fato de não ser tratada ainda como um insumo farmacêutico ativo (fármaco) impossibilita várias formas de caracterização desta substância, no que diz respeito à sua aplicação na área farmacêutica. Dessa forma, não é encontrado em nenhum compendio oficial (como as farmacopéias) um método de quantificação desta substância química. Assim, a necessidade do desenvolvimento de um método analítico validado para esta substância se tornou premente para o prosseguimento deste trabalho.

Benzamidas, por serem substâncias com um anel aromático substituído, costumam ter absorção significativa na região do ultravioleta.

Assim, iniciou-se essa etapa do trabalho realizando um espectro de varredura da substância teste fim de identificar o seu máximo de absorção (**Figura 19**).

Figura 19: Espectro de absorção no UV da substância teste na região entre 200 e 400 nm



Conforme pode ser observado no espectro de absorvância na região entre 200 e 400 nm da substância teste, há uma forte absorção em 293 nm, correspondente à banda benzenóide da benzamidina.

Tendo isso em vista, optou-se por um método de quantificação por espectrofotometria de absorção na região do ultravioleta, que é uma técnica simples de quantificação e por isso facilmente aplicável na rotina.

O método foi desenvolvido e validado como segue.

8.1 Materiais

Para a realização dos experimentos descritos no presente capítulo, foram utilizados benzamidina *para*-substituída (substância teste), fornecida pela Sigma-Aldrich (Islândia), hidroxietilcelulose fornecida pela Denver-Cotia Indústria e Comércio Ltda. (Cotia, Brasil), ácido cetoestearílico e ácido cetoestearílico etoxilado fornecidos pela Oxiten (São Paulo, Brasil), glicerina, fosfato de potássio monobásico anidro e fosfato de sódio dibásico anidro fornecidos pela Synth (Diadema, Brasil), miristato de isopropila e brometo de cetilmetilamônio fornecidos pela Neon (São Paulo, Brasil) e fitas UniversalIndikator® MColorpHast fornecidas pela Merk (Alemanha). Em todos os

experimentos, foi utilizada água tratada por osmose reversa em aparelho de água milliQ (Marca Millipore, modelo Direct-Q, Morshem, França). Demais reagentes fazem parte da grade do laboratório e apresentam grau analítico não tendo sido purificados para sua utilização.

Os equipamentos utilizados foram o Agitador de hélice IKA® Eurostar modelo Power-basic (GROB-WERKE GmbH & Co. KG, Alemanha) e Espectrofotômetro UV-Visível modelo Evolution 201 (Thermo Fisher Scientific Inc, EUA).

Soluções contendo 0,5; 1,0; 2,0; 3,0; 4,0; 5,0; 6,0; 7,0; 8,0; 9,0; 10; e 12 µg/mL foram obtidas a partir de uma solução-estoque contendo 100 µg/mL da substância teste. A solução-estoque, por sua vez, foi obtida pela diluição de 10,0 mg da substância teste em 100mL de tampão fosfato pH 5,9.

Os cálculos estatísticos foram realizados utilizando os softwares Minitab® 18.1, GraphPad Prism 6.01 e o Microsoft Office Excel 2007.

8.2 Método desenvolvido

A quantificação da substância teste por espectroscopia de absorção na região do ultravioleta foi feita utilizando soluções desta substância em tampão fosfato pH 5,9. Estas soluções foram preparadas de modo idêntico àquelas obtidas em testes de liberação da substância teste através de membrana em célula de Franz. Assim, a quantificação foi realizada conforme as seguintes orientações/etapas:

- a) Zerar o equipamento com tampão fosfato pH 5,9
- b) Ler a absorvância da amostra em 293 nm
- c) Se o valor da absorvância ultrapassar 1,000, diluir a amostra em tampão fosfato pH 5,9 e ler novamente

A quantificação da substância teste por espectroscopia de absorção na região do ultravioleta no produto acabado, ou seja, no gel-creme, foi realizada conforme as seguintes orientações/etapas:

- a) Pesar cerca de 0,100 g de produto acabado e anotar o peso exato
- b) Diluir a amostra em 10 mL de tampão fosfato pH 5,9
- c) Agitar até completa homogeneização
- d) Filtrar em filtro PES 0,22 μm
- e) Ler a absorvância da amostra em espectrômetro de absorção em 293 nm, utilizando-se tampão fosfato pH 5,9 para zerar o equipamento.
- f) Calcular o teor da substância teste na amostra por meio da fórmula:

$$\text{Teor} = \frac{[(A+0,002479)/0,08388]*10}{(m*1000)}$$

Onde A é a absorvância lida no espectrofotômetro e m é o peso exato da amostra encontrado na etapa “a”.

8.3 Validação do método

A validação do método foi realizada de acordo com a resolução RDC 166/2017 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (BRASIL, 2017).

O método desenvolvido foi validado para aplicação em testes de quantificação da quantidade da substância teste no gel-creme e de quantificação da quantidade da substância teste liberada através de membrana em célula de Franz. Portanto, para que o método seja validado conforme a RDC 166/2017, este deve cumprir os requisitos estabelecidos para “Doseamento” no Anexo I da referida legislação, sendo estes: intervalo, linearidade, exatidão, precisão intermediária e repetibilidade (BRASIL, 2017, p. 19). Por se tratar de um método não cromatográfico, não é necessária a demonstração de seletividade, conforme Art. 21, §2º, item III da mesma resolução (BRASIL, 2017, p. 8 e 9).

8.3.1 Intervalo

De acordo com o Art. 32 da RDC 166/2017,

“Devem ser consideradas as seguintes faixas de trabalho:

I.- para teor: de 80% (oitenta por cento) a 120% (cento e vinte por cento);

III.- para teste de dissolução: de -20% (menos vinte por cento) da menor concentração esperada a +20% (mais vinte por cento) da maior concentração esperada a partir do perfil de dissolução;” (BRASIL, 2017, p. 10 e 11)

Dessa forma, considerando que a concentração esperada para a solução de aferição de teor é de 10 µg/mL, a faixa de trabalho para quantificação da substância teste no produto acabado foi definida como sendo de 8 a 12 µg/mL.

Para a quantificação das amostras dos testes de liberação da substância teste através de membrana em célula de Franz, a concentração esperada é desconhecida, pois não teria como saber qual seria a taxa de liberação da substância química neste experimento. Por isso foram realizadas as análises estatísticas com os dados das concentrações de 0,01; 0,1; 0,5; 1,0; 2,0; 3,0; 4,0; 5,0; 6,0; 7,0; 8,0; 9,0; 10 e 12 µg/mL, sendo validada a faixa de trabalho até o valor mínimo de 0,5 µg/mL, pois essa é a menor concentração que atende os requisitos de validação.

Considerando que o método poderia ser usado futuramente com outros propósitos, seria interessante a validação de faixas mais amplas do que a mínima estabelecida pela legislação. No entanto, a absorvância das soluções de substância teste na concentração de 12 µg/mL em tampão fosfato pH 5,9 já está bem próxima de 1. Em concentrações maiores o valor lido pelo equipamento seria, portanto maior que 1, refletindo uma transmitância muito baixa e valores pouco confiáveis para um método de quantificação.

8.3.2 Linearidade

A linearidade foi avaliada pela construção de três curvas analíticas obtidas plotando-se a absorvância das soluções da substância teste versus a concentração conhecida da solução. Foram analisadas soluções contendo 0,5; 1,0; 2,0; 3,0; 4,0; 5,0; 6,0; 7,0; 8,0; 9,0; 10 e 12 $\mu\text{g/mL}$ da substância teste em tampão fosfato pH 5,9. A leitura foi realizada em quintuplicada para cada uma das três curvas e os dados estão apresentados na **Tabela 6**.

Tabela 6: Concentrações da substância teste e valores de absorvância média para a construção da curva analítica do método de quantificação utilizando espectroscopia de absorção na região do ultravioleta

Concentração ($\mu\text{g/mL}$)	Absorvância média		
	Curva 1	Curva 2	Curva 3
0,5	0,0394	0,0388	0,0362
1	0,0846	0,081	0,088
2	0,1532	0,162	0,153
3	0,25	0,255	0,257
4	0,3306	0,312	0,343
5	0,4212	0,424	0,42
6	0,4938	0,4874	0,5016
7	0,5858	0,591	0,576
8	0,6662	0,6706	0,669
9	0,751	0,74	0,754
10	0,8362	0,837	0,835
11	0,934	0,932	0,934
12	1,0052	1,0022	0,999

Utilizando-se o software GraphPad Prism 6.01, os valores obtidos (**Tabela 6** e **Figura 18**) foram submetidos à análise de regressão linear pelo método dos mínimos quadrados ordinários, seguida de testes estatísticos nos quais foi utilizado um nível de significância de 5%

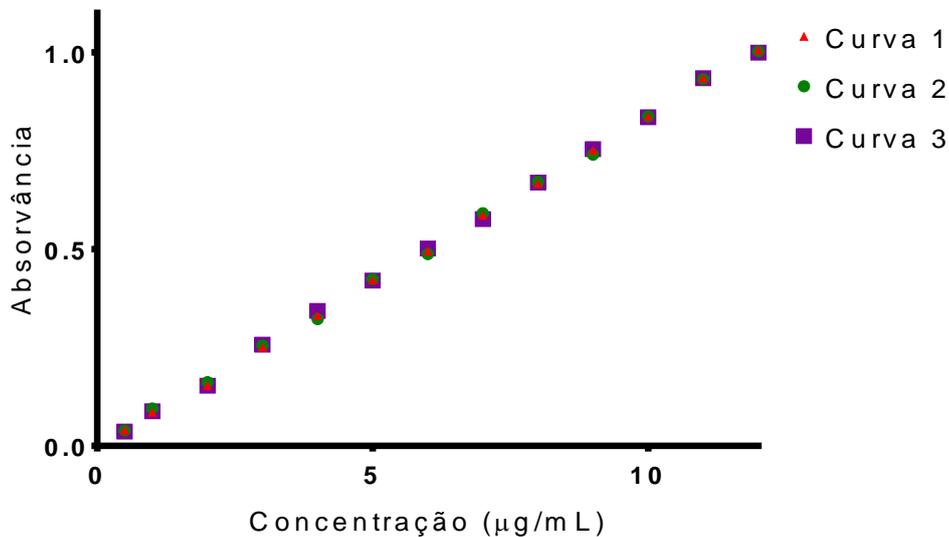
Foi constatado que as três curvas (**Figura 18**) são estatisticamente iguais por meio de uma análise de covariância realizada pelo software GraphPad Prism 6.01. Foi encontrado valor de $p=0,6719$ para a inclinação e valor de $p=0,9335$ para o intercepto. Nesse teste, o valor de p indica a probabilidade de, a partir de uma amostragem aleatória, serem encontrados interceptos e inclinações tão diferentes quanto os encontrados para os conjuntos de dados, considerando que estes conjuntos de dados têm inclinações e interceptos idênticos. Para um nível de significância de 5%, valores de p maiores que 0,05 indicam que a diferença entre o intercepto e a inclinação das diferentes curvas não é significativa. Dessa forma, foi possível obter uma equação única (**Equação IX**) para as três retas. A equação obtida foi:

$$A = 0,008388c - 0,002479 \quad \text{Equação IX}$$

onde A é a Absorvância e c a concentração da solução.

Para determinação do quão diferente de zero é o coeficiente angular, foi realizado no software GraphPad Prism 6.01 um teste cuja hipótese nula responde a pergunta: “Se não houvesse relação linear entre X e Y em geral, qual a probabilidade de os pontos selecionados aleatoriamente resultarem em uma linha de regressão tão longe da horizontal quanto a observada?” O valor de p encontrado foi menor que 0,0001 e, dessa forma, o coeficiente angular foi considerado significativamente diferente de zero. Ainda, o coeficiente de determinação (r^2) da regressão foi de 0,9995 e o coeficiente de correlação (r) foi de 0,9998, o que significa que a equação encontrada na regressão linear explica mais de 99,9% dos resultados obtidos experimentalmente.

Figura 20: representação gráfica das respostas em função da concentração da substância teste

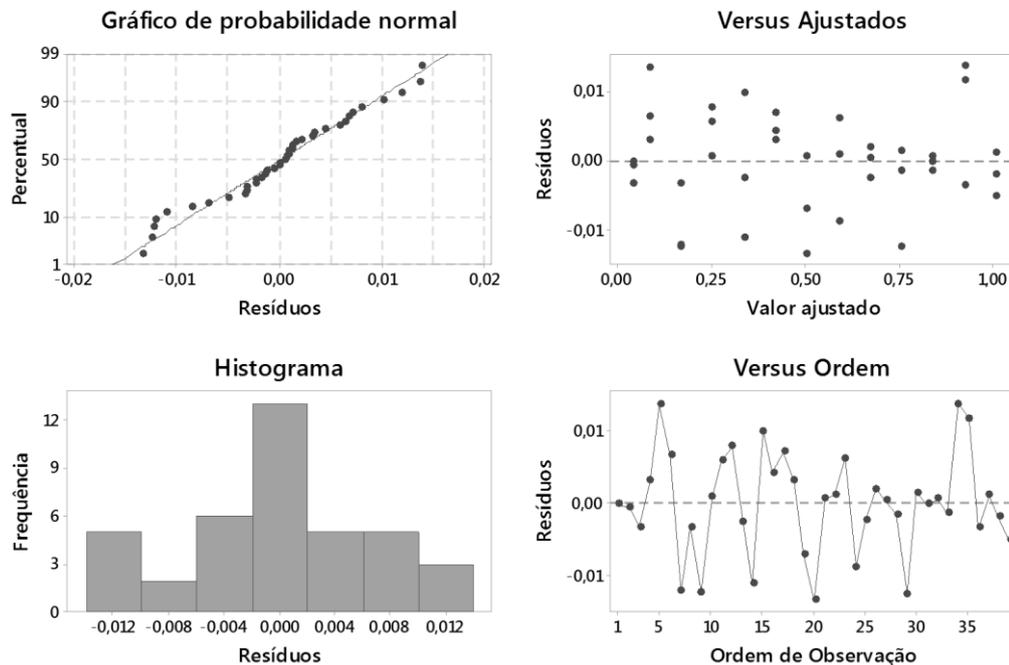


Na **Figura 19** encontra-se a representação gráfica da distribuição dos resíduos, obtida no software Minitab® 18.1, na qual é possível perceber que os resíduos padronizados estão aleatoriamente distribuídos em torno de 0, sem evidência de tendência, havendo indícios de que a variância dos resíduos padronizados é homoscedástica.

De forma a comprovar esse comportamento, utilizando-se o software Minitab® 18.1, foi realizado o teste de normalidade dos resíduos padronizados pelo método de Anderson Darling, encontrando-se valor de p de 0,284 ao nível de significância de 5%.

Para o teste de Anderson Darling, um valor de p maior que 0,05 indica que não se deve rejeitar a hipótese nula e, portanto, os dados seguem uma distribuição normal. Pela análise dos resultados apresentados na **Figura 19**, assume-se que os resíduos padronizados cumprem as quatro premissas da análise de regressão, que são normalidade, valores centrados em zero, homocedasticidade e ausência de *outliers* ou tendências temporais.

Figura 21: Representação gráfica da análise de normalidade dos resíduos padronizados da regressão linear, pelo método dos mínimos quadrados ordinários, das respostas em função da concentração da substância teste.



Portanto, o método dos mínimos quadrados ordinários é um modelo adequado para a análise estatística dos dados obtidos.

Como os dados são homocedásticos, o coeficiente de correlação é maior que 0,990 e o coeficiente angular é significativamente diferente de zero, conforme estabelecido pela RDC 166/2017 (BRASIL, 2017), o método foi considerado linear na faixa de concentração trabalhada.

8.3.3 Precisão

Primeiramente, a repetibilidade foi calculada utilizando-se os dados obtidos para três soluções de seis concentrações diferentes (0,5; 1,0; 5,0; 8,0; 10 e 12 $\mu\text{g/mL}$). Para as concentrações de 8,0; 10 e 12 $\mu\text{g/mL}$, as soluções foram obtidas por meio da contaminação da matriz com quantidades conhecidas da substância teste. As concentrações de 0,5; 1,0 e 5,0 $\mu\text{g/mL}$ foram obtidas pela diluição de quantidades conhecidas da substância teste em tampão fosfato pH 5,9. A absorvância das

soluções foi medida em triplicata e a média e o desvio-padrão (SD) das absorvâncias foram calculados (**Tabela 7**).

Os SD e as médias das absorvâncias foram utilizados para calcular o desvio padrão relativo (DPR), conforme a fórmula " $DPR=(DP/CMD)X100$ ", em que DP é o desvio padrão e CMD, a concentração média determinada, de acordo com a RDC 166/2017 (BRASIL, 2017). Os cálculos foram realizados com três algarismos significativos e o critério de aceitação estabelecido foi DPR menor que 5%. Uma vez que todas as concentrações cumpriram o critério, o método foi considerado dotado de repetibilidade na faixa de trabalho avaliada (BRASIL, 2017).

Tabela 7: Validação de método de quantificação da substância teste: repetibilidade

Repetibilidade (1° dia)							
Concentração (µg/mL)	A	B	C	Média	CMD	DP	DPR
0,5	0,0397	0,0370	0,0387	0,0384	0,488	0,001347	0,276
1,0	0,0833	0,0880	0,0890	0,0868	1,06	0,00302	0,2842
5,0	0,421	0,422	0,424	0,4224	5,07	0,001503	0,02967
8	0,6663	0,6677	0,6707	0,6682	8,00	0,00222	0,0278
10	0,8362	0,835	0,8361	0,8358	9,99	0,000666	0,00666
12	1,002	1,003	1,004	1,0030	12,0	0,000751	0,00626
Repetibilidade (2° dia)							
Concentração (µg/mL)	A	B	C	Média	CMD	DP	DPR
0,5	0,0394	0,0363	0,0390	0,0382	0,485	0,00167	0,343
1,0	0,0850	0,0833	0,0883	0,0856	1,05	0,00255	0,2426
5,0	0,421	0,420	0,422	0,421	5,0	0,001018	0,0202
8	0,6662	0,6706	0,669	0,6686	8,00	0,00223	0,0278
10	0,837	0,8369	0,8366	0,8368	10,0	0,000208	0,00208
12	1,005	1,002	1,001	1,0028	12,0	0,00216	0,0181

A precisão interdia foi calculada por dois analistas diferentes que repetiram o método utilizado para a repetibilidade em dois dias diferentes. O DPR também foi calculado para o conjunto de dados e os resultados obtidos estão apresentados na **Tabela 7**. Como nenhum dos DPR está acima de 5%, o método foi considerado dotado de precisão interdia para a faixa de trabalho avaliada (BRASIL, 2017).

8.3.4 Exatidão

A exatidão do método foi avaliada por contaminação da matriz. Pela adição de quantidades determinadas de uma solução-estoque a uma solução de formulação branca diluída em tampão fosfato pH 5,9. A solução-estoque, contendo 100 µg/mL da substância teste, foi obtida pela diluição de 10 mg da substância em 100 mL de tampão fosfato pH 5,9. A solução de matriz foi obtida pela diluição de cerca de 0,100 g de formulação branca, obtida conforme descrito no Capítulo I, em 10 mL de tampão fosfato pH 5,9, exceto para a concentração de 12 µg/mL, para a qual diluiu-se cerca de 0,050 g de formulação branca em 5 mL de tampão fosfato pH 5,9.

Tabela 8: Validação de método analítico para quantificação da substância teste: exatidão

Conc. (µg/mL)	1	2	3	Média	DP	Absorvância teórica	Concentração encontrada	% Recuperação	Média	DP
8	0,660	0,665	0,670	0,665	0,005	0,669	7,941	99,47	97,81	1,44
10	0,797	0,816	0,821	0,811	0,012	0,836	9,941	97,02		
12	0,942	0,992	0,987	0,973	0,027	1,004	11,941	96,93		

As preparações contendo 8,0; 10 e 12 µg/mL da substância teste foram obtidas pela adição de, respectivamente, 800, 1000 e 600 µL da solução-estoque às respectivas soluções de trabalho, antes de se completar o volume com solução tampão. Após homogeneização, as soluções foram filtradas em microfiltro PES 0,22µm e a absorbância da solução foi aferida em 293 nm utilizando-se tampão fosfato pH 5,9 para zerar o equipamento. O experimento foi realizado em triplicata e os dados de absorbância obtidos, bem como a porcentagem de recuperação estão apresentados na **Tabela 8**. São aceitos valores de porcentagem de recuperação acima de 95% (BRASIL, 2017). A porcentagem de recuperação obtida foi de 97,81±1,44% e, portanto, o método foi considerado exato na faixa avaliada.

9 CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS FUTURAS

- O gel-creme transdérmico para liberação de substância química vasodilatadora hidrofílica (Substância teste) foi obtido e o método de obtenção se mostrou reprodutível entre os lotes.
- O gel-creme foi caracterizado conforme densidade de massa e densidade relativa, cremação, valor de pH, viscosidade e espalhabilidade; e foi realizado estudo do perfil de liberação *in vitro* da substância teste, em célula de Franz. A formulação proposta apresentou boa estabilidade física, bom perfil reológico, assim como pH e perfil de liberação adequados à aplicação na pele, especialmente em pele lesional de paciente com alopecia areata ou androgenética.
- O método analítico desenvolvido para quantificação de substância teste foi validado, tendo apresentado resultados de acordo com a legislação vigente em todos os testes realizados. Portanto, é um método adequado para os testes de desempenho de formulação farmacêutica realizados. Ademais, uma vez que na faixa validada os valores de absorvância mínimos e máximo estão muito próximos de 0 e 1, respectivamente, o método pode ser usado para outros tipos de análise de quantificação de aminobenzamidina *para*-substituída

Como perspectiva futura para o aperfeiçoamento do gel-creme obtido tem-se estratégias para o aumento da estabilidade microbiológica do gel-creme, e a realização de estudos de estabilidade acelerada.

Ainda, têm-se como perspectivas, estudos *in vivo* de permeação e vasodilatação em orelha de camundongos Balb-C por meio de técnicas de microscopia intravital em microscópio confocal de fluorescência. Após outros estudos clínicos de toxicidade, segurança e efetividade, o candidato a fármaco e a formulação proposta poderão, conforme os resultados apresentado, ser uma alternativa ao tratamento da alopecia areata e androgenética.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADIL, A.; GODWIN, M. The effectiveness of treatments for androgenetic alopecia: A systematic review and meta-analysis. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 77, n. 1, p. 136–141.e5, 2017.

AGHAZADEH-HABASHI, A.; YANG, Y.; TANG, K.; LÖBENBERG, R.; DOSCHAK, M. R. Transdermal drug delivery: feasibility for treatment of superficial bone stress fractures. **Drug Delivery and Translational Research**, v. 5, p. 540–551, 2015.

AHAD, A.; AQIL, M.; ALI, A. Investigation of antihypertensive activity of carbopol valsartan transdermal gel containing 1,8-cineole. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 64, p. 144–149, 2014.

ANDRADE, D. F. DE. **Nanocápsulas de Núcleo Lipídico: Estudos de penetração cutânea e proposição de estratégias para a avaliação da liberação in vitro**. Porto Alegre. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2013.

ANSEL, H. C.; POPOVICH, N. G.; ALLEN, L. V. **Farmacotécnica – Formas Farmacêuticas & Sistemas de Liberação de Fármacos**. 6. ed. São Paulo, Editorial Premier: a ciência em livros.

ATKINS, P.; PAULA, J. de. **Físico-química Fundamentos**. 5. ed. Rio de Janeiro, LTC, 2011.

ATLAS, S. A. The Renin-Angiotensin Aldosterone System: Pathophysiological Role and Pharmacologic Inhibition. **Journal of Managed Care Pharmacy**, v. 13, n. 8 Supp B, p. 9–20, 2007.

Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG). Formulação tópica de

angiotensina-(1-7) para a prevenção e tratamento da alopecia. **BR102012030068-0**. Depósito em 26/11/2012, Publicação em 02/08/2016.

BRAZEL, C. S.; HUANG, X. The Cost of Optimal Drug Delivery: Reducing and Preventing the Burst Effect in Matrix Systems. *In: Carrier-Based Drug Delivery*. Tuscaloosa: p. 267–282.

BRASIL. **Farmacopéia Brasileira**. 5. ed. Brasília: Anvisa, 2010.

BRASIL. **Formulário Nacional da Farmacopeia Brasileira**, 2ª edição Rev. 02. Brasília: Anvisa, 2012.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC Nº 166, DE 24 de Julho de 2017. **Dispõe sobre a validação de métodos analíticos e dá outras providências**. Diário Oficial [da] União nº141, DF, Poder Executivo, de 25 de julho de 2017.

CAPETTINI, L.S.A.; MONTECUCCO, F.; MACH, F.; STERGIOPULOS, N.; A.S. SANTOS, R.; F. DA SILVA, R. Role of Renin-Angiotensin System in Inflammation, Immunity and Aging. **Current Pharmaceutical Design**, v. 18, n. 7, p. 963–970, 2012.

CESAR, A. L. A. **Preparação e caracterização de dispositivo polimérico para liberação controlada de 5-asa**. Belo Horizonte: Universidade Federal de Minas Gerais, 2015.

CHUNG, M. S. *et al.* An Asian traditional herbal complex containing *Houttuynia cordata* Thunb, *Perilla frutescens* Var. *acuta* and green tea stimulates hair growth in mice. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 17, n. 1, p. 515, 2017.

CISZEK, A. Variability of skin pH after the use of different collagen gels. **Journal of Cosmetic Dermatology**, v. 16, p. 531–536, 2017.

ÇOBANKARA, V.; ÖZTÜRK, M. A.; KIRAZ, S.; ERTENLI, I.; HAZNEDAROGLU, I. C.; PAY, S.; ÇALGÜNERI, M. Renin and angiotensin-converting enzyme (ACE) as active components of the local synovial renin-angiotensin system in rheumatoid arthritis. **Rheumatology International**, v. 25, n. 4, p. 285–291, 2005.

COSTA, P.; LOBO, J. M. S. Modeling and comparison of dissolution profile. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 13, p. 123–133, 2001.

CRUZ, C. M. **Sistema de liberação de extrato de própolis para aplicação odontológica**. Belo Horizonte: Universidade Federal de Minas Gerais, 2013.

DANIEL CAMPOS VILLELA; RODRIGO ARAUJO FRAGA DA SILVA; ANDERSON JOSÉ FERREIRA; ELISANGELA FÁTIMA DA SILVA; UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS –UFMG. *Topical formulations for the prevention and treatment of alopecia and inhibition of hair growth*. **US2015313829**. Data de depósito: 26 de Novembro de 2013. Data de publicação: 5 de Novembro de 2015.

DUTRA, C.; BIANCHETTI, P.; STÜLP, S. Avaliação da difusão e permeação cutânea in vitro de acetato de hidrocortisona tópica comercial. **SCIENTIA PLENA**, v. 9, n. 10, p. 1–7, 2013.

EICHNER, A.; STAHLBERG, S.; SONNENBERGER, S.; LANGE, S.; DOBNER, B.; OSTERMANN, A.; SCHRADER, T. E.; HAUS, T.; SCHROETER, A.; HUSTER, D.; NEUBERT, R. H. H. Influence of the penetration enhancer isopropyl myristate on stratum corneum lipid model membranes revealed by neutron diffraction and ²H NMR experiments. **Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes**, v. 1859, n. 5, p. 745–755, 2017.

ENGELBRECHT, T.; DEMÉ, B.; DOBNER, B.; NEUBERT, R. Study of the

Influence of Penetration Enhancer Isopropyl Myristate on the Nanostructure of Stratum Corneum Lipid Model Membranes Using Neutron Diffraction and Deuterium Labelling.

Skin Pharmacology and Physiology, v. 25, n. 4, p. 200–207, 2012.

FAISANT, N.; SIEPMANN, J.; OURY, P.; LAFFINEUR, V.; BRUNA, E.; HAFFNER, J.; BENOIT, J. P. The effect of gamma-irradiation on drug release from bioerodible microparticles: A quantitative treatment. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 242, p. 281–284, 2002.

FERRARIO, C. M. Angiotensin-converting enzyme 2 and angiotensin-(1-7): An evolving story in cardiovascular regulation. **Hypertension**, v. 47, n. 3 II, p. 515–521, 2006.

FOUREAUX G., NOGUEIRA J.C., NOGUEIRA B.S., FULGÊNCIO G. de O., MENEZES, G.B., FERNANDES, S.O.A., CARDOSO, V.N., FERNANDES, R.S., OLIVEIRA, G.P., FRANCA, J.R., FARACO, A.A.G., RAIZADA, M.K., FERREIRA, A.J. Antiglaucomatous effects of the activation of intrinsic angiotensin-converting enzyme 2. **Investigative Ophthalmology and Visual Science**, v. 54, n. 6, p. 4296–4306, 2013.

FOUREAUX G., FRANCA J.R., NOGUEIRA J.C., FULGÊNCIO G. de O., RIBEIRO T.G., CASTILHO R.O., YOSHIDA M.I., FUSCALDI L.L., FERNANDES S.O.A., CARDOSO V.N., CRONEMBERGER S., FARACO A.A.G., FERREIRA A.J. Ocular Inserts for Sustained Release of the Angiotensin-Converting Enzyme 2 Activator, Diminazene Aceturate, to Treat Glaucoma in Rats. **PLoS ONE**, v. 10, n. 7, p. 1–18, 2016.

FOX, L. T.; GERBER, M.; PREEZ, J. L. DU; PLESSIS, J. DU; HAMMAN, J. H.

Skin permeation enhancement effects of the gel and whole-leaf materials of Aloe vera, Aloe marlothii and Aloe ferox. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 67, n. 1, p. 96–106, 2015.

FRIEDRICH, M.; PRIMO, F. T.; FUNCK, J. A. B.; LAPORTA, L. V.; ALVES, M. P.; BITTENCOURT, C. F.; ESCARRONE, A. L. V. Avaliação da estabilidade físico-química de creme não iônico inscrito no Formulário Nacional. **Latin American Journal of Pharmacy**, v. 26, n. 4, p. 558–562, 2007.

FROELICH, A.; OSMAŁEK, T.; SNELA, A.; KUNSTMAN, P.; JADACH, B.; OLEJNICZAK, M.; ROSZAK, G.; BIAŁAS, W. Novel microemulsion-based gels for topical delivery of indomethacin: Formulation, physicochemical properties and in vitro drug release studies. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 507, p. 323–336, 2017.

GADWAL, S.; KOROTKOV, K. V.; DELAROSA, J. R.; HOL, W. G. J.; SANDKVIST, M. Functional and structural characterization of vibrio cholerae extracellular serine protease B, VesB. **Journal of Biological Chemistry**, v. 289, n. 12, p. 8288–8298, 2014.

GARBOSSA, W. A. C.; MAIA CAMPOS, P. M. B. G. Euterpe oleracea, Matricaria chamomilla, and Camellia sinensis as promising ingredients for development of skin care formulations. **Industrial Crops and Products**, v. 83, p. 1–10, 2016.

GERBINO, P. P. **Remington The Science and Practice of Pharmacy**. 21 ed. Filadélfia: Lippincott Williams & Wilkins, 2005.

GILHAR, A.; ETZIONI, A.; PAUS, R. Alopecia Areata. **The New England**

Journal of Medicine, v. 366, n. 16, p. 1515–1525, 2012.

GOODMAN, L. S.; GILMAN, A.; BRUNTON, L. L.; LAZO, J. S.; PARKER, K. L.

As bases farmacológicas da terapêutica / Goodman & Gilman. 11. ed. Porto Alegre: McGraw-Hill, 2007.

GORDON, K. A.; TOSTI, A. Alopecia: evaluation and treatment. **Clinical, Cosmetic and Investigational Dermatology**, v. 4, p. 101–106, 2011.

GUIMARÃES, M. **Avaliação da liberação e permeação em membrana sintética do cetoconazol em cremes O/A**. São Paulo, Universidade de São Paulo, 2001

GUPTA, P.; GARG, S. Recent Advances in Semisolid Dosage Forms for Dermatological Application. **Pharmaceutical Technology**, p. 144–162, 2002.

HAREL, S.; HIGGINS, C. A.; CERISE, J. E.; DAI, Z.; CHEN, J. C.; CLYNES, R.; CHRISTIANO, A. M. Pharmacologic inhibition of JAK-STAT signaling promotes hair growth. **Science Advances**, v. 1, n. 9, p. e1500973–e1500973, 2015.

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

KANG, C.; SHIN, S. C. Preparation and evaluation of bioadhesive dibucaine gels for enhanced local anesthetic action. **Archives of Pharmacal Research**, v. 33, n. 8, p. 1277–1283, 2010.

KAO CORPORATION. **Vasodilating agent**. US5433957. Data do depósito: 12/08/1993, Data da publicação: 18/07/1995.

KAUFMAN, K. D. Androgens and alopecia. **Molecular and Cellular**

Endocrinology, v. 198, n. 1–2, p. 89–95, 2002.

KAUR, D.; RAINA, A.; SINGH, N. Formulation and evaluation of carbopol 940 based glibenclamide transdermal gel. **International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**, v. 6, n. 8, p. 434–440, 2014.

KIM, H.; FASSIHI, R. Application of binary polymer system in drug release rate modulation. 2. Influence of formulation variables and hydrodynamic conditions on release kinetics. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 86, n. 3, p. 323–328, 1997.

KLEMP, P.; PETERS, K. Subcutaneous Blood Flow in Early Male Pattern Baldness. **THE JOURNAL OF INVESTIGATIVE DERMATOLOGY**, p. 725–726, 1989.

LAUTRETTE, A.; LI, S.; ALILI, R.; SUNNARBORG, S. W.; BURTIN, M.; LEE, D. C.; FRIEDLANDER, G.; TERZI, F. Angiotensin II and EGF receptor cross-talk in chronic kidney diseases: A new therapeutic approach. **Nature Medicine**, v. 11, n. 8, p. 867–874, 2005.

LIU, L. Y.; CRAIGLOW, B. G.; DAI, F.; KING, B. A. Tofacitinib for the treatment of severe alopecia areata and variants: A study of 90 patients. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 76, n. 1, p. 22–28, 2017.

LOCH, C. R.; MARCO, M. G. DE; SCHWEDERSKY, M. B.; HAAS, S. E. Avaliação físico-química e determinação do comportamento reológico de emulsões de cetoconazol 2% comercializados em farmácias magistrais no município de Erechim/RS. **Revista Brasileira de Farmácia**, v. 92, n. 4, p. 299–305, 2011.

LV, W.; BOOZ, G. W.; WANG, Y.; FAN, F.; ROMAN, R. J. Inflammation and renal fibrosis: Recent developments on key signaling molecules as potential therapeutic targets. v. 820, n. September 2017, p. 65–76, 2018.

MA, H.; YU, M.; LEI, M.; TAN, F.; LI, N. A Novel Topical Targeting System of Caffeine Microemulsion for Inhibiting UVB-Induced Skin Tumor: Characterization, Optimization, and Evaluation. **AAPS PharmSciTech**, v. 16, n. 4, p. 905–913, 2015.

MATOS, M.; LACA, A.; REA, F.; IGLESIAS, O.; RAYNER, M.; GUTIÉRREZ, G. O/W emulsions stabilized by OSA-modified starch granules versus non-ionic surfactant: Stability, rheological behaviour and resveratrol encapsulation. **Journal of Food Engineering**, v. 222, p. 207–217, 2018.

MAURO, M. D. DI; TOMASELLO, B.; GIARDINA, R. C.; DATTILO, S.; MAZZEI, V.; SINATRA, F.; CARUSO, M.; D'ANTONA, N.; RENIS, M. Sugar and mineral enriched fraction from olive mill wastewater for promising cosmeceutical application: characterization, in vitro and in vivo studies. **Food & Function**, v. 8, p. 4713–4722, 2017.

MEIDAN, V. M.; TOUITOU, E. Treatments for androgenetic alopecia and alopecia areata: current options and future prospects. **Drugs**, v. 61, n. 1, p. 53–69, 2001.

MULINARI-BRENNER, F.; SEIDEL, G.; HEPP, T. Entendendo a alopecia androgenética/ Understanding androgenetic alopecia. **Surg Cosmet Dermatol**, v. 3, n. 4, p. 329–337, 2011.

NAGASAWA, A.; WAKISAKA, E.; KIDENA, H.; NOMURA, T.; HOTTA, M.; TAGUCHI, H.; MORIWAKI, S. t-Flavanone Improves the Male Pattern of Hair Loss by Enhancing Hair-Anchoring Strength: A Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled Study. **Dermatology and Therapy**, v. 6, n. 1, p. 59–68, 2016.

NAMAZI, M. R.; ASHRAF, A.; HANDJANI, F.; EFTEKHAR, E.; KALAFI, A.

Angiotensin Converting Enzyme Activity in Alopecia Areata. **Enzyme research**, v. 2014, p. 1- 4, 2014.

NG, S. F.; ANUWI, N. A.; TENGGU-AHMAD, T. N. Topical Lyogel Containing Corticosteroid Decreases IgE Expression and Enhances the Therapeutic Efficacy Against Atopic Eczema. **AAPS PharmSciTech**, v. 16, n. 3, p. 656–663, 2015.

NIKOLIĆ, S.; GOHLA, S.; MÜLLER, R. H. Lipid nanoparticles: Nanocarriers for more effective and safer photoprotective products. **Expert Review of Dermatology**, v. 6, n. 5, p. 501–507, 2011.

OLSEN, E. A.; CARSON, S. C.; TURNEY, E. A. Systemic Steroids with or Without 2% Topical Minoxidil in the Treatment of Alopecia Areata. **Archives of Dermatology**, v. 128, n. 11, p. 1467–1473, 1992.

RANUGHA, P.S.S., BETKERUR, J.B.. Antihypertensives in dermatology Part I - Uses of antihypertensives in dermatology. **Indian journal of dermatology, venereology and leprology**, v. 84, n. 1, p. 6–15, 2018.

PARK, B.; BAK, S.; SHIN, K.; KIM, M.; KIM, D.; JUNG, S.; JEONG, S.; KWAN, Y.; JUNG, H. Promotion of hair growth by newly synthesized ceramide mimetic compound. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 491, n. 1, p. 173–177, 2017.

PATEL, S.; SRIVASTAVA, S.; SINGH, M. R.; SINGH, D. Preparation and optimization of chitosan-gelatin films for sustained delivery of lupeol for wound healing. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 107, p. 1888–1897, 2018.

PEPPAS, N. A. Analysis of Fickian and non-Fickian drug release from polymers. **Pharmaceutica acta Helvetiae**, v. 60, n. 4, p. 110–111, 1985.

PETUKHOVA, L. *et al.* Genome-wide association study in alopecia areata implicates both innate and adaptive immunity. **Nature**, v. 466, n. 7302, p. 113–117, 2010.

PLATTEN, M. *et al.* Blocking angiotensin-converting enzyme induces potent regulatory T cells and modulates TH1- and TH17-mediated autoimmunity. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 106, n. 35, p. 14948–14953, 2009.

PRISTA, L. N.; ALVES, A. COREIA; MORGAD, R.; LOBO, J. S. **Tecnologia Farmacêutica Volume I**. 6. ed. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, 2003.

PRISTA, L. NOGUEIRA; ALVES, A. C.; MORGADO, R.; LOBO, J. S. **Tecnologia Farmacêutica Volume II**. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, 2006.

RANADE, S. Y.; GAUD, R. S. Lornoxicam and frankincense oil transdermal gel: a potential formulation for management of inflammation. **International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research VO - 7**, v. 7, n. 1, p. 190, 2016.

RIVITTI, E. A. Alopecia areata: revisão e atualização. **An Bras Dermatol**, v. 80, n. 1, p. 57–68, 2005.

ROSSI, R. C. P.; PAIVA, R. F. DE; SILVA, M. D. DA; BARJA, P. R. Photoacoustic study of percutaneous absorption of carbopol and transdermic gels for topic use in skin. **European Physical Journal: Special Topics**, v. 153, n. 1, p. 479–482, 2008.

ROWE, R.; SHESKEY, P.; QUINN, M. **Handbook of Pharmaceutical Excipients**. 6^a ed. Inglaterra, RPS Publishing, 2009.

SCHMID-WENDTNER, M. H.; KORTING, H. C. The pH of the skin surface and

its impact on the barrier function. **Skin Pharmacology and Physiology**, v. 19, p. 296–302, 2006.

SEMALTY, M.; SEMALTY, A.; JOSHI, G. P.; RAWAT, M. S. M. Hair growth and rejuvenation: An overview. **Journal of Dermatological Treatment**, v. 22, n. 3, p. 123–132, 2011.

SERINE, S.; STMPR, P.; MATRILYSIS, I.; RECEPTOR, P.; DUMONT, A. L.; CIANCIOTTO, N. P. Stenotrophomonas maltophilia Serine Protease StmPr1 Induces Matrilysis, Anoikis, and Protease-Activated Receptor 2 Activation in Human Lung Epithelial Cells. **Infect Immun**, v. 85, n. 12, p. e00544-17, 2017.

SILVA, J. A. DA; SANTANA, D. P. DE; BEDOR, D. G. C.; BORBA, V. F. D. C.; LIRA, A. A. M.; EGITO, E. S. T. DO. Estudo de liberação e permeação in vitro do diclofenaco de dietilamônio em microemulsão gel-like. **Quimica Nova**, v. 32, n. 6, p. 1389–1393, 2009.

SOUZA, C.; FREITAS, L. A. P. DE; MAIA CAMPOS, P. M. B. G. Topical Formulation Containing Beeswax-Based Nanoparticles Improved In Vivo Skin Barrier Function. **AAPS PharmSciTech**, v. 18, n. 7, p. 2505–2516, 2017.

SOUZA, F. L. C. DE. **Desenvolvimento de Bases Emulsionadas de Silicone e Água e Avaliação Comparativa com Bases Emulsionadas de Óleo e Água Para Uso Externo de Uso Mais Comum em Manipulação**. Rio de Janeiro: Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2007.

STRAZZULLA, L. C.; WANG, E. H. C.; AVILA, L.; SICCO, K. LO; BRINSTER, N.; CHRISTIANO, A. M.; SHAPIRO, J. Alopecia areata: An appraisal of new treatment approaches and overview of current therapies Lauren. **Journal of the American**

Academy of Dermatology, v. 78, n. 1, p. 1–12, 2018.

SWARBRIC, B. **Encyclopedia of Pharmaceutical Technology**. 3 ed. Nova Iorque, Informa Healthcare, 2007.

TAN, W. S. D.; LIAO, W.; ZHOU, S.; MEI, D.; WONG, W.-S. F. Targeting the renin–angiotensin system as novel therapeutic strategy for pulmonary diseases.

Current Opinion in Pharmacology, v. 40, p. 9–17, 2018.

TOSTI, A.; PIRACCINI, B. M.; SOLI, M. Evaluation of sexual function in subjects taking finasteride for the treatment of androgenetic alopecia. **Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology**, v. 15, n. 5, p. 418–421, 2001.

TUNTIYASAWASDIKUL, S.; LIMPONGSA, E.; JAIPAKDEE, N.; SRIPANIDKULCHAI, B. Transdermal Permeation of Kaempferia parviflora Methoxyflavones from Isopropyl Myristate-Based Vehicles. **AAPS PharmSciTech**, v. 15, n. 4, p. 947–955, 2014.

VAROTHAI, S.; BERGFELD, W. F. Androgenetic alopecia: An evidence-based treatment update. **American Journal of Clinical Dermatology**, v. 15, n. 3, p. 217–230, 2014.

VARSHOSAZ, J.; HAJIAN, M. Characterization of Drug Release and Diffusion Mechanism Through Hydroxyethylmethacrylate/Methacrylic Acid pH-Sensitive Hydrogel. **Drug Delivery**, v. 11, p. 53–58, 2004.

VILJOEN, J. M.; BOTES, D.; STEENEKAMP, J. H. Formulation and evaluation of selected transmucosal dosage forms containing a double fixed-dose of acyclovir and ketoconazole. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 111, n. September 2017, p. 503–513, 2018.

WIECHERS, J. W.; WATKINSON, A. C.; CROSS, S. E.; ROBERTS, M. S. Predicting skin penetration of actives from complex cosmetic formulations: An evaluation of inter formulation and inter active effects during formulation optimization for transdermal delivery. **International Journal of Cosmetic Science**, v. 34, n. 6, p. 525–535, 2012.

XING, L. *et al.* Alopecia areata is driven by cytotoxic T lymphocytes and is reversed by JAK inhibition. **Nature Medicine**, v. 20, n. 9, p. 1043–1049, 2014.

ZIDAN, A. S.; KAMAL, N.; ALAYOUBI, A.; SEGCEL, M.; IBRAHIM, S.; RAHMAN, Z.; CRUZ, C. N.; ASHRAF, M. Effect of Isopropyl Myristate on Transdermal Permeation of Testosterone From Carbopol Gel. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 106, n. 7, p. 1805–1813, 2017.