

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

JAYANARAIAN FERREIRA MARTINS ANDRADE

ESTRATÉGIAS PARA O DIRECIONAMENTO FOLICULAR DE FÁRMACOS

BRASÍLIA

2024

JAYANARAIAAN FERREIRA MARTINS ANDRADE

ESTRATÉGIAS PARA O DIRECIONAMENTO FOLICULAR DE FÁRMACOS

Tese de doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Faculdade de Ciências da Saúde – Universidade de Brasília, como requisito parcial à obtenção do título de Doutora em Ciências Farmacêuticas.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Tais Gratieri

BRASÍLIA

2024

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de ensino, estudo ou pesquisa, desde que citada a fonte.

FA554e Ferreira Martins Andrade, Jayanaraian
Estratégias para o direcionamento folicular de fármacos /
Jayanaraian Ferreira Martins Andrade; orientador Tais
Gratieri. -- Brasília, 2024.
110 p.

Tese(Doutorado em Ciências Farmacêuticas) -- Universidade
de Brasília, 2024.

1. Dutasterida. 2. Folículo Piloso. 3. Iontoforese. 4.
Nanocarreadores. 5. Vesículas Lipídicas. I. Gratieri, Tais,
orient. II. Título.

Jayanaraian Ferreira Martins Andrade

Título do trabalho: Estratégias para o direcionamento folicular de fármacos.

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade de Brasília, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Ciências Farmacêuticas.

Aprovada em 13 de dezembro de 2024.

Banca Examinadora:

Prof^ª. Dr^ª. Taís Gratieri

Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade de Brasília

Prof^ª. Dr^ª. Maria de Fátima Borin

Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade de Brasília

Prof^ª. Dr^ª. Letícia Scherer Koester

Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Prof. Dr. Marlus Chorilli

Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista

Dedico esta tese ao André Filipe Sales Andrade, meu marido e parceiro de todas as horas. *“Nunca duvide de que você é o forte sopro de vento que sinto ao estender minhas asas. Por sua causa creio que posso voar!”*.

AGRADECIMENTOS

À Deus primeiramente, toda honra e toda glória, sempre!

Ao meu marido, André Filipe Sales Andrade, por não ter pensado duas vezes antes de pausar todos os seus projetos e cruzar o oceano para me acompanhar em um país completamente diferente, com uma língua estranha que nem eu nem você sabíamos falar. Obrigada é muito pouco, ainda assim, te agradeço por todo apoio, amor, compreensão, carinho e força, que tanto me foram essenciais nesse período. Sempre carregarei o seu sobrenome com orgulho.

À toda minha família que sempre vibrou com minhas conquistas e construiu a estrutura que me proporcionou viver tantos sonhos. Em especial à minha mãe, Maria das Graças, que sempre será para mim um referencial mulher, como diz a canção “*meus dias sem os seus não daria*”; ao meu pai, Helder Sousa Martins, pelo seu amor e cuidado ao longo da minha vida inteira; e ao meu irmão Thiago Mehari, por toda a parceria ao longo dos anos, por me inspirar e por me dar sobrinhos lindos e inteligentes, Cecília e Caio. Amo vocês incondicionalmente.

À minha orientadora, Prof^ª. Dr^ª. Taís Gratieri, só tenho a agradecer por tantas oportunidades, aprendizado e pela excelente orientação. Obrigada pela indicação para o doutorado sanduíche, pela confiança e pelo apoio no meu trabalho. Você é uma inspiração como pesquisadora e, sem sombra de dúvidas, é a melhor que nós temos. Muitíssimo Obrigada!

Ao Prof^º. Dr. Guilherme Martins Gelfuso, por todos os puxões de orelha, principalmente na apresentação dos meus dados, certamente meus gráficos hoje são mais bonitos! Mas obrigada também por todo acolhimento e por todas as colaborações científicas.

A todos os meus amigos e companheiros de trabalho do Laboratório de Tecnologia de Medicamentos, Alimentos e Cosméticos (LTMAC) da Universidade de Brasília. Obrigada Breno Noronha, Camila Cardoso, Geisa Barbalho, Giovanna Barcelos, Jonad Contarato, Lenart Alcântara, Lucas Fraga, Luma Nogueira, Rayssa Ferreira, Marianne Costa, Mateus Torquato, Mikaella Costa, Paula Martins, Thamires Miranda e Venâncio Amaral. Obrigada por compartilharem essa jornada comigo, vocês tornaram os dias mais leves e divertidos com um cafezinho e um bolo de milho com requeijão.

Ao Rafael Vieira Rocho, por estar sempre disposto a aprender e a trabalhar.

À Kariane Nunes, por todas as discussões científicas, por todo apoio, amizade e por todos os cafezinhos que compartilhamos.

Ao Prof. Dr. Marc Schneider por ter me recebido tão bem na Alemanha, junto ao seu grupo de pesquisa, no *Institut für Biopharmazie und Pharmazeutische Technologie*, da *Universität des Saarlandes*. Obrigada Agnes, Armin, Camila, Charlotte, Elena, Janis, Justin, Kristela, Phillip, Stefan, Thomas, Marc, Marijas, Maryam. Em especial ao Akram e à Salma pelo acolhimento e compreensão tão particulares de quem está longe de casa.

À Mariana Martinho, por toda amizade, carinho, risadas, força, cafezinhos superfaturados, comprinhas, aulinhas na *velocity* e por tantas outras coisas; mas principalmente pelo Hique, a tia Jaya ama vocês demais.

À Alana Almeida, por toda amizade e companheirismo ao longo dos anos, dentro e fora da universidade. É uma honra dividir essa jornada com você! E obrigada pelo meu sobrinho Davi, amo vocês.

Ao Pedro Ribeiro Fontes, por ser um cientista excelente, por me ensinar tanto e por sempre estar acessível, não importa quanto tempo passe, muito obrigada!

À CAPES, pelo suporte financeiro (código 001).

E a todos que contribuíram de alguma forma para esse trabalho, meu muito obrigada, de coração!

*“Eu fico a imaginar, meu eu de 10 anos atrás
Me chamando pra conversar. O que será que
ele vê? Será que gosta do que eu me tornei?*

...

*Você nem pode imaginar, o quanto na vida há
de ter coragem pra viver! Você vai cair e vai
errar, mas também vai se levantar. E acima de
tudo há de ter coragem pra viver.*

Coragem pra viver e força pra continuar...”

Manda, Coragem.

RESUMO

MARTINS ANDRADE, J. F. **Estratégias para o direcionamento folicular de fármacos.** Brasília, 2024. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas) – Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade de Brasília, Brasília, 2024.

Os folículos pilosos (FPs) são uma via de interesse para a administração de medicamentos no tratamento de diversas doenças que afetam a pele. Na primeira parte do trabalho, verificou-se a influência do tamanho e da carga superficial de nanopartículas (NPs) de gelatina na profundidade de deposição nos FPs com e sem aplicação de iontoforese (ION). A ION é um método físico para promoção da permeação de fármacos que funciona através da aplicação de uma corrente elétrica fraca a uma formulação aplicada em um tecido biológico. A permeação pode ser direcionada aos FPs pois essas estruturas representam uma via de menor resistência elétrica para a corrente aplicada, bem como um reservatório de fármaco, particularmente útil para NPs, que preferencialmente acumulam-se nestas estruturas quando aplicadas topicamente. A combinação de ambas as estratégias pode fornecer melhores resultados. Quatro NPs de gelatina foram obtidas com tamanhos variando de 220 a 770 nm e cargas opostas. As NPs foram totalmente caracterizadas. Experimentos de penetração cutânea *in vitro* com e sem ION por 6 horas foram realizados para avaliação do perfil de deposição por microscopia confocal de varredura a laser. As maiores NPs carregadas positivamente (AG) resultaram em um maior acúmulo, atingindo porções mais profundas dos FPs, e mostraram que a ION aumentou ainda mais sua deposição, seguido pelas NPs de tamanho intermediário carregadas negativamente (BP). Na segunda etapa do trabalho, a dutasterida (DUT), fármaco de interesse para o tratamento da alopecia androgenética, mas que causa efeitos adversos sexuais quando administrada por via oral, foi carregada em vesículas lipídicas com diferentes composições. Foram obtidos um lipossoma simples, um lipossoma rígido, um transfersoma (TF) e dois etossomas (ET). As vesículas foram totalmente caracterizadas e o fator de direcionamento folicular (FD) foi verificado através de testes de penetração cutânea *in vitro* por 12 e 24 h. As diferentes composições afetaram tanto o perfil de liberação, que se mostrou controlado para todas as formulações, quanto o direcionamento de DUT para os FPs. Os ETs com teor etanólico de 30% e os TF resultaram nos melhores FDs para os FPs. Mais testes são necessários para avaliar o perfil de segurança dessas formulações.

Palavras-chave: dutasterida, etossomas, folículo piloso, iontoforese, lipossomas, nanocarreadores, transfersomas.

ABSTRACT

MARTINS ANDRADE, J. F. **Strategies for the follicular targeting of drugs.** Brasília, 2024. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas) – Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade de Brasília, Brasília, 2024.

Hair follicles (HFs) represent a route of interest to drug delivery for treating several skin conditions. In the first part of the work, the influence of gelatin nanoparticle (NP) size and surface charge on the deposition depth in HFs with and without iontophoresis (ION) application was verified. ION is a physical method for enhancing drug permeation that consists of applying a low electric current to a formulation towards a biological tissue. Permeation can be directed to HFs because these structures represent a pathway of lower electrical resistance for the applied current, as well as a drug reservoir, particularly useful for NPs, which preferentially accumulate in these structures when applied topically. The combination of both strategies is promising. Four gelatin NPs were obtained with sizes ranging from 220 to 770 nm and opposite charges. The NPs were fully characterized. *In vitro* skin penetration experiments with and without ION for 6 h were performed to evaluate the deposition profile by confocal laser scanning microscopy. The largest positively charged NP (AG) resulted in a greater accumulation, reaching deeper portions of the HFs, and showed that ION further increased their deposition, followed by the intermediate-sized negatively charged NPs (BP). In the second stage of the work, dutasteride (DUT), a drug of interest for the androgenic alopecia treatment but which causes serious sexual adverse effects when administered orally, was loaded into lipid vesicles with different compositions. A simple liposome, a rigid liposome, a transfersome (TF), and two ethosomes (ET) were obtained. The vesicles were fully characterized, and the follicular targeting factor (FT) was verified through *in vitro* skin penetration tests for 12 and 24 h. The different compositions affected both the release profile, which was controlled for all formulations, and the targeting of DUT to HFs. ETs with 30% ethanol content and TFs resulted in the best FTs to HFs. Further testing is needed to evaluate the safety profile of these formulations.

Keywords: dutasteride, ethosomes, iontophoresis, hair follicles, liposomes, nanocarriers, skin, transfersomes.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Esquema representativo da pele e suas estruturas.....	21
Figura 2 - Vias de permeação para fármacos na pele.....	22
Figura 3 - Unidade pilosebácea.	23
Figura 4 - Esquema da progressão do folículo piloso na alopecia androgenética. Adaptado de Cardoso et. al., 2021, com autorização. (Clinical, Cosmetic and Investigational Dermatology 2021 14 485-499' Originally published by and used with permission from Dove Medical Press Ltd.).....	25
Figura 5 - Estrutura química da DUT (MM: 528.53 g/mol).....	26
Figura 6 - Estrutura química do Citrato de Tofacitinibe (MM: 504.5 g/mol).....	27
Figura 7 - Esquema da aplicação de iontoforese na pele para permeação de nanocarreadores catiônicos em pH fisiológico. A formulação é colocada no eletrodo de mesma carga e o eletrodo de retorno é posicionado em outra parte do tecido para completar o circuito. A eletromigração promove o movimento dos nanocarreadores do ânodo para o cátodo, enquanto ânions endógenos (Cl ⁻) se movem do cátodo para o ânodo para equilíbrio do sistema. O fluxo eletrosmótico se move do ânodo para o cátodo em pH fisiológico. Adaptado de Andrade et al., 2023, com autorização.	29
Figura 8 - Esquema representativo do método de obtenção das NPs. GA: glutaraldeído.	40
Figura 9 - A) produção dos eletrodos negativos. B) produção dos eletrodos positivos. Adaptado de de Sá, 2015.....	42
Figura 10 - Ponte salina. Reproduzido de Sá, 2015.....	43
Figura 11 - Aspecto visual das NPs em acetona. À esquerda NPs BP puras de aparência esbranquiçada; à direita NPs BP carregadas com TRITC-dextrano 150 kDa, de aparência rosada.	46
Figura 12 - Pellet de NPs formado após o primeiro ciclo de centrifugação de AG carregada com TRITC-dextrano 150 kDa. A coloração rosada do sobrenadante se deve ao corante não encapsulado.....	47
Figura 13 - Potencial zeta (mV) das NPs entre pH 3,5 e 8,0, com indicação do pI.	48
Figura 14 - Tamanho hidrodinâmico das NPs de gelatina carregadas com TRITC-dextrano 150 kDa. Os tamanhos das NPs mostraram diferença estatística entre si (p<0.0001).....	48

Figura 15 - Aspecto morfológico das NPs de gelatina carregadas com TRITC-dextrano 150 kDa por AFM. A-B) AP em 3D e 2D, respectivamente; C-D) BP em 3D e 2D, respectivamente; E-F) AG em 3D e 2D, respectivamente; e G-H) BG em 3D e 2D, respectivamente.	49
Figura 16 - Aspecto morfológico das NPs de gelatina carregadas com TRITC-dextrano 150 kDa por MEV. A) AP, B) AG, C) BP e D) BG.	50
Figura 17 - Microscopia Confocal de Varredura à Laser das NPs em água. A) NPs AP; B) NPs AG; C) NPs BP e D) NPs BG. Objetiva: 10x.	51
Figura 18 - Imagens de microscopia confocal de controles após testes de penetração cutânea in vitro com e sem iontoforese por 6h em células de Franz modificadas. Controle negativo: PBS pH 7,4, controle passivo positivo: solução de TRITC-dextrano 150 kDa 2 mg/mL e controle iontoforético positivo: solução TRITC-dextrano 150 kDa 2 mg/mL sob ION anódica de 0,5 mA/cm ² . FL: fluorescência; MO: microscopia óptica; IS: imagens sobrepostas.	51
Figura 19 - Imagens confocal de amostras do FPs após testes de penetração cutânea in vitro de NPs com gelatina tipo A com e sem iontoforese por 6h em células de Franz. Barra de escala: 200 µm. ION: iontoforese; FL: fluorescência; MO: microscopia óptica; IS: imagens sobrepostas.	53
Figura 20 - Direção do fluxo eletroosmótico em diferentes condições. As setas apontam a direção do fluxo. Adaptado de Andrade et. al., 2023.	54
Figura 21 - Imagens confocal de amostras dos FPs após testes de penetração cutânea in vitro de NPs com gelatina tipo B com e sem iontoforese por 6h em células de Franz. Barra de escala: 200 µm. ION: iontoforese; FL: fluorescência; MO: microscopia óptica; IS: imagens sobrepostas.	55
Figura 22 - Intensidade de sinal do TRITC-dextrano 150 kDa extraído das imagens de microscopia confocal de varredura à laser. *p<0.05.	56
Figura 23 - Intensidade de fluorescência de TRITC-dextrano 150 kDa de amostras seccionadas nas partes superior e inferior extraídas de micrografias de microscopia eletrônica de varredura à laser. (A) transporte passivo; (B) transporte iontoforético. “A” e “C” referem-se à iontoforese “anódica” e “catódica”, respectivamente. Comparações insignificantes (p>0,05) não foram mostradas no gráfico de “iontoforese”. Controle: solução de TRITC-dextrano 150 kDa (2 mg/mL). *p<0.05, **** p<0.0001.	58
Figura 24 - Representação gráfica da curva analítica do Tofacitinibe na faixa de concentração de 0,1 a 500,0 µg/mL em acetona; n = 3. Equação da reta: y = 0,7925x; coeficiente de correlação linear: r = 1.	59
Figure 25 - NPs precipitadas após a adição de Tofacitinibe.	60
Figura 26 - Aparência dos lipossomas. (A) LP PC; (B) LP PC Chol e (C) TF.	71

Figura 27 - Imagens de TEM dos lipossomas carregados com DUT: (A) LP PC, 10k; (B) LP PC Chol, 25k; e (C) TF, 12k.	71
Figura 28 - Microscopia de luz polarizada de lipossomas carregados com DUT. (A) lipossomas vazios não filtrados; (B) lipossomas carregados com DUT não filtrados - TF; e (C) lipossomas carregados com DUT filtrados - TF. Ampliação: 20 ×. As setas indicam alguns dos cristais. 73	
Figura 29 - Liberação de DUT dos lipossomas LP PC, LP Chol e TF, e controle (solução oleosa de DUT) ao longo de 48 h. Dados expressos como média ± DP (n = 5).	74
Figura 30 - Quantidade de DUT recuperada do estrato córneo, folículos capilares e pele viável após 12 h (A) e 24 h (B) de experimentos de penetração na pele in vitro com os lipossomas LP PC, LP Chol, TF e controle. Dados expressos como média ± DP (n = 6). **** p < 0,0001, *** p < 0,005, ** p < 0,007 e * p < 0,02.	75
Figure 31 - Fator de direcionamento folicular do DUT dos lipossomas LP PC, LP Chol, TF e controle após 12 e 24 h de aplicação na pele. **** p < 0,0001, *** p < 0,0008 e ** p < 0,005.	76
Figura 32 - Influência da concentração de etanol no tamanho hidrodinâmico e PDI de etossomas. SF: amostras não filtradas. F: amostras filtradas.	77
Figure 33 - Aspecto visual dos ET30. A) ET30; B) ET30 30% rotaevaporado e C) ET30 50% rotaevaporado.	77
Figura 34 - Imagens de TEM dos etossomas carregados com DUT. (A) ET30, 8k e (B) ET30 30% rotaevaporado, 8k.	78
Figura 35 - Microscopia de luz polarizada de etossomas carregados com DUT. (A) ET30 e (B) ET30 30% rotaevaporado. Ampliação: 20 ×.	78
Figura 36 - Liberação de DUT dos etossomas ET30, ET30 30% rotaevaporado e controle (solução oleosa de DUT) ao longo de 48 h. Dados expressos como média ± DP (n = 5).	79
Figura 37 - Quantidade de DUT recuperada do estrato córneo, folículos capilares e pele viável após 12 h (A) e 24 h (B) de experimentos de penetração na pele in vitro com os etossomas ET30, ET30 30% rotaevaporado e controle. Dados expressos como média ± DP (n = 6). **** p < 0,0001.	81
Figura 38 - Fator de direcionamento folicular da DUT dos etossomas ET30, ET30 30% rotaevaporado e controle após 12 e 24 h de aplicação na pele. ** p < 0,003 e * p < 0,03.	81

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Características das NPs de gelatina puras produzidas com metabissulfito de sódio. NPs com gelatina tipo B foram medidas em pH 7,4, enquanto NPs com gelatina tipo A foram medidas em pH 5,2. * "G " e "P" referem-se a grande e pequeno, respectivamente.	47
Tabela 2. Características das NPs de gelatina carregadas com TRITC-dextrano 150 kDa. NPs com gelatina tipo B fora, medidas em pH 7,4, enquanto NPs com gelatina tipo A foram medidas em pH 5,2. * "G " e "P" referem-se a grande e pequeno, respectivamente.....	49
Tabela 3 - Composição dos lipossomas.	66
Tabela 4 - Composição dos etossomas.....	67
Tabela 5 - Características dos lipossomas após filtração.	71
Tabela 6 - Efeito da filtração no tamanho médio dos lipossomas (nm) e Pdl.....	73
Tabela 7 - Características dos etossomas.	77

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AFM – Microscopia de Força Atômica (do inglês: *Atomic Force Microscopy*)

CF – Carga do Fármaco

Chol – colesterol

CLAE – Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

CLSM – Microscopia Confocal de Varredura à Laser (do inglês: *Confocal Laser Scanning Microscopy*)

DUT – Dutasterida

EE – Eficiência de Encapsulação

ET – Etossoma

FD – Fator de direcionamento folicular

FP – Folículo Piloso

ION – Iontoforese

JAK – Janus quinase

LP – Lipossoma

MEV – Microscopia Eletrônica de Varredura

NP – Nanopartícula

PdI – índice de polidispersividade (do inglês: *Polydispersity Index*)

pI – Ponto isoelétrico

RE – Rotaevaporado

TF – Transfersoma

TRITC – Tetramethylrhodamine isothiocyanate

ζ-potencial – Potencial Zeta

SUMÁRIO

1.	Introdução	19
2.	Revisão de Literatura	20
2.1.	Pele e anexos subcutâneos	20
2.2.	Folículo piloso, pelos e cabelos	22
2.3.	Alopecia.....	23
2.4.	Dutasterida	26
2.5.	Tofacitinibe	27
2.6.	Via folicular	28
2.7.	Iontoforese	29
2.8.	Sistemas nanoparticulados	31
2.8.1.	<i>Gelatina - biopolímero</i>	32
2.8.2.	<i>Vesículas lipídicas</i>	32
2.8.3.	<i>Tamanho e profundidade de deposição</i>	33
3.	Objetivos	35
3.1.	Objetivo geral.....	35
3.2.	Objetivos específicos	35
4.	Seção Experimental	36
4.1.	EFEITO DO TAMANHO E DA CARGA DE NANOPARTÍCULAS DE GELATINA NA DEPOSIÇÃO IONTOFORÉTICA DIRECIONADA AOS FOLÍCULOS CAPILARES	37
4.1.1.	Introdução	37
4.1.2.	Material e Métodos	38
4.1.2.1.	<i>Materiais</i>	38
4.1.2.2.	<i>Preparação de nanopartículas de gelatina</i>	39
4.1.2.3.	<i>Caracterização de nanopartículas de gelatina</i>	40
4.1.2.3.1.	<i>Tamanho hidrodinâmico e potencial zeta</i>	40
4.1.2.3.2.	<i>Determinação do ponto isoelétrico</i>	40

4.1.2.3.3. <i>Morfologia e propriedades mecânicas</i>	41
4.1.2.3.4. <i>Eficiência de encapsulação e carregamento do fármaco</i>	41
4.1.2.4. <i>Experimentos de iontoforese</i>	42
4.1.2.4.1. <i>Preparo de eletrodos</i>	42
4.1.2.4.2. <i>Pontes salinas</i>	43
4.1.2.4.3. <i>Estabilidade das NPs na corrente elétrica</i>	43
4.1.2.4.4. <i>Experimentos de penetração iontoforética na pele</i>	44
4.1.2.4.5. <i>Microscopia Confocal de Varredura a Laser</i>	44
4.1.2.5. <i>Encapsulação do Tofacitinibe</i>	45
4.1.2.6. <i>Quantificação de Tofacitinibe por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência</i>	45
4.1.2.7. <i>Análises Estatísticas</i>	45
4.1.3. Resultados e Discussão	46
4.1.3.1. <i>Caracterização das NPs de gelatina</i>	46
4.1.3.2. <i>Experimentos de penetração cutânea com e sem iontoforese</i>	50
4.1.3.3. <i>Intensidade do sinal de microscopia confocal de varredura a laser</i>	55
4.1.3.4. <i>Encapsulação de Tofacitinibe</i>	59
4.1.4. Conclusões	61
4.1.5. Produtos científicos relacionados	62
4.2. POTENCIAL DE DIRECIONAMENTO FOLICULAR VESÍCULAS LIPÍDICAS CARREGADAS COM DUTASTERIDA PARA O TRATAMENTO DE ALOPECIA ANDROGENÉTICA.	63
4.2.1. Introdução	63
4.2.2. Material e métodos	65
4.2.2.1. <i>Materiais</i>	65
4.2.2.2. <i>Formação de lipossomas</i>	65
4.2.2.3. <i>Obtenção de etossomas</i>	66
4.2.2.4. <i>Caracterização de vesículas carregadas com DUT</i>	67
4.2.2.4.1. <i>Tamanho das vesículas e potencial zeta</i>	67

4.2.2.4.2. Doseamento de DUT e eficiência de encapsulação	67
4.2.2.4.3. Análises morfológicas	68
4.2.2.4.3.1. Microscopia eletrônica de transmissão	68
4.2.2.4.3.2. Microscopia de luz polarizada	68
4.2.2.5. Liberação do fármaco	68
4.2.2.6. Testes de penetração cutânea in vitro	69
4.2.2.7. Método analítico	69
4.2.2.8. Análise estatística	70
4.2.3. Resultados e Discussão	70
4.2.3.1. Caracterização dos lipossomas	70
4.2.3.2. Liberação de DUT in vitro - lipossomas	73
4.2.3.3. Experimento de penetração cutânea in vitro e efeito de direcionamento folicular - lipossomas	74
4.2.3.4. Caracterização dos etossomas	76
4.2.3.5. Ensaios de liberação de DUT in vitro – etossomas	78
4.2.3.6. Experimento de penetração cutânea in vitro e direcionamento folicular – etossomas	79
4.2.4. Conclusões	82
4.2.5. Produtos científicos relacionados	83
5. Conclusões gerais	85
REFERÊNCIAS	86
ANEXO I	108

1. Introdução

A pele é um alvo de muito interesse quando se trata da administração de fármacos, sendo a facilidade de acesso uma das características mais atrativas para esse fim (ANSELMO E MITRAGOTRI, 2014). No entanto, apesar dessa facilidade de acesso, sua estrutura complexa representa uma barreira difícil de transpor (NAIK et al., 2000). Um estrato córneo intacto impede a permeação da maioria das substâncias quando aplicadas topicamente, principalmente de moléculas grandes e hidrofílicas (LIU et al., 2010).

Os folículos pilosos (FPs) representam uma via alternativa para a penetração cutânea. Inicialmente, os FPs podem parecer uma área pequena, representando apenas 0,1% da superfície total da pele, mas a região do infundíbulo aumenta sua área total, além de representar uma descontinuidade na epiderme, que pode ser a porta de entrada de medicamentos para a corrente sanguínea (FANG et al., 2014). Além disso, os FPs também servem como reservatório de medicamentos associado à liberação sustentada, o que representa uma vantagem em comparação com a menor capacidade de tempo de retenção do estrato córneo (LADEMANN et al., 2006). Os FPs também são o alvo para a administração de medicamentos para o tratamento de diversas doenças que afetam a pele (PATZELT et al., 2011), como a alopecia.

A alopecia se refere à perda excessiva de cabelos do couro cabeludo ou de outra parte do corpo (LIN et al., 2019; SALIM; KAMALASANAN, 2020). Sua etiologia é diversa, podendo ser causada por condições genéticas, hormonais, nutricionais, por infecções ou outras causas idiopáticas. Ela pode ser dividida entre cicatricial, condição mais rara, na qual os FPs são irreversivelmente destruídos, e a não cicatricial, na qual o ciclo capilar está alterado, mas os folículos estão preservados (CARDOSO et al., 2021). Suas duas formas principais são a alopecia androgenética, caracterizada pela miniaturização dos FPs devido ao acúmulo de di-hidrotestosterona (DHT); e a alopecia areata, associada a problemas autoimunes e caracterizada por lesões arredondadas ou ovais com borda bem definidas (PRATT et al., 2017; TRÜEB; DIAS, 2018).

Em ambos casos, há um forte impacto psicológico nos pacientes, como depressão, ansiedade e baixa autoestima, reduzindo a qualidade de vida em geral (ADAMOWICZ et al., 2022; AUKERMAN; JAFFERANY, 2023; MARAHATTA; AGRAWAL; ADHIKARI, 2020). No entanto, as opções de tratamento são muito limitadas. Nesse contexto, diferentes estratégias para o direcionamento folicular de fármacos para o tratamento de alopecia foram exploradas.

2. Revisão de Literatura

2.1. Pele e anexos subcutâneos

A pele é o maior e mais externo órgão do corpo humano com uma área superficial de aproximadamente 2 m² e correspondendo à 15% do peso corporal de um indivíduo (BAJZA et al., 2020; KANITAKIS, 2002; KOLARSICK; KOLARSICK; GOODWIN, 2011). Ela serve como barreira física, química e imunológica entre o ambiente externo e interno, desempenhando um papel essencial na prevenção da perda excessiva de água corporal e da permeação de xenobióticos (LEE; KIM, 2022; NORLÉN et al., 2022; SCHAEFER; REDELMEIER, 1996). Ela é dividida em três camadas: epiderme, derme e hipoderme (tecido subcutâneo) (Figura 1).

A principal barreira da pele encontra-se na camada superior da epiderme e é chamada de estrato córneo. O estrato córneo é uma estrutura complexa composta por corneócitos, que são células queratinizadas, densamente compactadas e embebidas em uma bicamada lipídica, além disso, outros grandes componentes que contribuem para a hidrofobicidade da pele são as ceramidas e o colesterol (BAKER et al., 2023; FEINGOLD; ELIAS, 2014; PHATALE et al., 2022; SCHMITT; NEUBERT, 2018). Em circunstâncias normais, o estrato córneo restringe a penetração transdérmica de moléculas a um peso molecular de até 500 Da e lipofilicidade representada por um log *P* entre 1 e 3 (LIU; TESTA; FAHR, 2010; NAIK; KALIA; GUY, 2000; SCHOELLHAMMER; BLANKSCHTEIN; LANGER, 2014).

A formação do estrato córneo representa o estágio final da diferenciação epidérmica que ocorre de células das camadas mais internas da epiderme, isto é, da camada basal, que fica em contato com a derme e consiste em células cúbicas com baixo teor de queratina, passando pelas camadas espinhosa, granulosa e lúcida, tornando-se a cada etapa mais achatadas e queratinizadas até chegar ao estrato córneo, onde não possuem mais núcleo e citoplasma (BAJZA et al., 2020; FEINGOLD; ELIAS, 2014; KANITAKIS, 2002). Considerando todas as suas camadas, a epiderme possui uma espessura entre 0,5 e 1,0 mm, que pode variar dependendo da região corporal (HONARI; MAIBACH, 2014).

A derme também possui espessura variável dependendo da região, no entanto, é de 10 a 20 vezes mais espessa que a epiderme. Ela é constituída por colágeno, fibras de elastina e outros elementos da matriz extracelular. Sua principal função é promover estrutura, força, resistência e elasticidade para a pele, além de nutri-la. Já a hipoderme, também conhecida como tecido subcutâneo, é constituída por tecido adiposo e tecido conjuntivo frouxo, contendo nervos e vasos sanguíneos. Suas principais funções consistem em armazenamento energético,

isolamento térmico e proteção dos órgãos vitais (CEVC et al., 1996; CHI; WU; MORGAN, 2013; ENSHELL-SEIJFFERS; LINDON; MORGAN, 2008; MONTENEGRO et al., 2016).

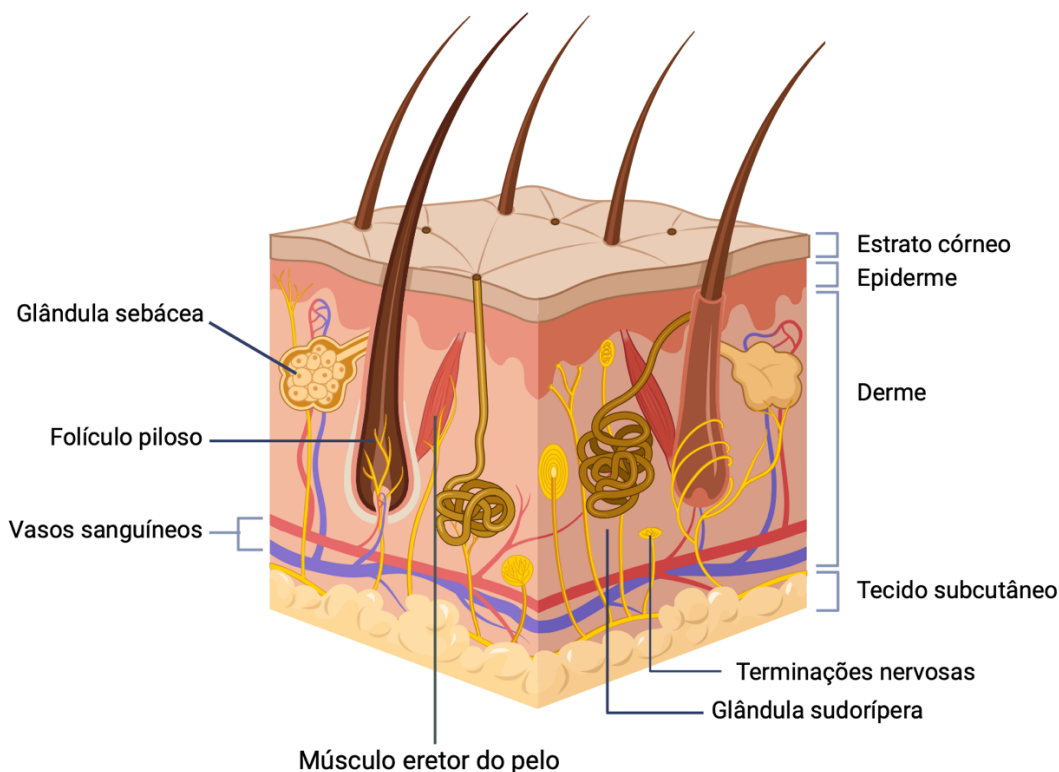


Figura 1 - Esquema representativo da pele e suas estruturas.

Apesar da eficiente barreira que a pele constitui há mecanismos específicos pelos quais diferentes moléculas podem penetrar através da pele. Quando topicamente aplicada, uma substância pode permanecer na camada superior da pele, i.e., no estrato córneo, ou pode atravessá-lo totalmente, acumulando-se em alguma camada da pele, sendo absorvida por outros tecidos ou atingindo a corrente sanguínea. Além disso, os diversos apêndices cutâneos, como as unhas, glândulas sudoríparas, glândulas sebáceas e os FPs, também representam importantes vias de permeação (HERMAN; HERMAN, 2015). Atualmente, são consideradas três vias de penetração cutânea (Figura 2): i) via intracelular, também conhecida como transcelular, na qual as moléculas passam através dos corneócitos; ii) via intercelular, na qual as moléculas passam pela matriz lipídica, em volta dos corneócitos. Um recente estudo mostrou que quanto mais hidrofílica uma molécula, maior sua preferência pelo transporte transcelular e quanto mais lipofílica, maior afinidade de uma molécula pela matriz intercelular em torno dos corneócitos (GOEL et al., 2024). Por fim, iii) a penetração pode ocorrer através de apêndices cutâneos, especialmente pela via folicular (PATZELT; LADEMANN, 2013), que será aprofundada no item 1.8.

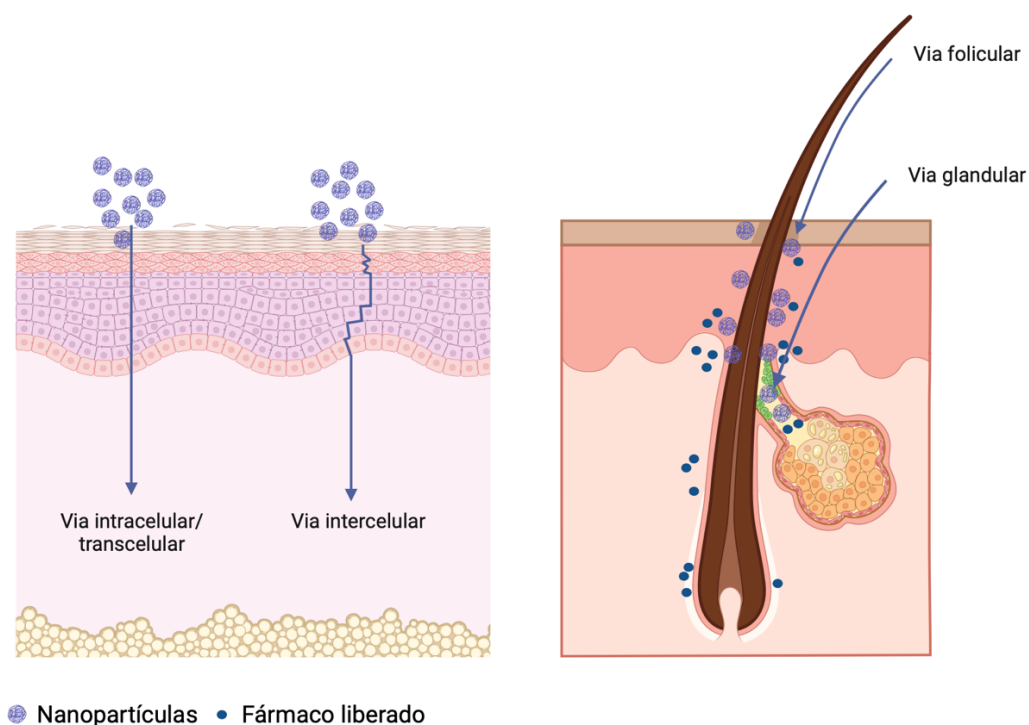


Figura 2 - Vias de permeação para fármacos na pele.

2.2. Folículo piloso, pelos e cabelos

A base dos FPs está localizada na parte profunda da derme (VERMA et al., 2016). Junto com o pelo ou cabelo, com a glândula sebácea e com o músculo eretor do pelo, formam a unidade pilosebácea (figura 3). Os FPs podem ser divididos em duas partes, uma cíclica (bulbo e regiões suprabulbar) e uma não cíclica (infundíbulo e istmo) e pode ainda ser subdividido em quatro regiões: (i) infundíbulo, que compreende da abertura do FP na epiderme até a inserção da glândula sebácea; (ii) o istmo, região na qual se insere o músculo eretor do pelo e onde são encontradas células-tronco melanocíticas e epiteliais; (iii) a região suprabulbar, um alongamento formado por células epiteliais; (iv) e o bulbo capilar, que contém células indiferenciadas de rápida proliferação, além de melanócitos e outras células. É no bulbo também que se encontra a papila dérmica, um pequeno conjunto de fibroblastos densamente compactados, que dita o tamanho do bulbo, o diâmetro e o comprimento do fio capilar e a duração da fase anágena (COTSARELIS, 2006; SCHNEIDER; SCHMIDT-ULLRICH; PAUS, 2009; STENN; PAUS, 2001; VERMA et al., 2016).

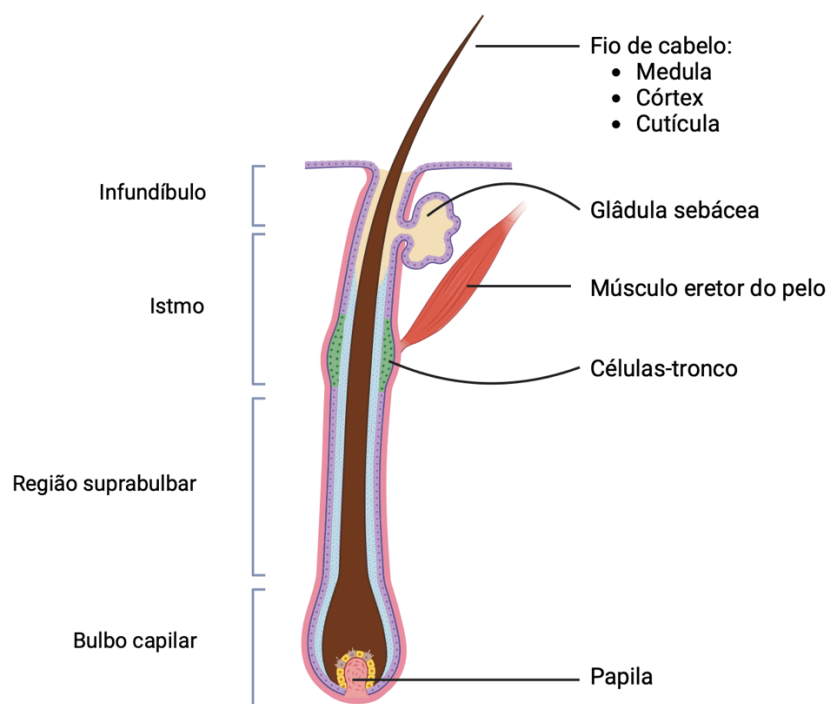


Figura 3 - Unidade pilosebácea.

O crescimento capilar é cíclico e dividido em 3 fases (PANTELEYEV, 2018; ROOK, 1965): anágena, que é a fase ativa de crescimento do pelo, na qual o pelo atinge seu pico de volume e comprimento, essa fase dura de 2 a 6 anos e 84% do cabelo encontra-se nela (NISHIMURA et al., 2002); a catágena, é a fase de involução, quando o pelo para de crescer, nesse momento o epitélio do folículo inferior se desintegra e ocorre uma aproximação do bulbo capilar com a zona de células-tronco, essa fase dura em média de 2 a 4 semanas, apenas 1 a 2% do cabelo encontra-se nela (SHAROV et al., 2005); e, por fim, a telógena, que é a fase de queda, caracterizada pela acentuada diminuição na atividade proliferativa e bioquímica do FP, com duração de 3 a 4 meses e corresponde a fase de 10 a 15% do cabelo (RABBANI et al., 2011).

Nos humanos, os fios podem ser de dois tipos, cabelos mais espessos, com capacidade de crescer mais e bem pigmentados chamados de terminais, como os encontrados na cabeça, barba, axilas e região púbica; e cabelos *velus*, que são mais finos, hipopigmentados e mais curtos, normalmente encontrado no rosto de mulheres e em patologias como a alopecia (COTSARELIS, 2006).

2.3. Alopecia

A alopecia é um termo genérico que se refere à perda excessiva de cabelos do couro cabeludo ou de qualquer outra parte do corpo, podendo evoluir para a perda total de cabelos no

escalpo (*alopecia totalis*) ou, em casos mais extremos, pode evoluir para a perda total de pelos do corpo inteiro (*alopecia universalis*) (LIN et al., 2019; SALIM; KAMALASANAN, 2020). Sua etiologia é diversa, podendo ser causada por condições genéticas, hormonais, nutricionais, por infecções ou outras causas idiopáticas. Ela pode ser dividida entre cicatricial, condição mais rara, na qual os FPs são irreversivelmente destruídos, e a não cicatricial, na qual o ciclo capilar está alterado, mas os folículos estão preservados (CARDOSO et al., 2021).

A alopecia androgenética é a forma mais popular de perda capilar afetando 80% de homens caucasianos e 40% de mulheres caucasianas abaixo de 70 anos de idade, com grande impacto psicossocial negativo na vida desses pacientes (ALSANTALI; SHAPIRO, 2009; PRICE, 1999). Embora a alopecia androgênica seja uma doença multifatorial, o impacto hormonal nas alterações do ciclo capilar que levam à miniaturização dos folículos capilares está bem estabelecido (KATZER et al., 2019).

O aumento de di-hidrotestosterona (DHT), metabólito da testosterona pela ação da enzima 5-alfa redutase presentes nos FPs, principalmente na papila dérmica e na bainha radicular interna e externa na região do bulbo dos folículos capilares, causa a miniaturização dos FPs (Figura 4) (KATZER et al., 2019; LOLLI et al., 2017). A ligação da DHT nos receptores de andrógeno inicia uma cascata de sinalização que leva a uma fase anágena, ou seja, período de crescimento capilar mais curta, e uma fase telógena prolongada, ou seja, a fase de queda. Essas mudanças no ciclo capilar causam a substituição dos fios terminais por fios intermediários e depois vellus, em alguns casos evoluindo para calvície completa (DE LACHARRIÈRE et al., 2001; KATZER et al., 2019).

Já a alopecia areata é a segunda forma mais prevalente de alopecia, de etiologia complexa, associada a problemas autoimunes de diversas origens, nas quais os linfócitos atacam as células do bulbo dos FPs durante a fase anágena do ciclo capilar, resultando em lesões arredondadas ou ovais com borda bem definidas (PRATT et al., 2017; TRÜEB; DIAS, 2018).

Embora não seja uma condição que apresente risco de vida, a alopecia causa um forte impacto psicológico nos pacientes, como depressão, ansiedade e baixa autoestima, reduzindo a qualidade de vida em geral (ADAMOWICZ et al., 2022; AUKERMAN; JAFFERANY, 2023; MARAHATTA; AGRAWAL; ADHIKARI, 2020). Estudos mostram que a carga psicossocial é especialmente maior em homens mais jovens com início precoce de alopecia androgênica, que pode ocorrer antes dos 30 anos (LIU et al., 2024; SANKE et al., 2016; TAN; JAFFERANY, 2024). No entanto, ainda carece de um tratamento sustentável, eficaz e seguro.

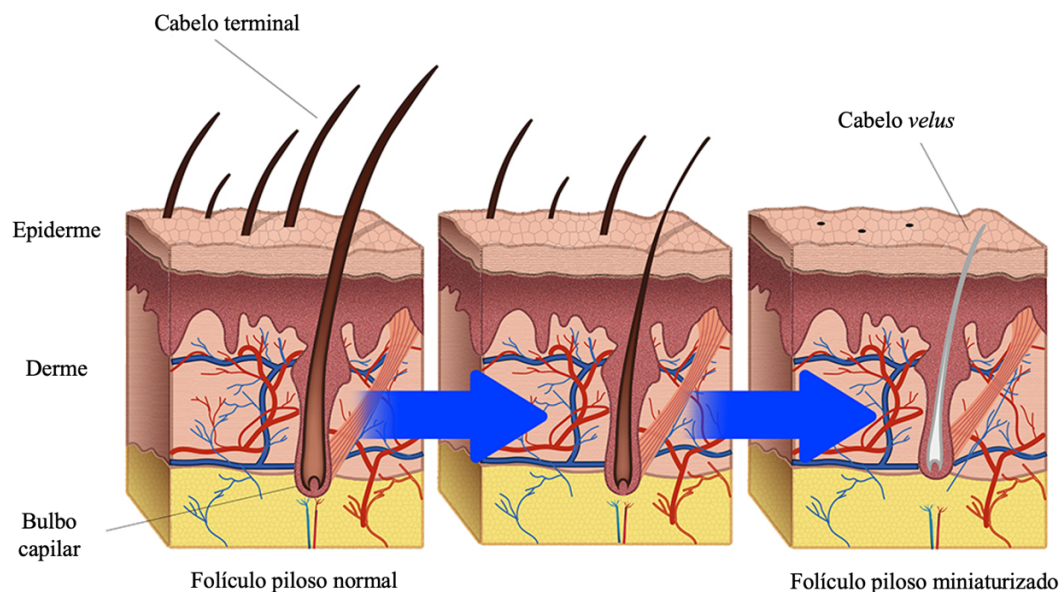


Figura 4 - Esquema da progressão do folículo piloso na alopecia androgenética. Adaptado de CARDOSO et. al., 2021, com autorização. (Clinical, Cosmetic and Investigational Dermatology 2021 14 485-499' Originally published by and used with permission from Dove Medical Press Ltd.).

O tratamento da alopecia androgenética é feito, principalmente, por medicação oral, com inibidores da 5-alfa redutase, como a finasterida e a dutasterida ou de forma tópica com soluções de minoxidil, responsável por melhorar o fluxo sanguíneo na região e prolongar a fase anágena (PHILLIPS; SLOMIANY; ALLISON, 2017). No entanto, todos eles apresentam sérias limitações, o minoxidil possui baixa solubilidade em água, sendo veiculado, geralmente, em soluções com alto teor alcoólico, o que pode ser extremamente irritativo para a pele, principalmente após repetidas aplicações (JEONG et al., 2019; SHARMA et al., 2019; WANG et al., 2017). Além disso, ele possui uma eficiência limitada por depender de outras enzimas para ser convertido na sua forma ativa, o sulfato de minoxidil. Para melhorar essa limitação, o minodixil passou a ser estudado na sua forma sulfatada, de fato, ele se mostrou 14 vezes mais eficaz que o minoxidil base em estudos *in vitro* (MESSENGER; RUNDEGREN, 2004), no entanto, o sulfato de minoxidil possui uma massa molecular 40% maior que a base do seu composto (289,3 g/mol contra 209,3 g/mol, respectivamente), o que compromete a permeação transdérmica e, apesar de possuir maior solubilidade em água, a forma sulfatada é instável nesse veículo, comprometendo a biodisponibilidade do fármaco (DIAS et al., 2018). Já a finasterida pode causar efeitos adversos sexuais importantes como disfunções erétil, de ejaculação, impotência sexual e ginecomastia em homens (MADHESWARAN et al., 2013), o que diminui substancialmente a adesão ao tratamento.

2.4. Dutasterida

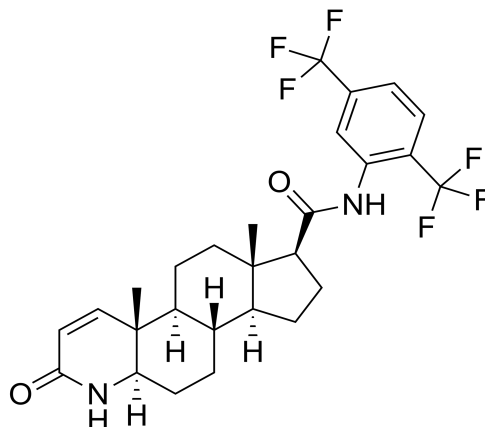


Figura 5 - Estrutura química da DUT (MM: 528.53 g/mol).

A dutasterida (Figura 5) também é um fármaco inibidor da 5-alfa redutase, assim como a finasterida, mas de segunda geração. Inicialmente ela foi aprovada para o tratamento de hiperplasia prostática benigna, mas após devido aos seus efeitos tricogênicos e ao seu amplo uso *off-label*, a ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária) aprovou o medicamento Avodart® (Dutasterida 0,5 mg) para o tratamento oral de alopecia androgenética. A dutasterida oral também é aprovada pela EMA (*European Medicines Agency*) para o tratamento da alopecia androgenética em alguns países europeus. Nos Estados Unidos, apesar de não ser aprovada pela FDA (*Food and Drug Administration*), ela também vem sendo utilizada *off-label* no tratamento da alopecia androgenética (KELLY; BLANCO; TOSTI, 2016). Estudos clínicos mostram que ela é mais potente que a finasterida (GUBELIN HARCHA et al., 2014; OLSEN et al., 2006), pois é capaz de inibir tanto a isoenzima 5-alfa redutase 1, encontrada na pele, FPs e glândulas sebáceas, quanto a isoenzima tipo 2, localizada na região peitoral, genital, prostática e nos FPs na região peribulbar; levando a uma redução de 90% dos níveis de DHT, em comparação com 70% da finasterida (BUSANELLO; TURCATEL, 2018; URYSIK-CZUBATKA; KMIEĆ; BRONIARCZYK-DYŁA, 2014).

No entanto, a dutasterida apresenta os mesmos efeitos adversos sistêmicos que a finasterida, o que também limita o seu uso oral (HERZ-RUELAS et al., 2020). Mas uma característica importante que as diverge está na longa meia-vida da dutasterida de 3 a 5 semanas, enquanto a finasterida possui uma meia-vida de 5 a 6h. Unindo-se isso à maior potência da dutasterida, a chance de causar efeitos adversos aumenta. Portanto, uma aplicação localizada e direcionada para os FPs, aumentaria as chances de sucesso do tratamento da alopecia androgenética. No entanto, a veiculação da dutasterida para uma aplicação tópica pode

ser um desafio. A dutasterida é um fármaco muito lipofílico ($\log P$ 5,79), o que impede sua incorporação em diversos veículos e sua penetração cutânea. Por tanto, o desenvolvimento de um sistema de liberação que melhore as características físico-químicas da dutasterida e a direcione para os FPs, diminuindo assim os riscos de efeitos adversos, é de extremo interesse para tratar a alopecia androgenética.

2.5. Tofacitinibe

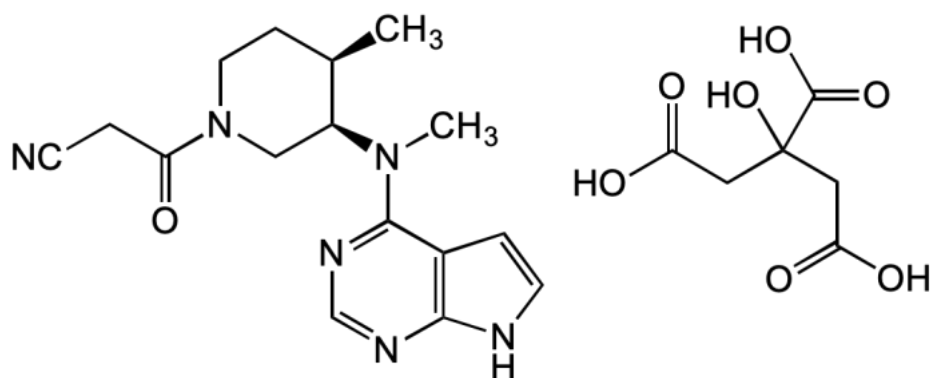


Figura 6 - Estrutura química do Citrato de Tofacitinibe (MM: 504.5 g/mol).

Esse tipo de limitação físico-química de fármacos também está presente em outras classes de medicamentos, como os inibidores de *Janus* quinase (JAK), cada vez mais explorados como alternativa de tratamento na alopecia areata, *totalis* e *universalis*, ao invés dos esteroides e corticoides geralmente usados, por também inibir a cascata inflamatória associada com essa condição, além de promover a reentrada da fase anágena dos FPs pela indução de fatores de crescimento (SARDANA; BATHULA; KHURANA, 2023).

O tofacitinibe (Figura 6) é um inibidor de JAK não seletivo, inicialmente aprovado para o tratamento de colite ulcerativa, artrite reumatoide e outras artrites, mas que tem se mostrado eficaz no tratamento de alopecia areata tanto em adultos quanto em crianças e adolescentes (DAI; CHEN, 2019; JERJEN et al., 2021; KENNEDY CRISPIN et al., 2016; KIBBIE et al., 2022; LIU et al., 2017).

Atualmente, devido a sua baixa solubilidade em água, ele e outros inibidores JAK são administrados por via oral. Acontece que alguns receptores JAK, principalmente JAK-2, estão presentes no corpo inteiro, o que leva a efeitos adversos importantes, principalmente com inibidores de primeira geração, que são não-seletivos (SARDANA; BATHULA; KHURANA, 2023). Os efeitos adversos mais comuns são infecções moderadas do trato respiratório, dores de cabeça, náuseas, edema, erupção cutânea (IBRAHIM et al., 2017; LIU et al., 2017), no entanto efeitos adversos mais graves como tromboembolismo venoso, acidentes vasculares

cardíacos e cerebrais e morte cardiovascular já foram reportados (BIEBER et al., 2021; MEASE et al., 2020; YTTERBERG et al., 2022).

Considerando que a manutenção do sucesso do tratamento com inibidores de JAK depende do tratamento contínuo com o fármaco (SHREBERK-HASSIDIM; RAMOT; ZLOTOGORSKI, 2017; TEGTMEYER et al., 2021) e na seriedade dos efeitos adversos, novamente se faz necessário o desenvolvimento de um sistema de liberação que permita o direcionamento do ativo farmacêutico para os FPs, tanto para melhorar suas características físico-químicas e potencializar a permeação do fármaco, quanto para minimizar os efeitos adversos sistêmicos, tornando o tratamento mais seguro.

2.6. Via folicular

Nesse contexto, a via folicular tem sido investigada ao longo dos anos (ANGELO et al., 2020; LADEMANN et al., 2006; MATOS et al., 2015; OLIVEIRA et al., 2022; PATZELT et al., 2011; PEREIRA et al., 2021; TOLENTINO et al., 2021; USHIROBIRA et al., 2020). A porção inicial do infundíbulo é revestida por camadas epiteliais do estrato córneo e da epiderme, no entanto, a sua porção final sofre uma descontinuidade epidérmica em direção ao istmo, sendo este o principal ponto de entrada para agentes terapêuticos topicamente aplicados (PATZELT; LADEMANN, 2020). Além disso, o acesso à glândula sebácea e a vasos sanguíneos também abre a possibilidade para a liberação sistêmica de fármacos (JAIN et al., 2016; VERMA et al., 2016).

Ainda, diversos estudos de permeação cutânea *in vitro* realizados bloqueando-se os FPs demonstram a relevância dessa via, fazendo com que possam, em diversos casos, servir como a principal via de penetração para medicamentos aplicados topicamente (KNORR et al., 2009; LADEMANN et al., 2015; MEIDAN; BONNER; MICHNIAK, 2005; OSSADNIK et al., 2007; SANTOS et al., 2018; TEICHMANN et al., 2006).

Ademais, os FPs servem como reservatório para os fármacos, possibilitando uma liberação controlada dos medicamentos aplicados sobre a pele, de fato, partículas e fármacos possuem um tempo de armazenamento mais longo quando estão dentro dos folículos do que quando estão sobre o estrato córneo (BLUME-PEYTAVI et al., 2011; SCHAFFERKORTING; MEHNERT; KORTING, 2007), um estudo mostrou que NPs de hidrogel foram achadas nos folículos até 10 dias após a aplicação tópica, comparado com apenas 1 dia de armazenamento dessas partículas no estrato córneo (LADEMANN et al., 2006).

2.7. Iontoforese

A ION é a aplicação de uma corrente elétrica de baixa intensidade a uma formulação farmacêutica, com o auxílio de uma fonte de alimentação externa, com o objetivo de aumentar a penetração do fármaco em um tecido biológico (Figura 7). O estímulo físico, aplicado de forma não invasiva, proporciona não só o controle da cinética de entrada dos medicamentos, como também o início rápido do efeito farmacológico (KALIA et al., 2004; SINGHAL et al., 2021b).

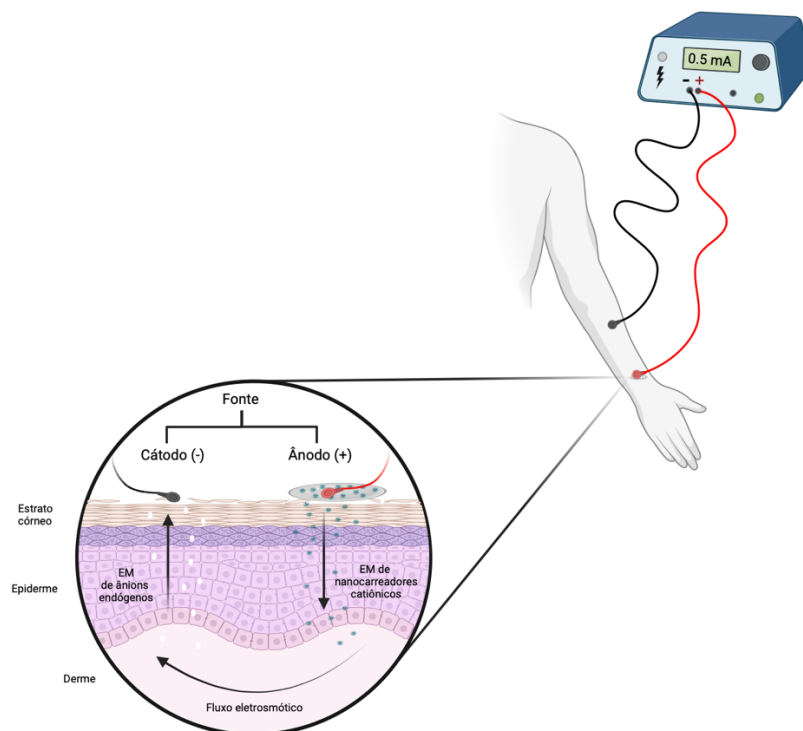


Figura 7 - Esquema da aplicação de iontoforese na pele para permeação de nanocarreadores catiônicos em pH fisiológico. A formulação é colocada no eletrodo de mesma carga e o eletrodo de retorno é posicionado em outra parte do tecido para completar o circuito. A eletromigração promove o movimento dos nanocarreadores do ânodo para o cátodo, enquanto ânions endógenos (Cl^-) se movem do cátodo para o ânodo para equilíbrio do sistema. O fluxo eletrosmótico se move do ânodo para o cátodo em pH fisiológico. Adaptado de Andrade et al., 2023.

Essa técnica tem sido amplamente explorada para permeação transdérmica de fármacos. Diferentes estudos mostram a melhora efetiva da entrega de múltiplos agentes terapêuticos, principalmente de fármacos com propriedades físico-químicas inadequadas para absorção gastrointestinal, especialmente considerando o estado ionizado de ingredientes farmacêuticos ativos em pH fisiológico, o que é mais uma característica mais desejável do que um problema para o transporte iontoforético (CÁZARES-DELGADILLO et al., 2016; LAPTEVA et al., 2020; SANTER et al., 2017; SINGHAL et al., 2021a, 2021b).

De fato, até hoje, a ION é marcadamente eficiente para melhorar o transporte de pequenas moléculas carregadas e íons (ABLA et al., 2005, 2006; GELFUSO et al., 2008; KALARIA et al., 2018; SINGHAL et al., 2019); mas, cada vez mais, proteínas e peptídeos maiores também têm sido transportados por ION de maneira bem-sucedida (CÁZARES-DELGADILLO et al., 2007; DARADE et al., 2022; DEL RÍO-SANCHO et al., 2017; DUBEY et al., 2011; DUBEY; KALIA, 2010, 2011; KRISHNAN et al., 2014). Além disso, o transporte iontoforético possibilita a constituição de sistemas para co-permeação de múltiplos fármacos ao mesmo tempo, com a mesma carga ou de cargas opostas (CÁZARES-DELGADILLO et al., 2016; KALARIA et al., 2018; TYAGI et al., 2019; TYAGI; SERNA-JIMÉNEZ; KALIA, 2021).

O aumento da permeação por ION é atribuído a três componentes: a permeação passiva, a eletromigração (EM) e a eletrosmose (EO). A permeação passiva pode ser aumentada para moléculas com características específicas de tamanho e lipofilicidade devido à formação de poros transitórios na pele, causados pela reorientação de lipídios e proteínas do estrato córneo que ocorre na presença de uma corrente elétrica (GRATIERI; KALIA, 2013). No entanto, o tamanho desses poros tem um raio estimado de 20 nm (AGUILELLA et al., 1994), o que ainda representa um tamanho muito reduzido para a maioria dos fármacos ou sistemas de liberação, por isso, a contribuição da permeação passiva é frequentemente ignorada quando se trata de transporte iontoforético.

O eletrotransporte seria mediado, então, pela EM e pela EO (ANDRADE et al., 2023). A EM é o movimento ordenado de íons e moléculas carregadas na presença de uma corrente elétrica (GRATIERI; KALIA, 2013). Já EO é o fluxo de solvente criado em resposta à aplicação de um potencial elétrico através de uma membrana ionizada, carregando consigo molécula neutras proporcionalmente a sua concentração, independentemente do tamanho (GRATIERI; KALIA, 2013; KALIA et al., 2004).

A contribuição da EM para o transporte iontoforético depende da mobilidade eletroforética da molécula, que se refere à relação massa-carga (LAPTEVA et al., 2020; MARTINS ANDRADE et al., 2022). Dessa forma, moléculas maiores têm menor mobilidade eletroforética. Nos primeiros estudos, havia uma noção geral de que a EO seria o principal mecanismo de transporte para moléculas maiores. Um estudo recente demonstrou o sucesso da administração tópica de cetuximabe, um anticorpo monoclonal de 152 kDa, na derme superior de pele de orelha suína, com a EO confirmada como o principal componente do transporte iontoforético e os caminhos folicular e intercelular como principais vias de penetração na pele

(LAPTEVA et al., 2020) . Contudo, o fluxo eletrosmótico só é criado na presença de cargas negativas fixas, ausentes nas camadas mais profundas da pele, o que poderia impedir o transporte iontoforético de moléculas maiores (LAPTEVA et al., 2020). No entanto, esta noção de EO como o mecanismo dominante de eletrotransporte para moléculas superiores a 3 a 4 kDa foi superada pela entrega bem sucedida de citocromo C, uma proteína altamente carregada positivamente com peso de 12,4 kDa, por ION através da pele intacta de orelha suína, com EM confirmado como o componente principal durante a aplicação de ION, mostrando que a mobilidade eletroforética pode compensar o peso molecular (CÁZARES-DELGADILLO et al., 2007) . Este também foi o caso do transporte iontoforético de ribonucleases A e T1 de 13,6 kDa e 11,1 kDa, respectivamente, e do fator de crescimento básico de fibroblastos humano de 17,4 kDa, em todos os casos, a EM foi confirmada como o mecanismo dominante de transporte (DUBEY et al. , 2011; DUBEY E KALIA, 2011, 2010) .

Além disso, diferentes estudos mostraram que o caminho preferencial da corrente elétrica durante a ION passa pelos FPs por ser considerada a rota de menor resistência elétrica na pele, devido à interrupção da barreira epidérmica nessas estruturas (CULLANDER; GUY, 1991; GELFUSO et al., 2013; KAJIMOTO et al., 2011; PATZELT; LADEMANN, 2020; TURNER; GUY, 1998).

2.8. Sistemas nanoparticulados

Os nanocarreadores são outra forma de melhorar a permeação transdérmica de medicamentos, uma vez que são capazes de melhorar as características físico-químicas, a estabilidade, as propriedades organolépticas, além de proporcionar a liberação controlada e prolongada de fármacos (FERREIRA-NUNES et al., 2018; GOYAL et al., 2016; LIMA et al., 2022; PATZELT; LADEMANN, 2020; QUINTÃO et al., 2019). Uma característica especialmente interessante é que nanocarreadores aplicados topicamente tendem a ser acumular nos FPs (ANGELO et al., 2020; MATOS et al., 2015; PIRES et al., 2019; SANTOS et al., 2018; TOLENTINO et al., 2021; USHIROBIRA et al., 2020).

Nanopartículas (NPs) são estruturas de dimensões nanométricas. Embora inicialmente esse termo se limitasse a partículas de 1 a 100 nm, atualmente ele se refere a qualquer partícula abaixo de 1000 nm (YASMIN et al., 2017). Seu tamanho reduzido e sua alta relação área de superfície-volume as tornam sistemas de liberação de fármacos promissores. Elas podem ser obtidas por materiais sintéticos, como os polímeros polietilenoglicol (PEG), ácido polilático-co-ácido glicólico (PLGA) e ácido polivinílico (PVA); ou matérias de origem natural, como

lipídios e outros polímeros como gelatinas e quitosana. Tendo em vista questões de biocompatibilidade e biodegradabilidade, os materiais naturais costumam ser selecionados para a produção de nanocarreadores (STEVENS et al., 2002; YASMIN et al., 2017).

2.8.1. Gelatina - biopolímero

A gelatina é um polímero natural, considerado um material de baixo custo, fácil acessibilidade, baixa antigenicidade e não-carcinogênico, que possui uma estrutura de tripla hélice feita a partir de três aminoácidos principais: alanina, glicina e prolina (ABRAMS et al., 2006; BAJPAI; CHOUBEY, 2006). Resíduos de ácido aspártico e glutâmico são responsáveis por conferir grupos aniônicos à gelatina, enquanto a lisina e arginina são responsáveis por seus grupos catiônicos (ELZOGHBY, 2013).

Ela é uma macromolécula hidrofílica com peso molecular que varia de 15 a 250 kDa, a ampla variedade de tamanhos e diferenças em outras propriedades físico-químicas se deve às diversas fontes de colágeno disponíveis, sendo obtida, principalmente, a partir da hidrólise do colágeno de suínos, que dão origem à gelatina tipo A; e bovinos, que dão origem à gelatina tipo B (ELZOGHBY, 2013).

Uma das principais diferenças entre esses dois tipos de gelatina é o seu ponto isoelétrico. A gelatina tipo A é obtida a partir da hidrólise ácida do colágeno suíno e possui ponto isoelétrico entre pH 6,0 e 9,5, enquanto a gelatina tipo B, proveniente da hidrólise básica do colágeno bovino, possui ponto isoelétrico inferior em torno de pH 4,5 e 5,5 (COURTS, 1954; FLORY; WEAVER, 1960; KOMMAREDDY; SHENOY; AMIJI, 2003). Isto abre a possibilidade de se produzir NPs de gelatina com cargas opostas, mas com o mesmo material, tornando os resultados mais comparáveis. De fato, a gelatina é amplamente utilizada na indústria farmacêutica no preparo de formulações, como revestimento de cápsulas e na produção de micro e nanopartículas, dentre outras aplicações.

2.8.2. Vesículas lipídicas

Embora NPs de gelatina sejam nanocarreadores promissores, elas são adequadas para encapsular fármacos hidrofílicos. No entanto, muitas moléculas de interesse são lipofílicas e requerem outros sistemas de liberação de fármacos mais compatíveis. Nesse sentido, as vesículas lipídicas surgem como uma opção de interesse para veicular tais fármacos.

Lipossomas são vesículas esféricas constituídas por uma bicamada lipídica com núcleo aquoso e que são capazes de se dispersar em um meio também aquoso (SHAH et al., 2020). Essa estrutura permite o carregamento tanto de fármacos lipofílicos quanto de fármacos hidrofílicos (LIN; MALMSTADT, 2019). Os lipossomas são constituídos principalmente por fosfolipídios, que são biodegradáveis e biocompatíveis. Além disso, os lipídios dos lipossomas apresentam semelhança e interação com os lipídios presentes no estrato córneo e no sebo dos FPs (SHAH et al., 2020). Quando aplicados topicamente, essa interação resulta na formação de um filme com efeito oclusivo, proporcionando um tempo de contato prolongado entre a formulação e o local-alvo, aumentando a penetração do fármaco (ANDRADE et al., 2014; CAMERA et al., 2010; TOLENTINO et al., 2020).

Com pequenas alterações em sua composição, é possível obter lipossomas com diferentes características. O colesterol é muito utilizado para aumentar a estabilidade das vesículas, além disso, ele também aumenta a rigidez da bicamada lipídica (HUNG et al., 2007; KADDAH et al., 2018). Em contrapartida, também é possível obter vesículas mais flexíveis adicionando-se etanol em sua composição, nesse caso, a vesícula é nomeada etossoma (JAFARI et al., 2023). É ainda possível obter vesículas ultra-flexíveis, também chamadas de transfersomas, através da adição de tensoativos em sua composição (AKRAM et al., 2021). É esperado que essas alterações impactem de formas diferentes a entrega de fármacos.

2.8.3. Tamanho e profundidade de deposição

O transporte eficiente do fármaco para os FPs deve levar diversos fatores em consideração, sendo o tamanho uma característica crucial no sucesso da permeação por essa via (LADEMANN et al., 2015; PATZELT et al., 2011). Além disso, os FPs são estruturas com diversos alvos terapêuticos localizados em diferentes profundidades. Por exemplo, as glândulas sebáceas são alvo para o tratamento de acne e hidradenite supurativa (PEREIRA et al., 2021; TOLENTINO et al., 2021). Enquanto o bulbo, região que controla o crescimento capilar, e a região suprabulbar, responsável pela reconstituição folicular, são alvos para o tratamento de alopecia (ANGELO et al., 2020; USHIROBIRA et al., 2020). Portanto, modular o tamanho das NPs é uma forma de tornar o direcionamento de fármacos na via folicular mais específico.

A espessura do fio de cabelo oferece uma boa referência para o tamanho ideal de NPs direcionadas à via folicular, cabelos terminais humanos possuem uma espessura média de 530 nm (LADEMANN et al., 2009). Corroborando essa ideia, um estudo clássico nessa área mostra a relação entre o tamanho de NPs de sílica e PLGA variando entre, aproximadamente, 100 nm a 1000 nm e sua profundidade de deposição nos folículos de pele de orelha suína. Os resultados

mostram que partículas entre 600 e 700 nm foram capazes de penetrar mais profundamente nessas estruturas comparando-se com partículas menores e maiores (PATZELT et al., 2011).

No entanto, estudos mais recentes demonstram que o polímero escolhido também pode interferir na permeação, NPs de ácido hialurônico de 417 nm foram mais eficientes na entrega de clindamicina aos FPs em comparação com NPs de quitosana de 362 nm carregadas com o mesmo medicamento devido às diferentes interações dos polímeros com o estrato córneo e o conteúdo folicular (TOLENTINO et al., 2021). Tendo isto como base, é proposto que a carga superficial das partículas também possa interferir na sua deposição nos FPs.

3. Objetivos

3.1. Objetivo geral

Avaliar diferentes estratégias de direcionamento folicular de fármacos para o tratamento de tópico da alopecia.

3.2. Objetivos específicos

- Verificar o efeito do tamanho e da carga de nanopartículas de gelatina em sua deposição nos folículos pilosos com e sem iontoforese:
 - Produzir nanopartículas de gelatina de diferentes tamanhos e cargas opostas;
 - Encapsular um corante fluorescente nas nanopartículas de gelatina para visualização;
 - Caracterizar as nanopartículas em termos de tamanho, pDI, carga superficial e morfologia;
 - Realizar ensaios de estabilidade das nanopartículas em frente à corrente elétrica;
 - Realizar ensaios de permeação passiva cutânea *in vitro*;
 - Realizar ensaios de permeação cutânea *in vitro* com iontoforese;
 - Verificar o perfil de deposição das nanopartículas de gelatina por microscopia confocal de varredura à laser.
- Desenvolver e avaliar o potencial de vesículas lipídicas para o direcionamento folicular de dutasterida:
 - Produzir vesículas lipídicas carregadas com dutasterida com diferentes composições de bicamada lipídica;
 - Caracterizar as vesículas de termos de tamanho, pDI, carga superficial e morfologia;
 - Realizar ensaios de liberação da dutasterida *in vitro* das diferentes formulações e controle;
 - Realizar ensaios de permeação passiva cutânea *in vitro* com todas as diferentes vesículas e controle;
 - Determinar o fator de direcionamento folicular de cada sistema de liberação.

4. Seção Experimental

Com base nos objetivos do trabalho, a seção experimental foi organizada em duas partes:

- Parte I (*item 4.1.*): Efeito do tamanho e da carga de nanopartículas de gelatina na deposição iontoforética direcionada aos folículos capilares
- Parte II (*item 4.2.*): Potencial de direcionamento folicular de vesículas lipídicas carregadas com dutasterida para o tratamento de alopecia androgenética.

4.1. EFEITO DO TAMANHO E DA CARGA DE NANOPARTÍCULAS DE GELATINA NA DEPOSIÇÃO IONTOFORÉTICA DIRECIONADA AOS FOLÍCULOS CAPILARES

4.1.1. Introdução

A pele tem sido amplamente investigada como via de permeação de medicamentos, sendo a facilidade de acesso uma das características mais atrativas para esse fim (ANSELMO E MITRAGOTRI, 2014). No entanto, a estrutura complexa da pele continua a ser uma barreira difícil de ultrapassar (NAIK et al., 2000). Um estrato córneo intacto impede a permeação da maioria das substâncias grandes e hidrofílicas aplicadas topicamente (LIU et al., 2010). Neste contexto, os folículos pilosos (FPs) representam uma via alternativa promissora para a administração de medicamentos (PATZELT et al., 2011). À primeira vista, os FPs podem parecer uma área pequena, representando apenas 0,1% da superfície total da pele, mas na face e no couro cabeludo, estas estruturas respondem por 10% da área de superfície total (MEIDAN ET AL., 2005; SCHAEFER; REDELMEIER, 1996). Além disso, a região do infundíbulo aumenta sua área total, além de representar uma descontinuidade no tecido epidérmico, permitindo a rápida entrega de medicamentos para a corrente sanguínea (FANG et al., 2014). Ademais, os FPs servem como reservatório de medicamentos associado à liberação sustentada, o que é uma vantagem em comparação com a menor capacidade de tempo de retenção do estrato córneo (LADEMANN et al., 2006).

A iontoforese (ION) é uma técnica física capaz de melhorar a administração transdérmica de diferentes moléculas hidrofílicas (KALIA et al., 2004). Para isso, a ION consiste na aplicação de uma corrente elétrica baixa ($\leq 0,5 \text{ mA/cm}^2$) a uma formulação aplicada em um tecido biológico (KALIA et al., 2004; LAPTEVA et al., 2020). É proposto que a corrente elétrica passe preferencialmente pelos FPs, pois eles apresentam uma via de menor resistência devido à descontinuidade da epiderme nessa região (CULLANDER; GUY, 1991; GELFUSO et al., 2013; KAJIMOTO et al., 2011; TURNER; GUY, 1998).

A nanotecnologia também tem sido explorada ao longo dos anos em um esforço contínuo para contornar a barreira que a pele representa e tornar a administração de medicamentos mais eficiente. Os nanocarreadores podem melhorar as características físico-químicas dos insumos farmacêuticos ativos (QUINTÃO et al., 2019), proporcionando não apenas maior estabilidade às substâncias (FERREIRA-NUNES et al., 2018; GOYAL et al., 2016; LIMA et al., 2022 ; ROSEN et al., 2015), mas também promovendo a liberação controlada e sustentada de fármacos (PATZELT; LADEMANN, 2020). Além disso, as nanopartículas (NPs) tendem a se

acumular preferencialmente nos FPs quando aplicadas topicamente, o que as torna um sistema promissor para atingir essas estruturas (PATZELT et al., 2011; TEICHMANN et al., 2006).

Portanto, seria lógico combinar a aplicação da ION para a administração de medicamentos nanoencapsulados direcionados aos folículos capilares. No entanto, as características ideais das NPs para atingir os FPs sob influência de uma corrente elétrica não estão perfeitamente estabelecidas. Diferentes estudos correlacionam o tamanho dos nanocarreadores com a profundidade de deposição de partículas nos FPs, o que pode ser usado para modular a profundidade de penetração de fármacos em diferentes porções dessas estruturas. Por exemplo, NPs capazes de atingir glândulas sebáceas seriam adequados para tratar condições como acne (TOLENTINO et al., 2021) e hidradenite supurativa (PEREIRA et al., 2021), enquanto NPs capazes de atingir porções mais profundas dos FPs, como o a região do bulbo seriam adequadas para tratar alopecia (OLIVEIRA et al., 2022; USHIROBIRA et al., 2020). A ION aumenta o transporte de fármacos por três mecanismos: (i) causando a reorganização lipídica do estrato córneo, que forma poros transitórios, aumentando a permeação passiva de pequenas moléculas com características físico-químicas adequadas (CURDY et al., 2002; KALIA et al., 1996); (ii) eletromigração (EM), que se refere ao movimento ordenado de moléculas e íons carregados na presença de uma corrente elétrica (ABLA et al., 2005; GELFUSO et al., 2008; GRATIERI; KALIA, 2013); e (iii) eletroosmose (EO), que corresponde ao fluxo de solvente resultante de um potencial elétrico através de uma membrana ionizada, transportando consigo moléculas neutras, independentemente do seu tamanho (CÁZARES-DELGADILLO ET AL., 2007; DUBEY; KALIA, 2010; GRATIERI; KALIA, 2013; KALIA et al., 2004). Se imaginarmos que as NPs sejam comparáveis a proteínas enormes, NPs de 100 nm poderiam ser aproximadamente comparadas a proteínas de 1000 kDa (ERICKSON, 2009). Desta forma, poderia se esperar que a EO tivesse uma influência fundamental na administração iontoforética, em vez do EM. Os resultados da literatura que aplicam a ION para entrega de NPs têm sido controversos até agora. Além disso, pouca atenção tem sido dada ao acúmulo de nanocarreadores nos FPs. Como essas estruturas podem ser o principal alvo para a combinação de tais estratégias, neste estudo pretendemos avaliar como a ION afeta a deposição de NPs de gelatina com diferentes tamanhos e cargas opostas nos FPs.

4.1.2. Material e Métodos

4.1.2.1. Materiais

Gelatina tipo A bloom 80 – 120g de pele suína, gelatina tipo B bloom 75g de pele bovina, Kolliphor[®] P 188 (Poloxamer 188), glutaraldeído 25%, cloreto de prata 99,99%, fio de prata

1mm, fio de platina 0,5 mm e a tripsina de pâncreas suíno foi obtida da Sigma-Aldrich (Steinheim, Alemanha). A mistura pronta para PBS e a acetona foram adquiridas da Fisher Scientific (Göteborg - Suécia). O TRITC-dextran (150 kDa) foi adquirido da TdB Labs (Uppsala, Suécia). O VIVAFLOW 50R 100.000 MWCO Hydrosart foi adquirido da Sartorius AG (Goettingen, Alemanha). O citrato de tofacitinibe foi comprado da LC Laboratories (Massachusetts, Estados Unidos). Água Milli-Q com resistividade de $18,2 \text{ M } \Omega\text{cm}^{-1}$ foi utilizada ao longo dos experimentos. As orelhas suínas foram obtidas de um abatedouro local (Färber&Co, Zweibrücken, Alemanha), as peles foram manualmente retiradas, limpas e armazenadas a -20°C por até um mês antes do uso.

4.1.2.2. *Preparação de nanopartículas de gelatina*

NPs de gelatina foram preparadas pelo método de nanoprecipitação (KHAN; SCHNEIDER, 2013), com adaptações (Figura 8). Resumidamente, para partículas menores, 15 mg de gelatina A ou 20 mg de gelatina B foram dissolvidas em 1 mL de água Mili-Q a 50°C sob agitação. Em seguida, a solução de gelatina foi adicionada a 15 mL de acetona contendo 2,8% (p/v) de Kolliphor[®] P 188 e 6,25% de água, com agitação de 1000 RPM e a um fluxo de 0,25 mL/min. Após a nanoprecipitação, 0,50 mL de uma solução de glutaraldeído a 2% (p/v) em acetona foi lentamente adicionada às NPs para *crosslinking*. O sistema foi agitado durante 3 h para permitir a formação de ligações cruzadas nas partículas. Após esse tempo, as NPs com gelatina A foram diluídas com água Mili-Q até 300 mL e armazenadas a 4°C até o dia seguinte, quando foram purificadas por filtração de fluxo tangencial por 5 h, enquanto as NPs obtidas com gelatina B foram purificadas por três ciclos de centrifugação a $10.000 \times g$ por 10 min (Heraeus Multifuge X1R, Thermo Scientific). Após cada ciclo, o sobrenadante foi descartado e o pellet foi redisperso em água Mili-Q com auxílio de vórtex e/ou banho ultrassônico por 10 minutos à 25°C , quando necessário. As NPs de gelatina foram armazenadas em água Mili-Q a 4°C para medições e/ou utilização no terceiro dia após a nanoprecipitação.

Para obter NPs maiores, 40 mg de gelatina A ou B foram dissolvidas em 1mL de água a 50°C sob agitação. Além disso, a nanoprecipitação e o processo de *crosslinking* foram realizados no mesmo fluxo de injeção, mas com a metade da velocidade de agitação, 500 RPM. A purificação foi por filtração de fluxo tangencial para NPs obtidas com gelatina tipo A ou centrifugação para NPs obtidas com gelatina tipo B.

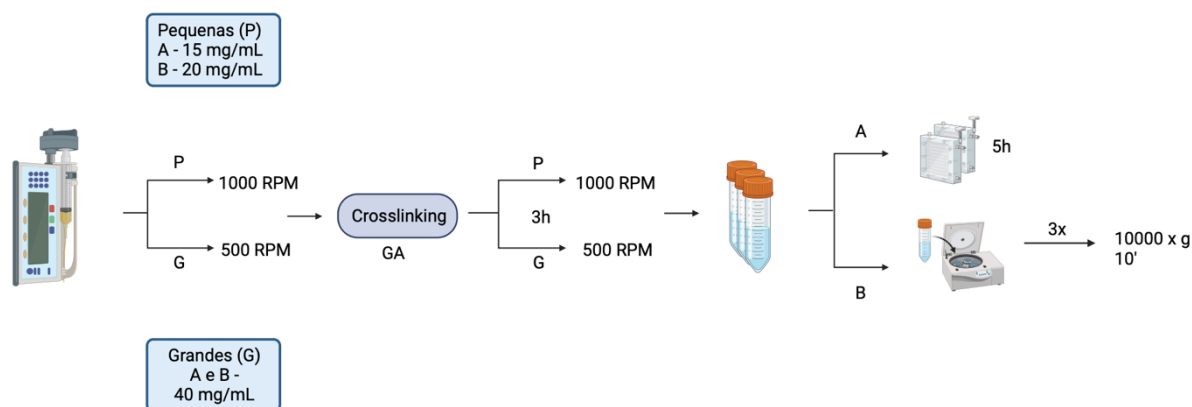


Figura 8 - Esquema representativo do método de obtenção das NPs. GA: glutaraldeído.

Para NPs carregadas com TRITC-dextrano 150 kDa, um corante fluorescente neutro, as gelatinas A e B foram dissolvidas apenas em 0,8 mL de água, antes da nanoprecipitação, foram adicionados 0,2 mL de solução aquosa do corante a 1,5% e foram seguidos os mesmos passos para obtenção das NPs de gelatina descritos acima.

4.1.2.3. Caracterização de nanopartículas de gelatina

4.1.2.3.1. Tamanho hidrodinâmico e potencial zeta

O tamanho hidrodinâmico médio e o índice de polidispersividade (PdI) das NPs de gelatina foram medidos por espalhamento dinâmico de luz (DLS) com um Zetasizer Ultra (Malvern Instruments Ltd, Malvern, Worcestershire, Reino Unido) no modo de retroespalhamento. Já o potencial zeta (ζ -potencial) foi medido por microeletroforese à laser Doppler no modo de espalhamento direto. Para essas medições, 50 μ L de cada formulação foram suspensos em 950 μ L de água e agitados em vórtex por 30 s antes das análises. NPs com gelatina tipo A foram medidas em pH 5,2, enquanto NPs com gelatina tipo B foram medidas em pH 7,4.

4.1.2.3.2. Determinação do ponto isoelétrico

A determinação do ponto isoelétrico (pI) foi feita pelo titulador automático MPT-3 Autotitrator, acoplado ao Zetasizer Ultra (Malvern Instruments Ltd, Malvern, Worcestershire, Reino Unido). Soluções de HCl 0,5 M, NaOH 0,5 M e NaOH 0,05 M foram utilizadas como ácido forte, base forte e base fraca, respectivamente, para titulação das amostras.

4.1.2.3.3. Morfologia e propriedades mecânicas

A morfologia das NPs de gelatina foi avaliada por microscopia eletrônica de varredura (MEV) e microscopia de força atômica (AFM, do inglês: *atomic force microscopy*). Para o MEV, as NPs foram diluídas a 1:500 (v/v) em água Mili-Q. Uma gota da suspensão foi depositada sobre um *grid* de sílcio, montado sobre um suporte metálico com fita de carbono. As amostras foram colocadas em um dessecador durante a noite para evaporação do líquido. Antes das análises, as amostras foram revestidas com ouro (~ 10 nm) sob atmosfera de argônio usando o pulverizador Q150RES (Quorum Technologies Ltd., Laughton, Reino Unido). As imagens de MEV foram obtidas por um microscópio EVO HD15 (Carl Zeiss Microimaging, Jena, Alemanha).

Para o AFM, imagens do tamanho e das propriedades mecânicas foram obtidas com NanoWizard 3 AFM (JPK Instruments, Berlin, Germany) usando o cantiléver C MCLT piramidal quadrático (Bruker Nano Inc. (Wisssembourg, France). Todas as medidas foram realizadas à 37°C em líquido, seguindo protocolo previamente estabelecido (WEISS et al., 2022), com adaptações. A força de indentação foi definida como 1 nN, a velocidade de aquisição foi de 35 µm/s, o tamanho da imagem foi de 5x5 µm com um número de pixels de 128x128. A única adaptação foi feita para partículas do tipo A, onde água acidificada (pH 4,5) foi usada para ter cargas superficiais positivas para fixação eletrostática na superfície de sílica carregada negativamente. Ajuste de plano e nivelamento de linha foram aplicados às imagens de altura. Além disso, contraste e brilho foram otimizados. Os *módulos de Young* foram determinados em 30 NPs por lote, com média de 4 curvas de força-distância por partícula. O processamento de cada curva foi iniciado aplicando os dados de calibração seguidos de suavização de dados, subtração de linha de base e detecção de ponto de contato. Para corrigir a curvatura do cantiléver, a posição da ponta vertical foi corrigida. Posteriormente, o modelo Hertz, corrigido para pontas piramidais quadráticas, foi ajustado às curvas de força-distância para obter os respectivos *módulos de Young*.

4.1.2.3.4. Eficiência de encapsulação e carregamento do fármaco

Para determinação da eficiência de encapsulação (EE%, p/p) e o carregamento do fármaco (CF%, p/p), 5 mg de NPs liofilizadas foram dispersas em 5 mL de PBS pH 7,4 à temperatura ambiente. Em seguida, foi adicionada tripsina (0,5 mg/mg de polímero) para digerir as NPs de gelatina. Após 6 h de digestão, as amostras foram analisadas pela intensidade de fluorescência com um leitor de placas Tecan infinite M200 (Tecan Group Ltd., Männedorf,

Suíça). As intensidades de excitação e emissão de fluorescência foram registradas em 550 e 572 nm, respectivamente. Uma curva de calibração de TRITC-dextrano 150 kDa foi construída em PBS. NPs vazias foram usadas como controle. A EE% foi determinada utilizando a seguinte equação (Eq. 1):

$$EE\% = \frac{\text{Quantidade de fármaco calculado}}{\text{Quantidade teórica do fármaco}} \times 100 \quad \text{Equação 1}$$

Já o CF% foi calculada da seguinte forma (Eq. 2):

$$CF\% = \frac{\text{Quantidade de fármaco calculado}}{\text{Peso total das NPs secas}} \times 100 \quad \text{Equação 2}$$

4.1.2.4. Experimentos de iontoforese

4.1.2.4.1. Preparo de eletrodos

Para todos os experimentos de ION foram utilizados eletrodos reversíveis de prata (Ag) e cloreto de prata (AgCl). Eles foram preparados utilizando-se um fio de prata com uma alça em uma das pontas e de tamanho suficiente para caber nas células de Franz. Os eletrodos negativos (AgCl) foram obtidos pela imersão do fio de prata em AgCl, fundido em cadinho de porcelana, por pelo menos 3 vezes até a formação de um depósito de AgCl na alça (Figura 9A).

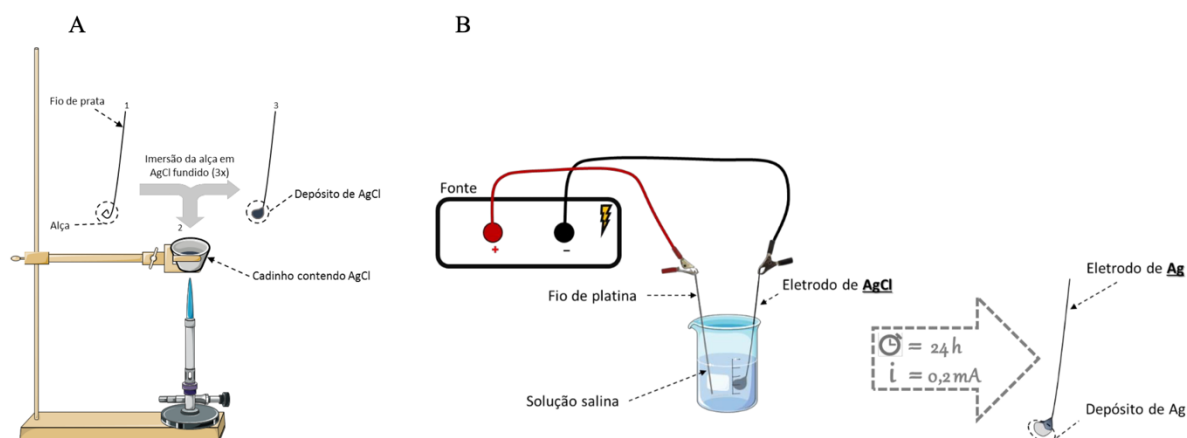


Figura 9 - A) produção dos eletrodos negativos. B) produção dos eletrodos positivos. Adaptado de de Sá, 2015.

Após o preparo dos eletrodos negativos, uma parte deles foi utilizada para obtenção dos eletrodos positivos, que requereu a montagem de um pequeno circuito elétrico. O eletrodo de AgCl foi posicionado no cátodo, enquanto um fio de platina foi posicionado no ânodo, ambos submersos em uma solução salina saturada. Com o auxílio de uma fonte de energia, uma

corrente elétrica de 0,25 mA foi aplicada ao sistema por pelo menos 24h, durante esse tempo, o AgCl foi reduzido à Ag, formando um depósito desse elemento no eletrodo, agora positivo (Figura 9B).

4.1.2.4.2. Pontes salinas

A aplicação da ION por períodos prolongados consome muitos eletrodos e torna o processo muito dispendioso, além disso, é possível haver competição entre NPs e outros íons que não são de interesse, então, são utilizadas “pontes salinas” (Fig. 10) para viabilizar a passagem de corrente do modo mais inerte possível.

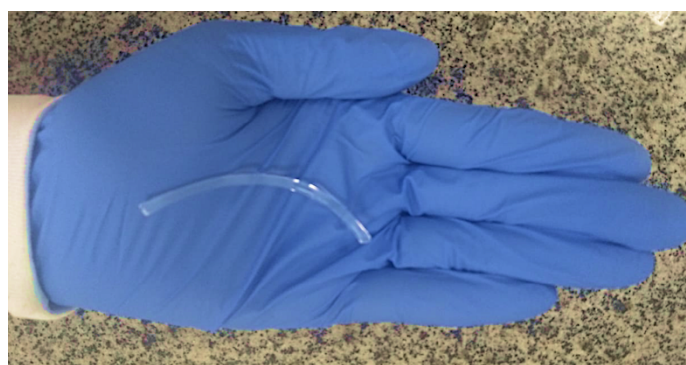


Figura 10 - Ponte salina. Reproduzido de Sá, 2015.

Em um béquer contendo solução salina 0,9% sob agitação e aquecimento à 80°C, foram adicionados 3% de agarose aos poucos e sob agitação constante. Após a completa dissolução da agarose, a solução foi transferida para uma cânula de silicone de 3 mm de diâmetro e aproximadamente 100 cm de comprimento com o auxílio de uma seringa de 20 mL, no interior da cânula, o conteúdo foi rapidamente solidificado e as pontas foram vedadas com Parafilm®. As pontes salinas foram guardadas na geladeira por, pelo menos, 12 horas até o seu uso.

Antes da aplicação da ION, as cânulas foram retiradas da refrigeração, dobradas em intervalos de 3 a 4 cm e transferidas para um béquer limpo contendo solução salina 0,9% estéril, também com auxílio de uma seringa de 20 mL contendo a mesma solução. As pontes permaneceram imersas e hidratadas dentro da salina até serem utilizadas.

4.1.2.4.3. Estabilidade das NPs na corrente elétrica

Para garantir que a liberação do corante não fosse acelerada pela aplicação da corrente elétrica, 2,0 mL de cada NP (2 mg/mL) foram colocados em triplicata em frascos de vidro aos quais uma corrente de 1 mA foi aplicada por 6h com o auxílio de pontes salinas. Após esse tempo, o conteúdo de cada frasco foi recuperado e transferido para tubos Eppendorf para

centrifugação a $10.000 \times g$ por 10 min. Então, uma alíquota de 200 μL de cada replicata foi transferida para uma placa de 96 poços para análise no leitor de microplacas, com os mesmos parâmetros do item 4.1.3.4.

4.1.2.4.4. *Experimentos de penetração iontoforética na pele*

A pele de orelha suína de espessura total foi montada em células de difusão de Franz modificadas (área de difusão = $2,1 \text{ cm}^2$), separando o compartimento doador do receptor. O compartimento doador foi preenchido com 1,5 mL da dispersão de cada NP (contendo 2 mg/mL de TRITC-dextrano 150 kDa), em pH 7,4 e 5,2 para NPs de gelatina tipo B e A, respectivamente, enquanto o compartimento receptor foi preenchido com 15 mL de PBS pH 7,4 e mantido sob agitação (400 RPM) por 6 horas em temperatura ambiente. Ao final, foi retirado 1 mL do compartimento receptor para quantificação de TRITC-dextrano 150 kDa.

Uma corrente de $0,5 \text{ mA/cm}^2$ foi aplicada com eletrodos reversíveis de Ag/AgCl colocados nos compartimentos dependendo da polaridade das NPs. Para NPs com carga positiva foi realizada ION anódica, ou seja, o eletrodo positivo (ânodo) foi colocado no compartimento doador, enquanto o eletrodo de retorno (cátodo) foi colocado no compartimento receptor. Para NPs carregadas negativamente, foram realizadas ION anódica e catódica. Uma solução de TRITC-dextrano 150 kDa (2 mg/mL) foi utilizada como controle positivo, enquanto tampão PBS foi usado como controle negativo. Para efeito de comparação, os testes de penetração passiva foram realizados nas mesmas condições. Todos as NPs e controles foram avaliados em sextuplicata.

4.1.2.4.5. *Microscopia Confocal de Varredura a Laser*

Após 6 horas de permeação a pele foi limpa suavemente com algodão umedecido com água ultrapura para remoção do excesso de NPs que não penetraram. As amostras de pele foram armazenadas a -80°C para posterior corte manual com bisturi. Cada réplica de pele ($n = 6$) gerou cerca de dez cortes, que foram colocados em lâminas de vidro e analisados imediatamente por microscopia confocal (LSM 710 Zeiss, Jena, Alemanha). Lente objetiva EC- Neofluar $10\times/0,30 \text{ M27}$ e divisor de feixe MBS 458/561 foram utilizados para obtenção das imagens. O comprimento de onda de excitação foi de 561 nm e a faixa de detecção de emissão foi de 624–740 nm. A intensidade e o ganho dos lasers foram ajustados para cancelamento da autofluorescência da pele.

O valor da intensidade do sinal da molécula fluorescente (TRITC-dextrano) foi extraído de cada imagem gerada pelo CLSM usando o ZEN Black Edition 2012 versão 8.1. Para análises

posteriores, o software ImageJ foi usado para dividir cada imagem em duas partes. O estrato córneo foi usado como referência para a divisão, então a parte “superior” compreendeu do início da imagem até o topo da pele, enquanto a parte “inferior” foi do final da parte superior até o final da seleção mantendo a mesma área da primeira seleção. O valor “médio” do sinal de TRITC-dextrano obtido de cada análise foi usado para comparação estatística.

Previamente aos testes de penetração cutânea, as NPs também foram verificadas por microscopia confocal com esses mesmos parâmetros para garantir que era possível visualizá-las. Para isso, uma gota de cada dispersão foi diretamente posicionada em uma lâmina de vidro e levada ao microscópio.

4.1.2.5. Encapsulação do Tofacitinibe

A encapsulação do citrato de tofacitinibe foi feita por atração eletrostática, adicionando-se 1 mL de solução do fármaco a 100 µg/mL ou 500 µg/mL em acetona a 1 mL de NPs A ou B prontas, sob agitação constante à 400 RPM por 2h, após esse período, as amostras foram transferidas para tubos Eppendorf e centrifugadas 20.000 $\times$ g por 10 min. Uma alíquota de 1 mL foi retirada para a quantificação do fármaco por HPLC.

4.1.2.6. Quantificação de Tofacitinibe por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

A quantificação do citrato de tofacitinibe foi realizada cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) seguindo uma metodologia previamente estabelecida e validada (CHRISTMANN et al., 2020) em um sistema Dionex UltiMate 3000 da Thermo Fischer Scientific (Dreieich, Germany), constituído por uma bomba LPG-3400SD, autoinjeter de amostras WPS-3000, forno de coluna TCC-3000 e detector de arranjo de fotodiodo DAD3000. O volume de injeção das amostras foi de 10 µL, com método isocrático de metanol:tampão acetato de amônio 10 mM pH 5,0 (45:55) a um fluxo de 200 µL/min, utilizando-se uma coluna C18 Synchronis (150 mm $\times$ 2,1 mm, 3 µm, Thermo Fischer) à 35°C. O tofacitinibe foi detectado à 287 nm e 6,1 min. O método foi linear entre uma concentração de 0,1 a 500 µg/mL ($r^2 = 1$).

4.1.2.7. Análises Estatísticas

A intensidade do sinal de TRITC-dextrano 150 kDa foi avaliada por ANOVA com teste *post hoc* de Tukey para comparação quantitativa entre amostras no GraphPad Prism® 9 (GraphPad Software, Inc). Os dados de AFM foram testados para significância usando OriginPro, Versão 2024 (OriginLab Corporation, Northampton, MA, EUA) por ANOVA com

teste *post hoc* de Tukey. O nível de significância foi definido como 0,05. Todos os dados são expressos como média $\pm$ desvio padrão (DP) das réplicas.

4.1.3. Resultados e Discussão

4.1.3.1. Caracterização das NPs de gelatina

Aqui, foram produzidas quatro NPs, as formulações de NPs puras apresentaram aparência esbranquiçada, enquanto as partículas carregadas com o corante apresentaram uma coloração rosada (Figura 11). Elas foram nomeadas segundo o tipo de gelatina e o tamanho, NPs de gelatina tipo A maiores e menores foram nomeadas “AG” e “AP”, respectivamente, as NPs de gelatina tipo B seguiram a mesma lógica e foram nomeadas de “BG” e “BP” para se referir às NPs maiores e menores, respectivamente.



Figura 11 - Aspecto visual das NPs em acetona. À esquerda NPs BP puras de aparência esbranquiçada; à direita NPs BP carregadas com TRITC-dextrano 150 kDa, de aparência rosada.

Inicialmente, foram produzidas NPs vazias com a adição de metabissulfito de sódio como agente de parada após 3h da reação de *crosslinking* e todas as NPs eram purificadas por centrifugação. No entanto, durante o processo de redispersão das NPs em água, apenas uma fração das NPs se desprendia do *pellet* (Figura 12), diminuindo o rendimento do processo e

resultando em grandes agregados, principalmente para as NPs AG, além disso, os potenciais zeta dessas NPs com gelatina tipo A encontravam-se próximos da neutralidade, o que não era de interesse para o estudo (Tabela 1). De fato, o ponto isoelétrico (pI) das NPs A era atingido no pH $5,49 \pm 0,62$, enquanto o pI das NPs B era atingido no pH $4,54 \pm 0,14$.

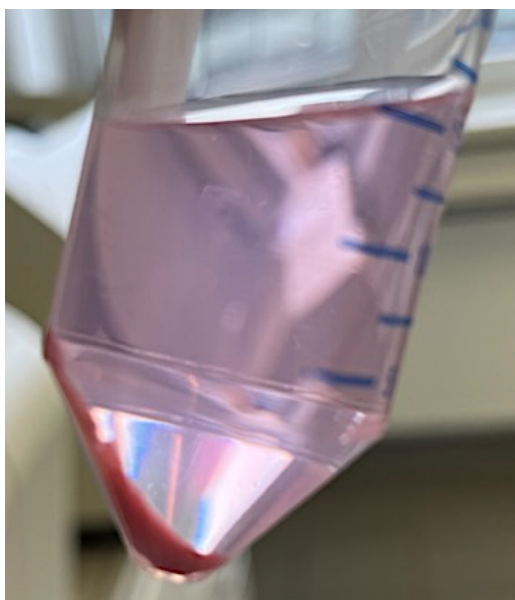


Figura 12 - Pellet de NPs formado após o primeiro ciclo de centrifugação de AG carregada com TRITC-dextrano 150 kDa. A coloração rosada do sobrenadante se deve ao corante não encapsulado.

Tabela 1. Características das NPs de gelatina puras produzidas com metabissulfito de sódio. NPs com gelatina tipo B foram medidas em pH 7,4, enquanto NPs com gelatina tipo A foram medidas em pH 5,2. * "G" e "P" referem-se a grande e pequeno, respectivamente.

NP *	Tamanho (nm)	PdI	ζ-potencial (mV)
AG	$849,6 \pm 207,1$	$0,65 \pm 0,23$	$0,75 \pm 0,4$
AP	$190,2 \pm 1,1$	$0,04 \pm 0,04$	$-0,79 \pm 0,4$
BG	$495,9 \pm 10,8$	$0,26 \pm 0,02$	$-7,03 \pm 1,0$
BP	$217,3 \pm 4,6$	$0,07 \pm 0,04$	$-11,4 \pm 1,2$

A remoção do metabissulfito de sódio melhorou tanto o processo de redispersão, quanto os potenciais zeta, que aumentaram em módulo para todas as NPs, AP e AG aumentaram para $11,7 \pm 0,4$ e $15,7 \pm 1,0$ mV, respectivamente; e BP e BG aumentaram para $-32,3 \pm 0,9$ mV, aproximadamente. Além disso, o pI das NPs também foi deslocado para a direita (Figura 13).

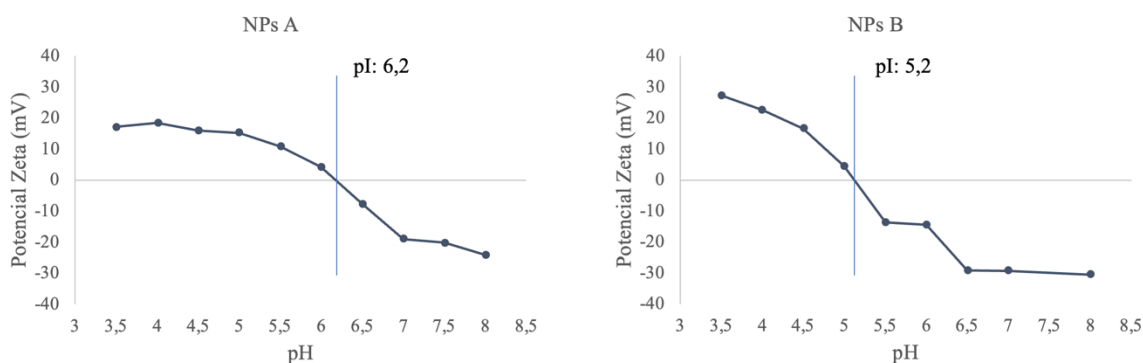


Figura 13 - Potencial zeta (mV) das NPs entre pH 3,5 e 8,0, com indicação do pI.

Após os ajustes na obtenção das NPs, foram obtidas quatro NPs carregadas com TRITC-dextrano 150 kDa com tamanhos estatisticamente diferentes entre si (Figura 14). Com a encapsulação do corante, houve um ligeiro aumento no tamanho das NPs, essa e outras características estão descritas na Tabela 2. A gelatina tipo A resultou em NPs maiores e menores com carga positiva, enquanto a gelatina tipo B resultou em NPs com carga negativa de tamanhos intermediários.

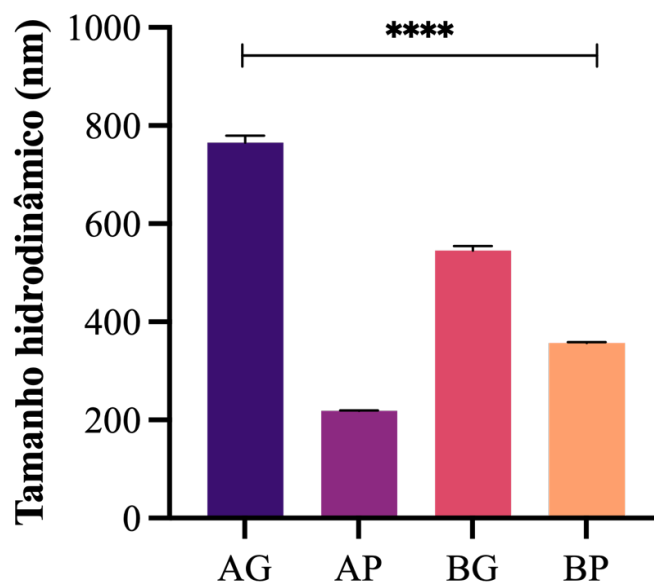


Figura 14 - Tamanho hidrodinâmico das NPs de gelatina carregadas com TRITC-dextrano 150 kDa. Os tamanhos das NPs mostraram diferença estatística entre si ($p < 0.0001$).

Entre as NPs, foi possível observar aumento no PDI com o incremento de tamanho, no entanto, todas as NPs apresentaram uma distribuição de tamanho estreita ($\sim 0,2$) (DANAEI et al., 2018), com AP apresentando o comportamento mais monodisperso. Os valores de potencial

zeta de NPs com carga negativa indicam uma tendência de maior estabilidade dessas NPs em comparação com as NPs com carga positiva, uma vez que valores de potencial zeta superiores a $|30|$ mV implicam em menor probabilidade de agregação durante o armazenamento (TURANLI; ACARTÜRK, 2022; WU et al., 2011; ZHONG; ZHANG, 2019). A EE% foi maior para as NPs menores, em consonância com estudos anteriores (KHAN; SCHNEIDER, 2013; WEISS et al., 2022).

Tabela 2. Características das NPs de gelatina carregadas com TRITC-dextrano 150 kDa. NPs com gelatina tipo B fora, medidas em pH 7,4, enquanto NPs com gelatina tipo A foram medidas em pH 5,2. * "G" e "P" referem-se a grande e pequeno, respectivamente.

NP *	Tamanho (nm)	PdI	ζ -potencial (mV)	EE (%)	CF (%)	Módulo de Young (MPa)
AG	$765,5 \pm 14,1$	$0,17 \pm 0,11$	$17,4 \pm 1,3$	$45,2 \pm 6,42$	$3,10 \pm 0,50$	$9,77 \pm 2,48$
AP	$219,1 \pm 8,3$	$0,04 \pm 0,01$	$8,10 \pm 0,3$	$65,2 \pm 8,35$	$11,20 \pm 1,70$	$12,05 \pm 2,47$
BG	$553,8 \pm 19,3$	$0,21 \pm 0,01$	$-30,4 \pm 0,6$	$47,9 \pm 10,6$	$3,40 \pm 0,70$	$17,71 \pm 2,65$
BP	$356,0 \pm 2,9$	$0,19 \pm 0,01$	$-33,0 \pm 1,5$	$58,2 \pm 11,6$	$7,40 \pm 1,60$	$14,17 \pm 2,23$

A gelatina tipo A resultou em NPs mais “macias”, refletidas nos valores menores do *módulo de Young* para essas partículas em comparação com as NPs de gelatina tipo B (Tabela 2). Entretanto, não houve uma tendência clara de que partículas menores resultem em elasticidade menor ou maior, uma vez que o comportamento é exatamente o oposto para partículas do tipo A e do tipo B.

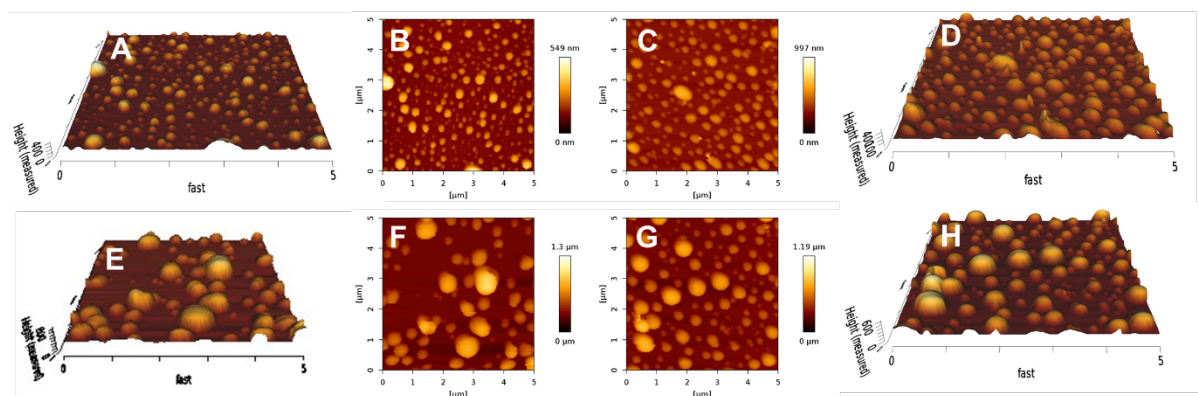


Figura 15 - Aspecto morfológico das NPs de gelatina carregadas com TRITC-dextrano 150 kDa por AFM.

A-B) AP em 3D e 2D, respectivamente; C-D) BP em 3D e 2D, respectivamente; E-F) AG em 3D e 2D, respectivamente; e G-H) BG em 3D e 2D, respectivamente.

As análises morfológicas (Figuras 15 e 16) mostram NPs de formato esférico, corroborando com os achados do DLS em termos de tamanho; ainda que o tamanho pareça ser ligeiramente menor que os resultados do DLS, algo que pode ser atribuído à desidratação das NPs durante a preparação da amostra para esse tipo de análise.

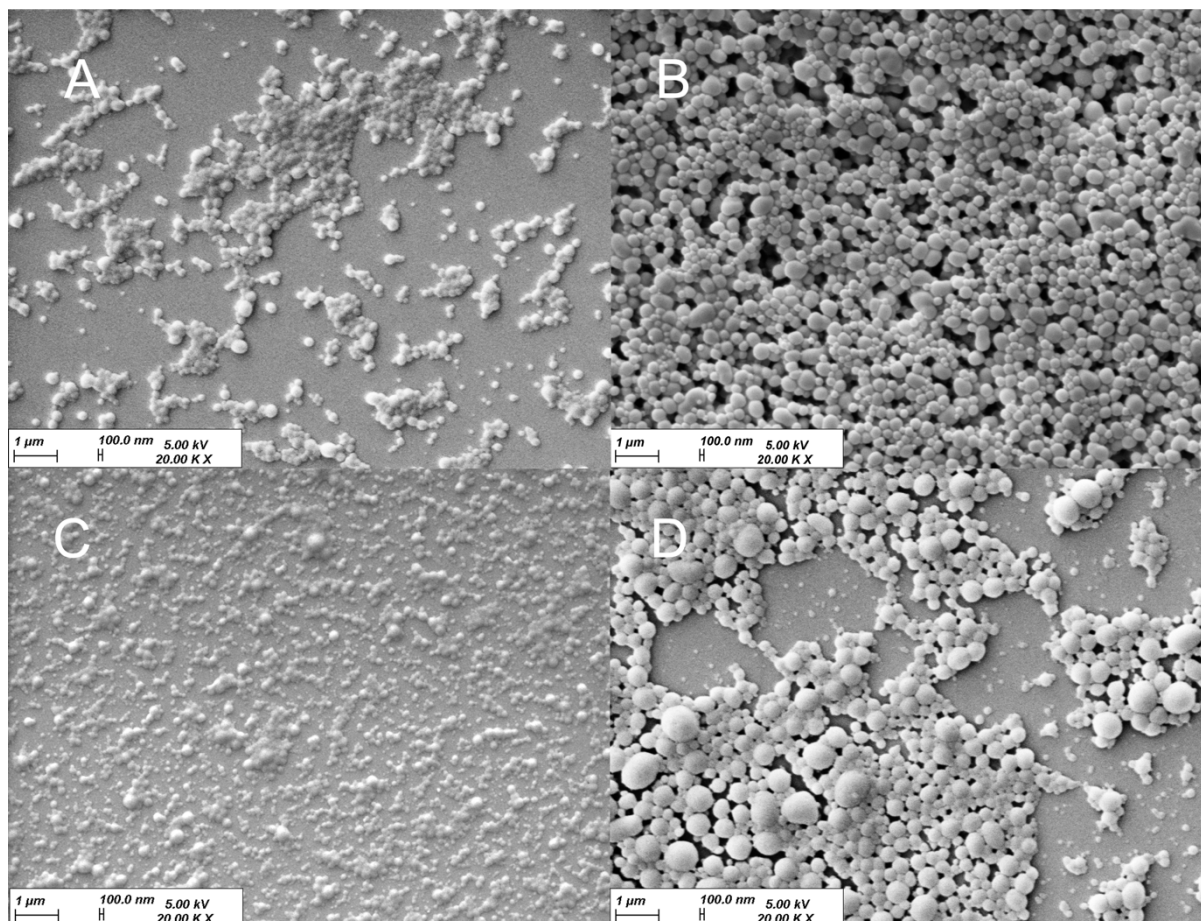


Figura 16 - Aspecto morfológico das NPs de gelatina carregadas com TRITC-dextrano 150 kDa por MEV.
A) AP, B) AG, C) BP e D) BG.

4.1.3.2. Experimentos de penetração cutânea com e sem iontoforese

Após 6h de aplicação de uma corrente de 1 mA em todas as NPs, nenhuma quantidade de TRITC-dextrano 150 kDa foi quantificada no sobrenadante, portanto, as NPs foram consideradas estáveis para os experimentos de penetração cutânea. Além disso, antes dos experimentos e da padronização da concentração, as NPs foram observadas por microscopia confocal nas mesmas condições das amostras de pele (Figura 17).

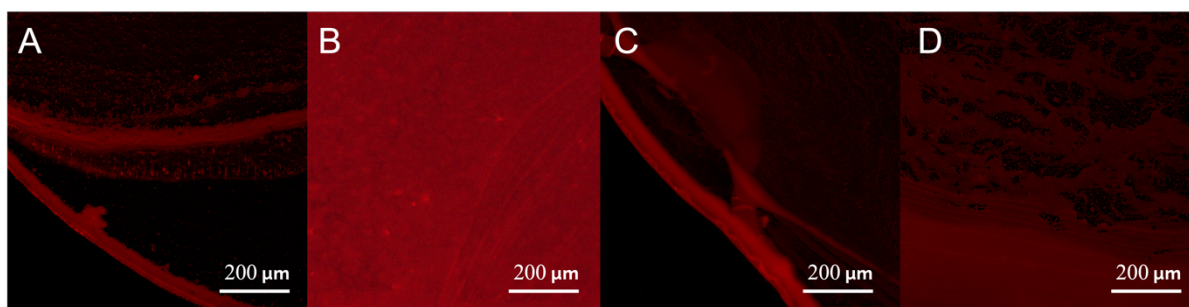


Figura 17 - Microscopia Confocal de Varredura à Laser das NPs em água. A) NPs AP; B) NPs AG; C) NPs BP e D) NPs BG. Objetiva: 10x.

A partir das imagens de microscopia confocal é possível visualizar a diferença entre transporte passivo e iontoforético. O sinal do TRITC-dextrano é visualmente mais pronunciado em amostras de ION para NPs e para o controle (Figuras 18, 19 e 21). Diferentes estudos com NPs de PLGA mostraram resultados semelhantes, com maior acúmulo dessas partículas, com tamanhos variando em torno de 50 a 200 nm, em FPs e no estrato córneo após o transporte iontoforético em comparação ao transporte passivo (TAKEUCHI et al., 2017; TOMODA et al., 2017; TOMODA et al., 2012a, 2012b, 2011).

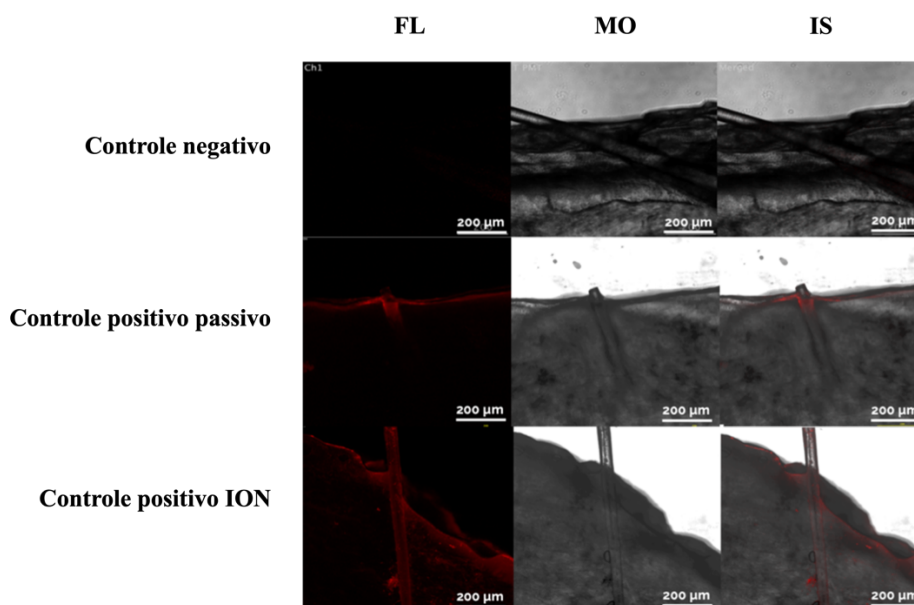


Figura 18 - Imagens de microscopia confocal de controles após testes de penetração cutânea *in vitro* com e sem iontoforese por 6h em células de Franz modificadas. Controle negativo: PBS pH 7,4, controle passivo positivo: solução de TRITC-dextrano 150 kDa 2 mg/mL e controle iontoforético positivo: solução TRITC-dextrano 150 kDa 2 mg/mL sob ION anódica de 0,5 mA/cm². FL: fluorescência; MO: microscopia óptica; IS: imagens sobrepostas.

Em relação às imagens dos controles (Figura 18), o transporte iontoforético aumentou visualmente a entrega do corante livre. Contudo, não foi explicitamente direcionado aos FPs, além disso, devido às diferenças de EE%, os controles eram ligeiramente mais concentrados que as NPs, especialmente em comparação com as NPs maiores, que tiveram a EE% menor. Por outro lado, o transporte passivo de NPs mostra uma tendência de acumulação em FPs para todos os tipos de NPs, exceto AP, a menor com 220 nm, que se acumulou principalmente no estrato córneo. Isso também se repetiu após transporte iontoforético, onde as imagens de AP mostram maior sinal do corante, mas, principalmente, na parte superior da pele.

Por outro lado, nas imagens das amostras de AG (760 nm), as NPs podem ser observadas não apenas na abertura do FP, como também em porções mais profundas (Figura 19), marcadamente na amostra iontoforética, o que pode ser atribuído ao tamanho maior e a combinação dos componentes EM e EO indo na mesma direção, do ânodo para o cátodo. Esses resultados corroboram um estudo clássico nesta área, no qual NPs de PLGA e de sílica variando de aproximadamente 100 nm a cerca de 850 nm foram aplicados em pele de orelhas suínas por 30 minutos após uma massagem de 3 minutos, e os resultados mostram que NPs em torno de 650 nm poderiam atingir distâncias mais profundas nos FPs, enquanto NPs em torno de 200 nm e partículas submicrométricas (850 nm) acumularam-se nas partes superiores das estruturas (PATZELT et al., 2011). Um estudo anterior também mostrou um acúmulo de NPs de PLGA carregados com cumarina-6 na epiderme, e não na derme de pele humana abdominal em estudos de penetração *in vitro*; neste caso, o tamanho das NPs variou entre 160 e 280 nm e foi associado ao microagulhamento (ZHANG et al., 2010). Outro estudo recente mostrou que um gel de emulsão *Pickering* estabilizado com nanocristais de celulose com tamanhos de gotículas de 679 nm, carregado com cumarina-6, atingiu com sucesso os folículos pilosos após a aplicação da formulação na pele do dorso de camundongos *Kunming* machos por 2h durante experimentos *in vivo* (PANG et al., 2024). Outro experimento mostrou que NPs de ácido hialurônico de 400 nm eram mais eficientes na entrega de clindamicina aos FPs do que NPs de quitosana ligeiramente menores em torno de 360 nm, embora neste caso, a escolha do polímero possa desempenhar um papel na eficiência da entrega do medicamento (TOLENTINO et al., 2021).

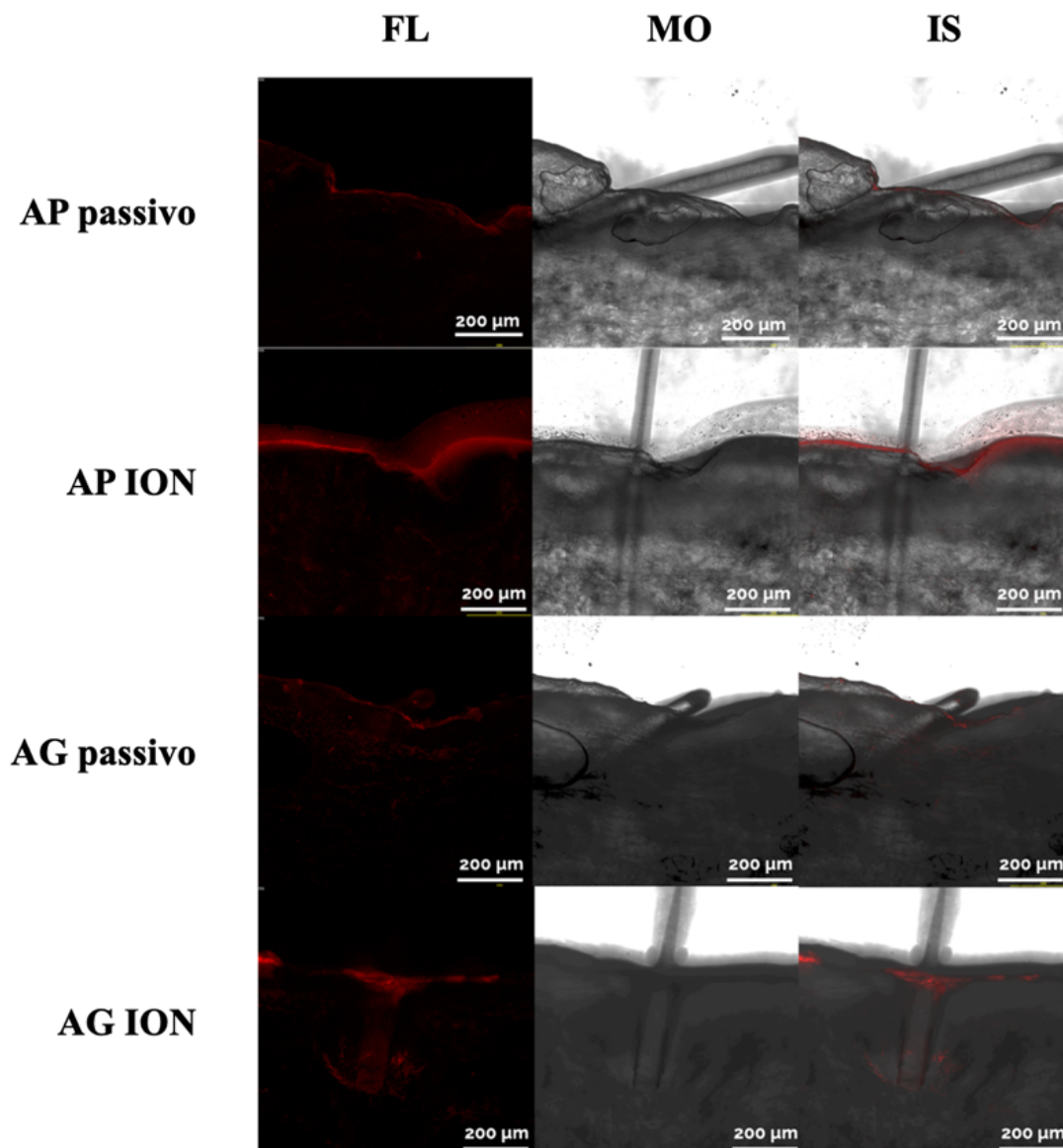


Figura 19 - Imagens confocal de amostras do FPs após testes de penetração cutânea *in vitro* de NPs com gelatina tipo A com e sem iontoforese por 6h em células de Franz. Barra de escala: 200 µm. ION: iontoforese; FL: fluorescência; MO: microscopia óptica; IS: imagens sobrepostas.

Quanto à entrega iontoforética de NPs com carga negativa, um ponto deve ser destacado. No pH fisiológico, a pele fica carregada negativamente, e o fluxo de EO criado vai do ânodo para o cátodo, que está na direção oposta da EM das moléculas negativas colocadas no cátodo (Figura 20) (ANDRADE et al., 2023; GRATIERI; KALIA, 2021). Como o impacto do EO era desconhecido, a ION para NPs do tipo B foi realizada tanto no ânodo quanto no cátodo.

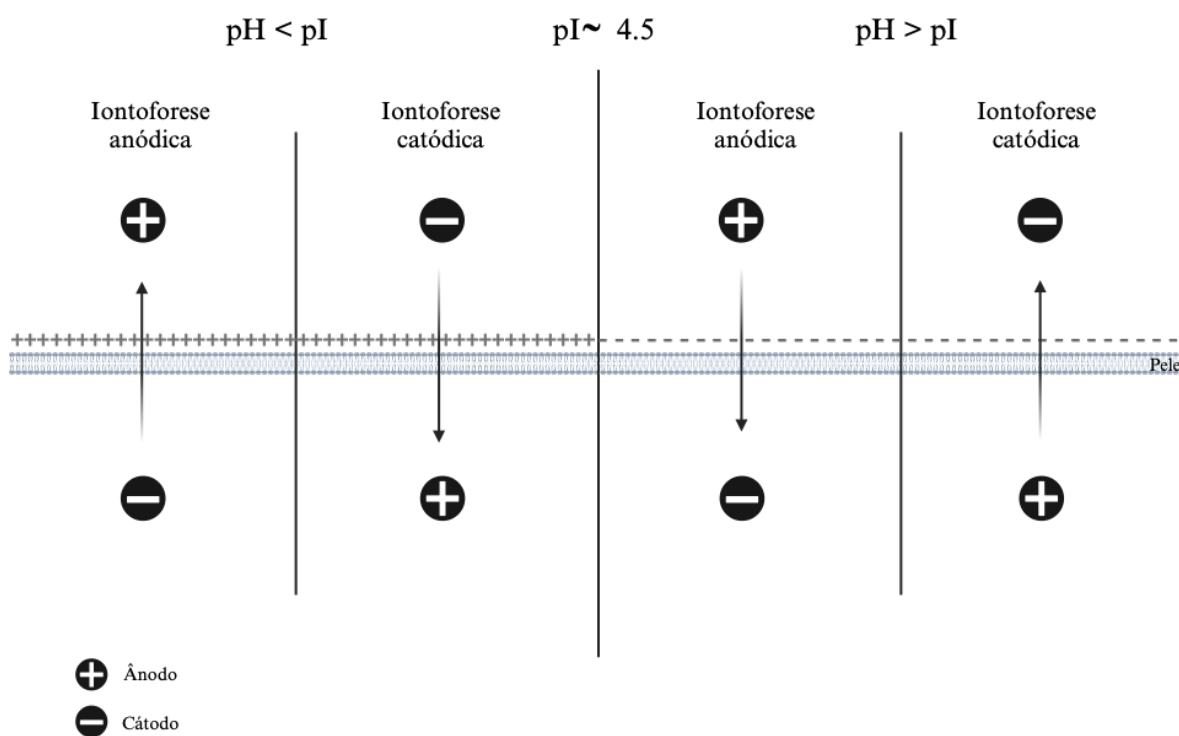


Figura 20 - Direção do fluxo eletroosmótico em diferentes condições. As setas apontam a direção do fluxo. Adaptado de Andrade et. al., 2023.

As imagens de microscopia confocal mostraram que a entrega de BP por ION anódica é visualmente comparável à entrega passiva, enquanto a imagem iontoforética catódica de BP mostrou um acúmulo pronunciado de NPs nos FPs (Figura 21). Neste caso, para a entrega iontoforética de BP, pode-se concluir que o componente EM foi responsável pelo aumento do acúmulo de NPs nessas estruturas (ou seja, na entrega catódica), já que a EO foi o único componente participante na entrega anódica. Os resultados também seguem descobertas anteriores de que NPs entre 300 e 400 nm, como é o caso da BP com 360 nm, se acumulariam principalmente na região da protuberância de células-tronco dos FPs (LADEMANN et al., 2015; PATZELT et al., 2011). No entanto, a entrega de BG, as maiores NPs carregadas negativamente, não pôde ser diferenciada visualmente, embora BG tivesse um tamanho adequado de 550 nm para o direcionamento de FPs.

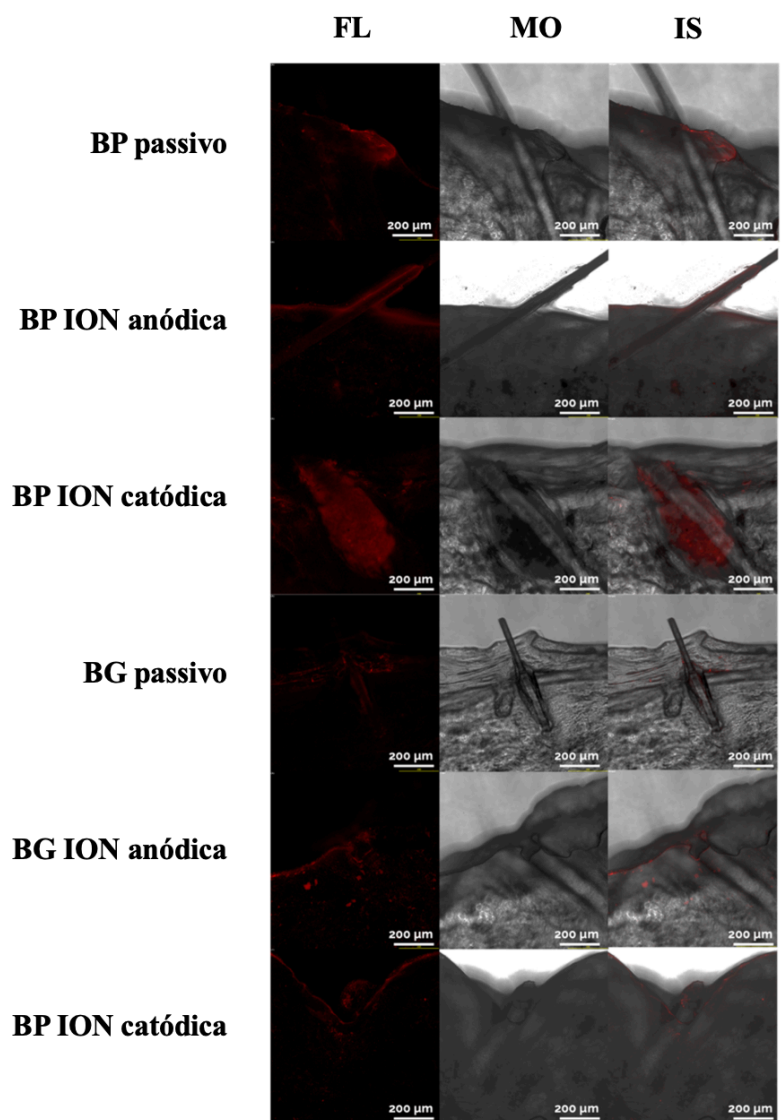


Figura 21 - Imagens confocal de amostras dos FPs após testes de penetração cutânea *in vitro* de NPs com gelatina tipo B com e sem iontoforese por 6h em células de Franz. Barra de escala: 200 μm . ION: iontoforese; FL: fluorescência; MO: microscopia óptica; IS: imagens sobrepostas.

4.1.3.3. Intensidade do sinal de microscopia confocal de varredura a laser

Para corroborar os achados das micrografias, a intensidade do sinal TRITC-dextrano de todas as amostras da imagem inteira foi extraída e analisada estatisticamente (Figura 22). Os controles tiveram um sinal fluorescente alto, próximo aos de AG e BP. No entanto, vale a pena mencionar novamente que devido a EE% das NPs, a concentração de TRITC-dextrano nos controles foi ligeiramente maior do que nas NPs, especialmente para NPs maiores, que tiveram EE% menor.

Considerando a distribuição nas amostras dos controles (Figura 18), é óbvio que a fluorescência da macromolécula é da superfície e não dos FPs; portanto, nenhum

direcionamento especificamente pronunciado para essas estruturas pode ser concluído. A deposição de AG nos FPs gerou um sinal mais alto após a penetração passiva ($p < 0,05$) em comparação com todas as outras NPs, embora AG tenha a menor EE% (aproximadamente 45%). O mesmo ocorreu com o sinal de AG após a ION, que também foi estatisticamente superior ($p < 0,05$) às outras NPs, exceto quando comparado com BP após iontoforese catódica.

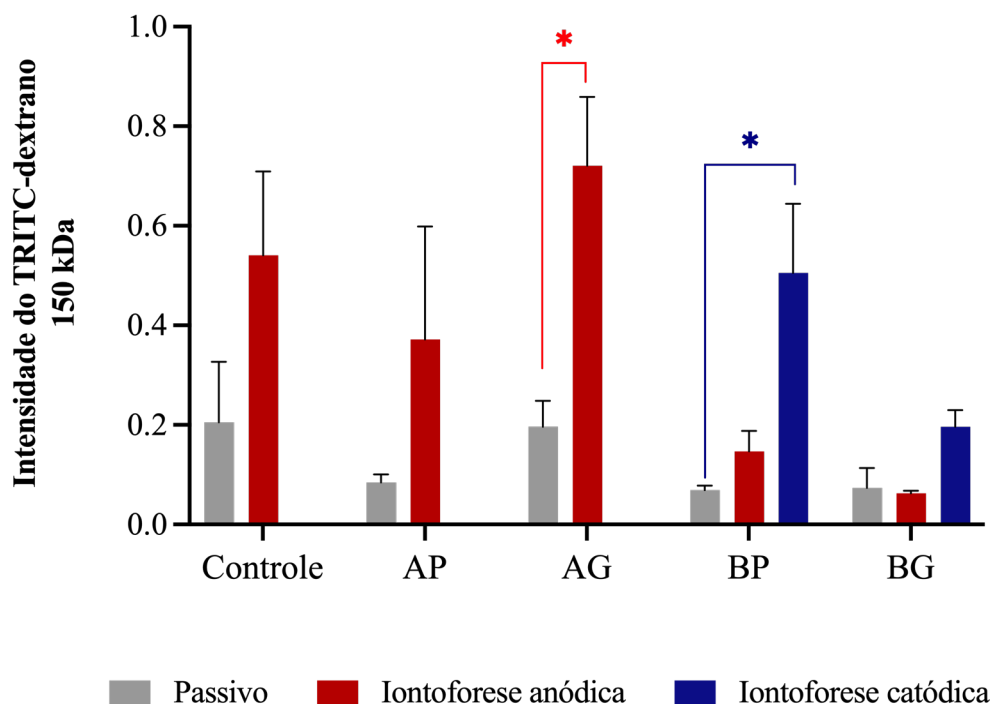


Figura 22 - Intensidade de sinal do TRITC-dextrano 150 kDa extraído das imagens de microscopia confocal de varredura à laser. * $p < 0.05$.

Embora o sinal iontoforético de AP tenha sido o segundo maior das NPs, conforme mencionado e visualizado acima e como foi observado nos controles (Figuras 18 e 22), as NPs acumularam-se principalmente na parte superior da pele e não penetraram nos FPs, o que pode ser uma explicação para a maior variabilidade de sinais entre as amostras.

Embora as imagens de BP tenham mostrado um excelente acúmulo no FP após a ION catódica, é possível concluir pela intensidade do sinal do corante e pelas imagens confocal (Figura 21) que BP sofreu até certo ponto o impacto do fluxo eletrosmótico durante a ION anódica. Porém, o componente EM foi suficiente para entregar uma quantidade significativa de NPs aos FPs, confirmando o que foi observado nas imagens confocal relatadas anteriormente. No entanto, as amostras de BG não apresentaram melhora visível comparando o transporte passivo e o iontoforético. Os resultados indicam que o BG, maior que o BP, foi ainda mais impactado pelo contrafluxo da EO da ION anódica. Conforme discutido anteriormente, a EO afeta principalmente partículas maiores (GRATIERI et al., 2021), o que

explica por que o transporte iontoforético anódico resultou em uma entrega de NP pior em comparação ao transporte passivo e porque o transporte iontoforético catódico não foi capaz de atingir os mesmos níveis das NPs tipo A e NPs menores do tipo B.

Para entender melhor o comportamento de deposição de NPs e o efeito da iontoforese, as imagens de microscopia confocal foram seccionadas em partes “superior” e “inferior” (Figura 23). Esta análise confirmou que o AP se acumulou principalmente na parte superior da pele durante a entrega passiva (Figura 23A), estatisticamente superior a todos os NPs ($p < 0,05$). Para as áreas mais profundas da pele, o AP também gerou o maior sinal de TRITC-dextrano, embora não tenha havido diferença estatística entre as NPs. Todas as partículas tiveram desempenho semelhante na parte “inferior”.

Para o transporte iontoforético, AG teve um sinal estatisticamente superior a todos as NPs e controle ($p < 0,05$), confirmando a capacidade de acumular nas áreas mais profundas dos FPs (Figura 23B). Demonstrando que NPs de gelatina carregadas positivamente e de tamanhos maiores se acumulam em maior extensão nos FPs do que NPs menores. No entanto, para NPs de gelatina carregadas negativamente, a tendência é o oposto. Também é possível ver a diferença entre o transporte iontoforético anódico e catódico para NPs menores com carga negativa. BP após iontoforese catódica (BP-C), que teve o segundo maior sinal de fluorescência quando toda a imagem foi avaliada, mostrou um sinal estatisticamente superior apenas ao de BG, após iontoforese catódica ou anódica, quando as partes inferiores das imagens foram analisadas, mas também mostrou um sinal mais alto em comparação à BP-A ($p > 0,05$), o que destaca a contribuição do EM para a entrega dessas NPs para porções mais profundas nos FPs. O efeito de EO pode ser visto na iontoforese anódica do BP, que resultou no maior acúmulo na parte superior da pele, superior a todas as NPs de gelatina ($p < 0,05$), exceto AP. Para NPs maiores com carga negativa, ou seja, BG, não houve diferença entre a iontoforese anódica e catódica ($p > 0,05$).

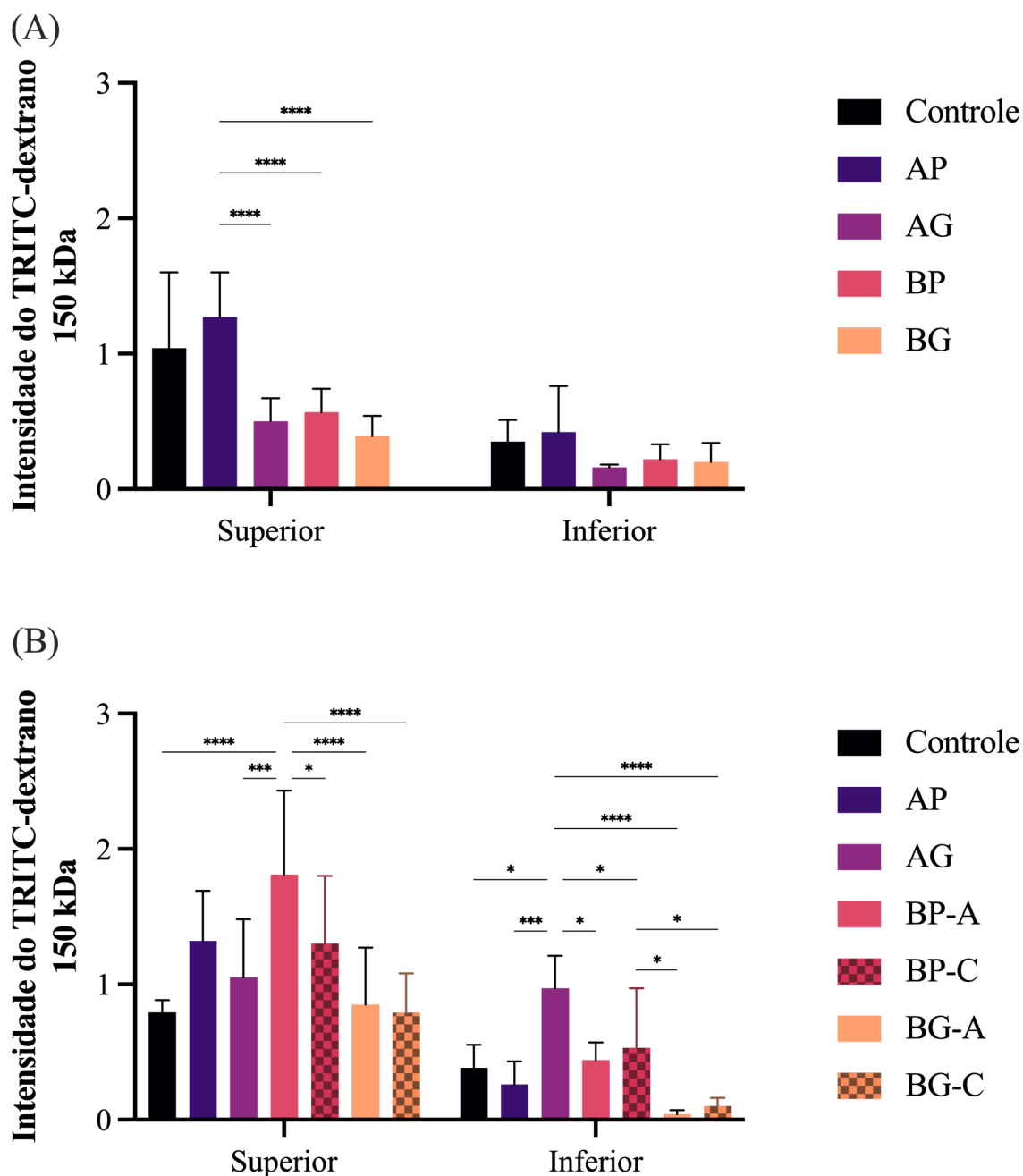


Figura 23 - Intensidade de fluorescência de TRITC-dextrano 150 kDa de amostras seccionadas nas partes superior e inferior extraídas de micrografias de microscopia eletrônica de varredura à laser. (A) transporte passivo; (B) transporte iontoforético. “A” e “C” referem-se à iontoforese “anódica” e “catódica”, respectivamente. Comparações insignificantes ($p > 0,05$) não foram mostradas no gráfico de “iontoforese”. Controle: solução de TRITC-dextrano 150 kDa (2 mg/mL). * $p < 0,05$, **** $p < 0,0001$.

Desta forma, parece plausível esperar que NPs maiores (de aproximadamente 500 a 800 nm) atinjam passivamente os FPs. No entanto, quando se trata de combinar a aplicação da ION, as NPs carregadas positivamente são evidentemente mais propensas a níveis de acumulação

mais elevados, uma vez que se beneficiam dos dois principais mecanismos de transporte iontoforético: EO e EM. Em contraste, para as NPs carregadas negativamente, não é possível determinar previamente se EM ou EO será o componente de entrega dominante. Nesses casos, experimentos de permeação e avaliações direcionadas aos FPs são essenciais para a triagem de formulações.

4.1.3.4. Encapsulação de Tofacitinibe

Após definir as melhores partículas para o direcionamento tópico de fármacos aos FPs, i.e., AG e BP, foram realizadas tentativas de se encapsular o tofacitinibe nesses sistemas. O tofacitinibe é um inibidor de *Janus* quinase, que tem se mostrado efetivo no tratamento da alopecia areata, no entanto quando administrado oralmente, seus benefícios se contrapõem aos seus diversos efeitos adversos como diarreias, foliculite, aumento do ácido úrico, danos leves ao fígado, dentre outros (BEHRANGI et al., 2022; FERREIRA; FERREIRA; SCHEINBERG, 2020; HUANG et al., 2023; KENNEDY CRISPIN et al., 2016; LIU et al., 2017). Portanto, um sistema de liberação tópica seria de grande interesse para reduzir esses efeitos adversos e melhorar a efetividade do tratamento dessa condição.

Uma curva de calibração foi construída para quantificação do tofacitinibe. A curva analítica nas concentrações de 0,1 a 500,0 µg/mL em metanol está representada na Figura 24. O coeficiente de correlação $r = 1$ mostra a linearidade do método na faixa de concentração estudada.

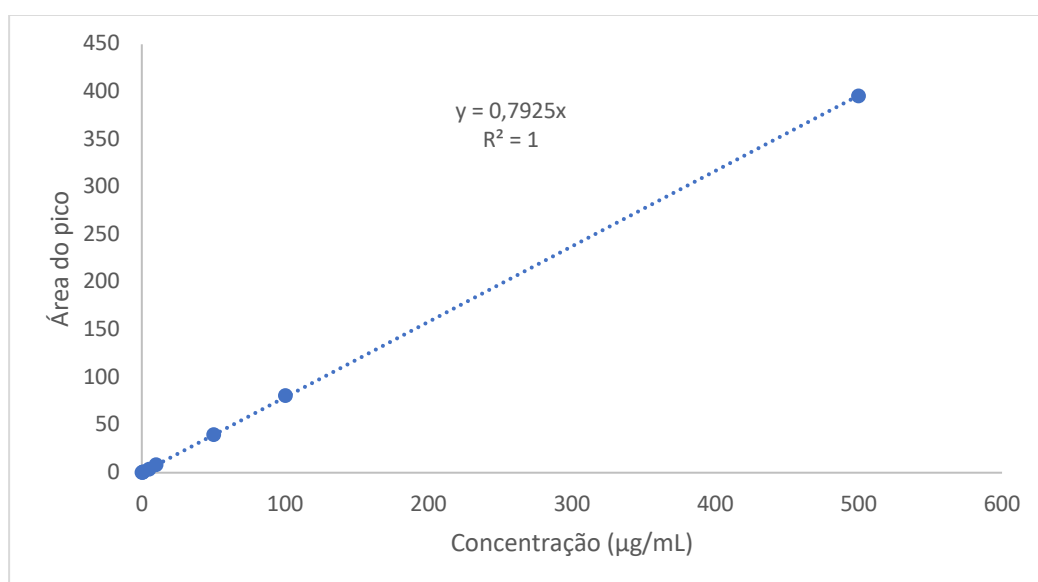


Figura 24 - Representação gráfica da curva analítica do Tofacitinibe na faixa de concentração de 0,1 a 500,0 µg/mL em acetona; $n = 3$. Equação da reta: $y = 0,7925x$; coeficiente de correlação linear: $r = 1$.

No entanto, as características físico-químicas do tofacitinibe ($\log P$ 1,58) não são compatíveis com as NPs de gelatina. Após a adição do fármaco nas NPs prontas, houve uma separação de fases (Figura 25). Além disso, a quantidade de medicamento no sobrenadante também foi quantificada e os resultados mostraram que, de fato, o tofacitinibe não foi encapsulado em nenhum dos sistemas.

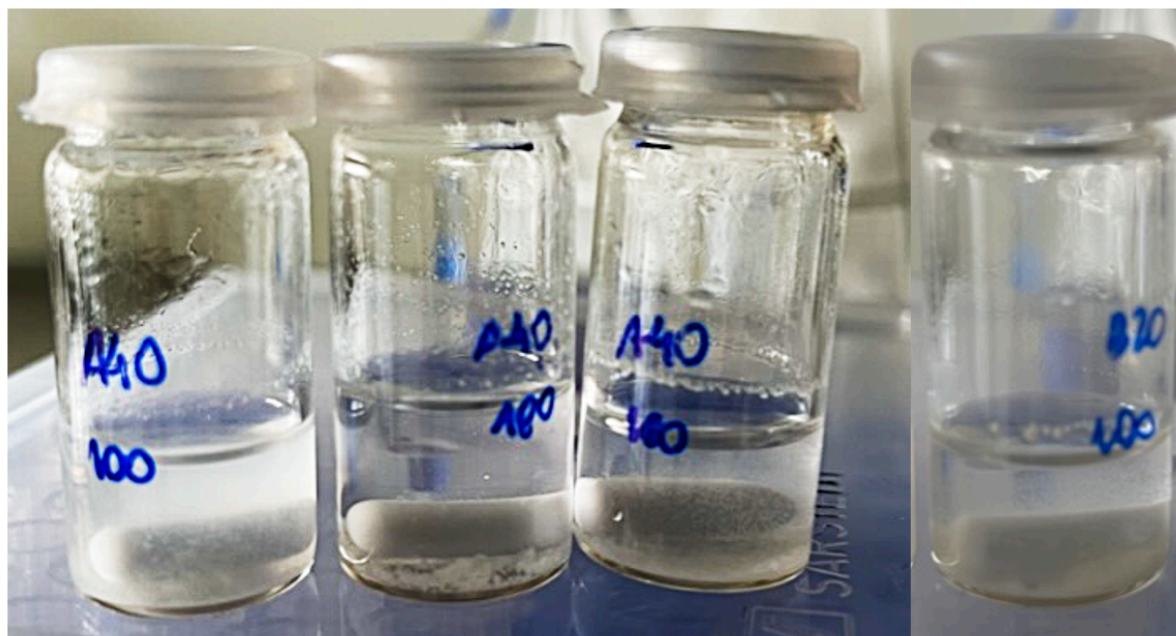


Figure 25 - NPs precipitadas após a adição de Tofacitinibe.

4.1.4. Conclusões

Em conclusão, as NPs positivas e maiores (AG) resultaram em maior sinal TRITC-dextrano após transporte passivo e iontoforético. A ION aumentou significativamente o transporte das NPs de gelatina, notadamente a entrega de NPs maiores com carga positiva e de NPs de tamanho intermediário com carga negativa (BP), ampliando as aplicações dessas NPs e trazendo novas oportunidades de tratamento para diversas doenças que comprometem os FPs.

A escolha inicial pelo tofacitinibe se deu pelo grande interesse nessa classe de medicamentos para o tratamento da alopecia areata, com resultados promissores em estudos clínicos com a administração da sua forma oral, mas com a lacuna de sistemas de liberação mais apropriados para melhorar a permeação do fármaco e direcioná-lo para os FPs e que minimizassem os efeitos adversos. No entanto, os resultados iniciais insatisfatórios, o alto custo do fármaco e a baixa eficiência de encapsulação ($19,8\% \pm 3,6\%$) em um sistema de liberação desenvolvido pelo grupo em trabalhos anteriores (CHRISTMANN et al., 2020), fez com que os esforços, nesse momento, fossem direcionados para um fármaco mais acessível, já aceito em testes clínicos para o tratamento da alopecia androgenética, de grande interesse, mas ainda pouco explorado em termos de sistemas de liberação apropriados, e que possa gerar um produto final de fácil aceitação, que é a dutasterida.

Portanto, a partir dos resultados aqui encontrados, e considerando-se o objetivo final mencionado, objetivou-se desenvolver um sistema mais apropriado para a encapsulação da dutasterida, tendo como base as características das NPs AG e BP, que resultaram em uma deposição melhor e mais profunda nos FPs.

4.1.5. Produtos científicos relacionados

International Journal of Pharmaceutics 667 (2024) 124906



Contents lists available at ScienceDirect

International Journal of Pharmaceutics

journal homepage: www.elsevier.com/locate/ijpharm



Effect of gelatin nanoparticles' size and charge on iontophoretic targeted deposition to the hair follicles

Jayanaraian F. Martins Andrade^{a,b}, Agnes-Valencia Weiss^b, Marcílio Cunha-Filho^a,
Guilherme M. Gelfuso^a, Tais Gratieri^{a,*}, Marc Schneider^{b,**}

^a School of Health Sciences, Laboratory of Food, Drugs, and Cosmetics (LTMAC), University of Brasília, Brasília, DF, Brazil

^b Department of Pharmacy, Biopharmaceutics and Pharmaceutical Technology, Saarland University, Saarbrücken, Germany

Publicado na *International Journal of Pharmaceutics* em novembro de 2024.

<https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2024.124906>

EXPERT OPINION ON DRUG DELIVERY
<https://doi.org/10.1080/17425247.2023.2209719>



Taylor & Francis
Taylor & Francis Group

REVIEW



Iontophoresis for the cutaneous delivery of nanoentrapped drugs

Jayanaraian F. M. Andrade, Marcilio Cunha-Filho, Guilherme M. Gelfuso and Tais Gratieri

School of Health Sciences, Laboratory of Food, Drugs, and Cosmetics (LTMAC), University of Brasília, Brasília, DF, Brazil

ABSTRACT

Introduction: The skin is an attractive route for drug delivery. However, the stratum corneum is a critical limiting barrier for drug permeation. Nanoentrapment is a way to enhance cutaneous drug delivery, by diverse mechanisms, with a notable trend of nanoparticles accumulating into the hair follicles when topically applied. Iontophoresis is yet another way of increasing drug transport by applying a mild electrical field that preferentially passes through the hair follicles, for being the pathway of lower resistance. So, iontophoresis application to nanocarriers could further increase actives accumulation into the hair follicles, impacting cutaneous drug delivery.

Areas covered: In this review, the authors aimed to discuss the main factors impacting iontophoretic skin transport when combining nanocarriers with iontophoresis. We further provide an overview of the conditions in which this combination has been studied, the characteristics of nanosystems employed, and hypothesize why the association has succeeded or failed to enhance drug permeation.

Expert opinion: Nanocarriers and iontophoresis association can be promising to enhance cutaneous drug delivery. For better results, the electroosmotic contribution to the iontophoretic transport, mainly of negatively charged nanocarriers, charge density, formulation pH, and skin models should be considered. Moreover, the transfollicular pathway should be considered, especially when designing the nanocarriers.

ARTICLE HISTORY

Received 27 February 2023
Accepted 28 April 2023

KEYWORDS

Nanocarriers; nanoparticles;
skin; transdermal drug
delivery; trans-follicular
route

Publicado na *Expert Opinion on Drug Delivery* em abril de 2023.

<https://doi.org/10.1080/17425247.2023.2209719>

4.2. POTENCIAL DE DIRECIONAMENTO FOLICULAR VESÍCULAS LIPÍDICAS CARREGADAS COM DUTASTERIDA PARA O TRATAMENTO DE ALOPECIA ANDROGENÉTICA.

4.2.1. Introdução

A alopecia androgenética é a forma mais comum de calvície, afetando 80% dos homens e 50% das mulheres com menos de 70 anos de idade (ALSANTALI; SHAPIRO, 2009; PRICE, 1999). Embora não seja uma doença que apresente risco de vida, é crucial considerar o impacto psicológico dessa condição nos pacientes. Muitos deles enfrentam transtorno dismórfico corporal e experimentam uma redução significativa na autoestima, potencialmente desenvolvendo doenças como ansiedade e depressão (HUNT; MCHALE, 2005; LOLLI et al., 2017). Embora a alopecia seja uma condição há muito conhecida, os tratamentos disponíveis ainda são muito limitados.

O tratamento atual da alopecia androgenética compreende, principalmente, a finasterida oral, um inibidor da 5-alfa redutase; e minoxidil tópico, que promove o crescimento capilar, prolongando a fase anágena, mas não interrompe a progressão da alopecia (PHILLIPS; SLOMIANY; ALLISON, 2017). Além disso, ambos apresentam limitações significativas. Enquanto a absorção sistêmica da finasterida pode causar efeitos adversos sexuais, como disfunção erétil e ejaculatória, impotência sexual e ginecomastia (MADHESWARAN et al., 2013), o minoxidil tem baixa solubilidade em água (2 mg/mL) para atingir as concentrações terapêuticas que variam de 2 a 5% (ASIM et al., 2023; OLSEN et al., 2002; SUCHONWANIT et al., 2018), o que traz uma série de dificuldades técnicas para uso. Devido às suas características, o minoxidil é veiculado em soluções com alto teor de etanol e/ou propilenoglicol, substâncias extremamente irritantes para a pele após aplicações repetidas (JEONG et al., 2019; SHARMA et al., 2019; WANG et al., 2017). Além disso, esses veículos voláteis tendem a evaporar, resultando na cristalização do minoxidil no couro cabeludo, impedindo sua penetração (ANGELO et al., 2016; PEREIRA et al., 2017).

A dutasterida (DUT) tem sido explorada como uma opção mais eficaz para o tratamento da alopecia (ARIF et al., 2017; RATHNAYAKE; SINCLAIR, 2010). A DUT pertence à mesma classe da finasterida, mas por ser mais potente (BUSANELLO; TURCATEL, 2018; CLARK et al., 2004), pode ser administrada em doses menores e menos frequentes, contribuindo para a adesão ao tratamento. De fato, a DUT resultou em eficácia superior no crescimento capilar em comparação à finasterida em diferentes ensaios clínicos (EUN et al., 2010; GUBELIN HARCHA et al., 2014; OLSEN et al., 2006; SHANSHANWAL; DHURAT,

2017). No entanto, a DUT também tem um grande potencial para causar os mesmos efeitos adversos da finasterida, com o agravamento de uma meia-vida mais longa de aproximadamente 5 semanas (HIRSHBURG et al., 2016). Assim, desenvolver uma formulação tópica de DUT não irritante que direcione o medicamento aos folículos pilosos (FPs), reduzindo a absorção sistêmica e, conseqüentemente, minimizando os efeitos adversos, é de grande interesse para o tratamento da alopecia androgenética. No entanto, as características físico-químicas da DUT tornam o desenvolvimento de tal sistema de liberação de fármacos mais desafiador.

A DUT é um fármaco muito lipofílico ($\log P = 6,8$), o que impede sua incorporação em formulações aquosas convencionais. Por outro lado, a incorporação do DUT em veículos oleosos resultaria em um produto com aparência pesada e indesejável ao cabelo (USHIROBIRA et al., 2020). Portanto, a DUT requer uma alternativa nanotecnológica para ser entregue de forma eficaz. Neste contexto, as vesículas lipídicas, como lipossomas e etossomas, estão entre os sistemas de liberação de fármacos mais versáteis para encapsular fármacos lipofílicos devido ao seu caráter anfifílico.

Estruturalmente, os lipossomas são vesículas de bicamada lipídica com um núcleo aquoso disperso em um meio aquoso para que possam encapsular moléculas lipofílicas e hidrofílicas (JHA; K. SHARMA; MALVIYA, 2016; NSAIRAT et al., 2022). Eles são biocompatíveis, biodegradáveis e seguros para aplicação tópica (DOS SANTOS et al., 2020; MCCLEMENTS; RAO, 2011; PEPIC et al., 2014). Os lipossomas também são versáteis em sua composição. É possível obter vesículas com diferentes características com pequenas alterações na composição. Por exemplo, a adição de colesterol resulta em vesículas mais rígidas (HUNG et al., 2007), enquanto a adição de tensoativos resulta em vesículas mais flexíveis, nomeadas de transfersomas (TFs) (AKRAM et al., 2021). Há também vesículas produzidas com etanol, um conhecido promotor de permeação, sendo chamadas de etossomas, tais vesículas também possuem maior elasticidade em relação aos lipossomas (PAIVA-SANTOS et al., 2021).

Os lipossomas já foram descritos na literatura como capazes de promover a liberação sustentada de fármacos e como capazes de interagir com os lipídios do estrato córneo e o sebo dos FPs (SANTOS et al., 2018), resultando na formação de uma película com efeito oclusivo, o que proporciona um tempo de contato prolongado entre a formulação e o local-alvo, aumentando a penetração do fármaco (ANDRADE et al., 2014; CAMERA et al., 2010; TOLENTINO et al., 2020). Trabalhos anteriores demonstraram a superioridade de uma formulação de lipossomas na promoção de uma maior permeação cutânea de DUT do que uma solução hidroalcoólica de DUT e de géis convencionais (SHARMA et al., 2011). No entanto,

o trabalho mencionado usou pele de camundongo como modelo, que é mais permeável do que a pele humana e suína, e não verificou o acúmulo de DUT nos FPs. De fato, para o tratamento tópico eficaz da alopecia, a formulação deve ter como alvo os FPs para limitar a exposição sistêmica ao medicamento.

Portanto, este trabalho teve como objetivo desenvolver lipossomas carregados com DUT com diferentes estruturas de bicamada, incluindo um lipossoma convencional obtido com fosfatidilcolina (LP PC), um lipossoma mais rígido com colesterol em sua composição (LP Chol), um lipossoma mais flexível (TFs) e etossomas (ET), para avaliar a capacidade de tais sistemas em atingir os FPs, aumentando o acúmulo de DUT nessas estruturas.

4.2.2. Material e métodos

4.2.2.1. Materiais

A DUT foi adquirida da Henan Tianfu Chemical Co. (Zhengzhou, China). A fosfatidilcolina (PC) da soja foi adquirida da Lipoid (S 100 - PC $\geq$ 94,0 % -, Ludwigshafen, RP, Alemanha). O metanol, o Chol, o Tween[®] 80 e o acetato de sódio foram adquiridos da Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EUA). O etanol, o dodecil sulfato de sódio (SDS), o clorofórmio e o ácido acético foram adquiridos da Dinâmica (São Paulo, Brasil). O acetonitrila foi adquirido da JT Baker (New Jersey, NJ, EUA). O Glucam N foi adquirido da Biovital (São Carlos, Brasil). A fita Scotch n^o. 845 Book foi adquirida da 3 M (St. Paul, MN, EUA). A cola de cianoacrilato foi adquirida da Henkel Loctite (Dublin, Irlanda). A água foi purificada usando um sistema Milli-Q (Millipore, Massachusetts, EUA) com um filtro de extremidade de poro de 0,22 μ m. Todos os outros produtos químicos e reagentes eram de grau analítico.

As orelhas suínas foram obtidas de um matadouro local (Suino Bom Alimentos LTDA., Brasília, Brasil) logo após o sacrifício animal. Em todos os experimentos, foi usada pele suína de espessura total (espessura de aproximadamente 2,0 mm). Isso significa que a gordura subcutânea foi removida, deixando toda a derme intacta. Dessa forma, todas as camadas da pele epidérmica e dérmica estavam intactas, garantindo que os folículos pilosos não fossem danificados de forma alguma. Amostras de pele removidas das orelhas e limpas foram armazenadas a -20 °C por no máximo 1 mês.

4.2.2.2. Formação de lipossomas

Os lipossomas foram obtidos pela técnica de hidratação de filme lipídico (de SÁ et al., 2015). Resumidamente, soluções estoque de DUT (28 mM), PC (200 mM) e Tween[®] 80 (200

mM) foram preparadas em metanol, enquanto uma solução de Chol (10 mM) foi preparada em clorofórmio. A composição dos lipossomas está listada na Tabela 3.

Tabela 3 - Composição dos lipossomas.

Lipossomas	DUT 28 mM	Fosfatidilcolina 200 mM	Colesterol 10 mM	Tween[®] 80 200 mM
LP PC	0,25 mL	2 mL	-	-
LP Col	0,25 mL	2 mL	0,25 mL	-
TF	0,25 mL	2 mL	-	0,225 mL

Todas as formulações tiveram uma concentração final de DUT de aproximadamente 0,30 mg/mL.

Os filmes lipídicos foram formados por rotoevaporação (IKA Lab Dancer, IKA, Staufen, Alemanha) a 60°C por 30 min. Os filmes foram então hidratados por 1 h com 10 mL de tampão acetato (pH 5,4). Após a hidratação, a formulação foi homogeneizada por 30 min a 14.500 rpm em Turrax[®] RW 20 (IKA Lab Dancer, Staufen, Alemanha).

Como a DUT não é solúvel no meio tampão de acetato (solubilidade em água: 0,908 µg/mL), a porção do fármaco que não foi encapsulada nos lipossomas formou cristais. Para removê-los, as dispersões de lipossomas foram filtradas com filtros hidrofílicos de politetrafluoroetileno (PTFE) com tamanho de poro de 0,45 µm. Os lipossomas filtrados foram usados em todos os experimentos.

4.2.2.3. Obtenção de etossomas

Os etossomas foram obtidos pela técnica de gotejamento de água (SGUIZZATO et al., 2020). Brevemente, soluções etanólicas de PC (200 mM) e DUT (17 mM) foram produzidas. O volume da solução de DUT foi fixado em 0,30 mL para atingir a concentração necessária de aproximadamente 0,30 mg/mL. O volume da solução de PC variou entre 0,70 e 4,20 mL para obter etossomas com concentrações etanólica entre 10 e 45%. Água Mili-Q foi gotejada com o auxílio de uma seringa até o volume final de 10 mL. A composição dos etossomas está listada na Tabela 4 a seguir.

Tabela 4 - Composição dos etossomas.

Etossomas	DUT 17 mM	Fosfatidilcolina 200 mM	Água Mili-Q
ET10%	0,30 mL	0,70 mL	9,0 mL
ET15%	0,30 mL	1,20 mL	8,5 mL
ET20%	0,30 mL	1,70 mL	8,0 mL
ET25%	0,30 mL	2,20 mL	7,5 mL
ET30%	0,30 mL	2,70 mL	7,0 mL
ET35%	0,30 mL	3,20 mL	6,5 mL
ET40%	0,30 mL	3,70 mL	6,0 mL
ET45%	0,30 mL	4,20 mL	5,5 mL

Todas as formulações tiveram uma concentração final de DUT de aproximadamente 0,30 mg/mL.

Alternativamente, após a obtenção, os etossomas com teor etanólico de 30% foram secos em rotoevaporador (IKA Lab Dancer, IKA, Staufen , Alemanha) a 40°C até os volumes de 5 e 7 mL para remoção do etanol. Os volumes foram posteriormente completados para 10 mL com água Mili-Q.

4.2.2.4. Caracterização de vesículas carregadas com DUT

4.2.2.4.1. Tamanho das vesículas e potencial zeta

O diâmetro hidrodinâmico e o índice de polidispersão (PDI) foram determinados por espalhamento dinâmico de luz e o potencial zeta por mobilidade eletroforética (Zetasizer Nanoseries , Malvern Instruments, Worcestershire, Reino Unido) usando as amostras diluídas em água purificada (1:100 v/v) a 25°C. Todas as medições foram realizadas em triplicata.

4.2.2.4.2. Doseamento de DUT e eficiência de encapsulação

Para quantificação total de DUT em formulações e controle, 10 µL de amostras foram diluídas em metanol (1:100 v/v) e agitadas por 60 segundos. Como os etossomas não foram filtrados, foi realizado apenas o doseamento para verificar a concentração final de DUT nas formulações.

Para determinar a eficiência de encapsulação (EE%), alíquotas de lipossomas (10µL) foram coletadas antes e depois do processo de filtração. A EE% foi calculada conforme a seguinte Equação 3:

$$EE\% = \frac{DUT_{amostra\ filtrada}}{DUT_{amostra\ não\ filtrada}} \times 100 \quad (\text{Eq. 3})$$

4.2.2.4.3. Análises morfológicas

4.2.2.4.3.1. Microscopia eletrônica de transmissão

As análises morfológicas foram realizadas usando um microscópio eletrônico de transmissão (TEM; JEM 1011 Transmission Electron Microscope, JEOL, Tóquio, Japão – 100 kV). As imagens foram capturadas com uma câmera GATAN BioScan (modelo 820, GATAN, Pensilvânia, EUA) usando o software Digital Micrograph 3.6.5 (GATAN, Pensilvânia, EUA). As amostras foram preparadas conforme relatado anteriormente (DE SÁ et al., 2015). Resumidamente, alíquotas diluídas de lipossomas filtrados e de etossomas foram depositadas em uma grade de cobre revestida com Formvar (Electron Microscopy Sciences, Pensilvânia, EUA) e secas ao ar por 10 min. O excesso de formulações foi removido com o auxílio de um papel de filtro. Depois disso, uma solução de acetato de uranila a 3% (p/v) foi adicionada e seca ao ar por mais 10 min, o excesso também foi removido com papel de filtro.

4.2.2.4.3.2. Microscopia de luz polarizada

As formulações também foram analisadas por microscopia de luz polarizada (PLM, Axio Imager Z2m, Carl Zeiss, Oberkochen, Alemanha) equipada com uma câmera AxioCam 305 para verificar a presença de nanocristais de DUT. As amostras foram preparadas colocando-se uma gota de cada formulação em uma lâmina de vidro e cobrindo-a com uma lamínula.

4.2.2.5. Liberação do fármaco

A liberação do fármaco *in vitro* foi determinada usando membranas de celulose montadas em um conjunto de células de difusão Hanson (Teledyne Hanson Research Inc., San Francisco, CA, EUA) (área de difusão = 1,77 cm²). Todas as formulações testadas e o controle continham aproximadamente 0,30 mg/mL de DUT e foram realizadas em quintuplicata. O compartimento doador foi preenchido com 500 µL de cada formulação, enquanto o compartimento receptor continha 15 mL de solução de 59,5% de água: 0,5% de Tween 80: 40% de etilenoglicol para garantir condições *skin*. O sistema foi mantido sob agitação

magnética (300 rpm). Amostras (1 mL) foram retiradas da solução receptora a cada hora por 12 h, e então em 24, 36 e 48 h para quantificação de DUT, enquanto o mesmo volume de solução foi recolocado no compartimento receptor. Uma solução de DUT em óleo mineral (0,30 mg/mL) foi usada como controle.

4.2.2.6. Testes de penetração cutânea *in vitro*

Testes de penetração *in vitro* foram conduzidos com pele de orelha suína montada em um conjunto de células de difusão tipo Hanson (área de difusão = 1,77 cm²). O compartimento receptor foi preenchido com 15 mL de solução aquosa de SDS a 0,5%, e 500 µL de cada amostra testada foram colocados no compartimento doador em contato com o estrato córneo por 12 ou 24 h. No final de cada tratamento, a DUT foi extraída das camadas da pele usando a técnica de *tape stripping* diferencial (SANTOS et al., 2018). Resumidamente, no final dos experimentos, cada amostra de pele foi colocada em uma superfície plana com o estrato córneo voltado para cima. O estrato córneo foi removido pela aplicação de 15 fitas adesivas. Em seguida, os FPs foram removidos colocando-se uma gota de cola de cianoacrilato na mesma área da pele e cobrindo-a com outra fita adesiva com leve pressão. Após a polimerização da cola (± 2 min), a fita foi removida. Para a remoção completa dos FPs, esse processo foi realizado duas vezes. A pele restante (epiderme e derme viáveis) foi cortada em pedaços com o auxílio de tesouras. A extração do fármaco foi realizada adicionando-se 2,5 mL de metanol sob rotação em um multirrotador (modelo Multi Bio RS-24, BioSan, Riga, Letônia) por 24 h.

O fator de direcionamento folicular (FD) foi avaliado pela seguinte Equação 4:

$$FD_{folicular} = \frac{DUT_{FP}}{\sum DUT_{penetrada}} \quad (\text{Eq. 4})$$

Onde: “DUT_{FP}” é a quantidade de DUT recuperada dos FPs e “ $\sum DUT_{penetrada}$ ” é a soma da quantidade de DUT recuperada de todas as camadas da pele, i.e., estrato córneo, FPs e pele viável.

Para esses testes também foi utilizada uma solução oleosa de DUT (0,30 mg/mL) como controle.

4.2.2.7. Método analítico

A quantificação de DUT foi realizada por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) (modelo LC-20 CE, Shimadzu, Japão) com detecção UV (SPD-M20A) a 242 nm. Uma coluna Luna C8(2) de fase reversa (150 × 4.6 mm; 5,0 µm, Phenomenex[®]) foi utilizada como fase estacionária. A fase móvel consistiu em água Mili-Q: acetonitrila (47:53 v/v) no modo

isocrático sob uma taxa de fluxo de 1,0 mL/min a 40 °C. O volume de injeção das amostras foi de 20 µL. Este método foi validado seguindo as diretrizes da International Conference on Harmonization (ICH) em um trabalho anterior (USHIROBIRA et al., 2020) e foi seletivo e linear na faixa de concentração de 0,25–120,0 µg/mL ($r = 0,9999$; $y = 22858x + 3635,2$). A precisão e exatidão intra e inter-dia do método apresentaram um coeficiente de variação (CV%) e um erro relativo (E%) < 5%. O limite de detecção (LOD) e o limite de quantificação (LOQ) foram 0,14 e 0,41 µg/mL, respectivamente. A recuperação de DUT do estrato córneo, FPs e pele viável foi previamente determinada com valores superiores a 97%.

4.2.2.8. *Análise estatística*

A significância estatística dos dados foi avaliada pela análise de variância (ANOVA) com teste *post hoc* de *Tukey*. O nível de significância foi fixado em 0,05. Todos os dados foram expressos como média ± desvio padrão ($\bar{x} \pm DP$).

4.2.3. Resultados e Discussão

4.2.3.1. *Caracterização dos lipossomas*

Aqui, quatro formulações foram obtidas e comparadas: uma solução oleosa usada como controle e três lipossomas com diferentes estruturas de vesículas. A primeira formulação lipossomada (LP PC) é um lipossoma simples formado apenas por fosfatidilcolina de soja (PC), a principal base dos lipossomas (LI et al., 2015; SAHOO; LABHASETWAR, 2003). O segundo lipossoma (LP PC Chol), além de PC, também contém colesterol (Chol) em sua estrutura, que é comumente empregado para aumentar a estabilidade e a biocompatibilidade dos lipossomas (CROOK et al., 1998; LV et al., 2006). Além disso, ele também promove um efeito de condensação na bicamada fosfolipídica, criando vesículas mais rígidas (KADDAH et al., 2018). O terceiro lipossoma, além do PC, contém um tensoativo (*edge activator*) em sua composição, formando um tipo especial de lipossoma, também conhecido como transfersoma (TF). A presença do tensoativo, torna as vesículas menores e ultradeformáveis, sendo até 8 vezes mais elásticas do que um lipossoma convencional (GARG et al., 2017; OYARZÚN et al., 2021). Os três lipossomas eram visualmente semelhantes, de aparência esbranquiçada (Figura 26).

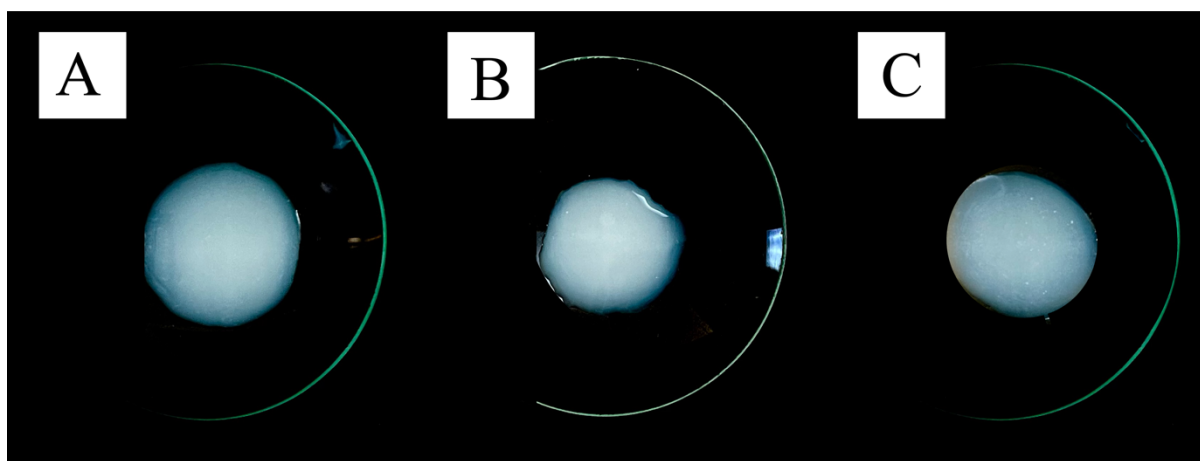


Figura 26 - Aparência dos lipossomas. (A) LP PC; (B) LP PC Chol e (C) TF.

A análise morfológica por TEM mostrou que o TF tinha um núcleo condensado e formou vesículas menores do que os outros lipossomas (Figura 27C), ainda menores do que a medida do tamanho do DLS (Tabela 5), o que pode ser explicado por agregações na amostra. O LP PC também formou vesículas esféricas com um núcleo condensado, mas maiores do que os outros lipossomas (Figura 27A). O LP PC Chol apresentou um formato mais irregular (Figura 27B), o que pode ser atribuído à concentração de colesterol, que impacta diretamente as membranas fosfolipídicas dos lipossomas. Esse comportamento foi demonstrado anteriormente na literatura em estudos nos quais o aumento da concentração de colesterol fez com que lipossomas de formato irregular se tornassem esféricos (JOVANOVIĆ et al., 2018; SIQUEIRA et al., 2011).

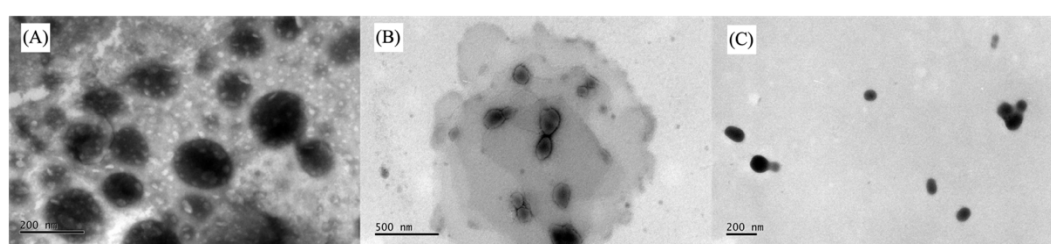


Figura 27 - Imagens de TEM dos lipossomas carregados com DUT: (A) LP PC, 10k; (B) LP PC Chol, 25k; e (C) TF, 12k.

Tabela 5 - Características dos lipossomas após filtração.

Lipossomas	Tamanho (nm)	PdI	Potencial Zeta (mV)	EE (%)	DUT (mg/mL)
LP PC	$347 \pm 12,5$	$0,28 \pm 0,04$	$-0,61 \pm 0,25$	$73,5 \pm 12,9$	$0,29 \pm 0,03$
LP Col	$285,7 \pm 4,67$	$0,22 \pm 0,02$	$1,63 \pm 0,13$	$70,2 \pm 10,5$	$0,28 \pm 0,05$

TF	212,3 ± 12,2	0,22 ± 0,02	1,27 ± 0,03	88,1 ± 1,0	0,35 ± 0,09
<i>N</i> = 3					

Conforme mencionado, a DUT é uma molécula muito lipofílica (solubilidade em água: 0,908 µg/mL, log *P* = 6,8). Portanto, em tais dispersões coloidais, espera-se que o fármaco seja carregado, especificamente entre a bicamada lipídica. A quantidade de fármaco que excede a capacidade de carga da formulação não seria solúvel e precipitaria. No entanto, nenhum precipitado foi formado em nenhuma das formulações. Dessa forma, levantamos a hipótese de que a DUT poderia ter formado cristais coloidais insolúveis que poderiam estar no núcleo aquoso interno ou no meio aquoso externo. Para confirmar ou rejeitar tal hipótese, as formulações foram visualizadas sob um microscópio de luz polarizada. Lipossomas vazios não filtrados também foram observados como controle (Figura 28A). De fato, nada é observado nas formulações sem o fármaco, mas, em amostras não filtradas contendo DUT, muitos filamentos estreitos foram identificados como cristais (Figura 28B). Esses filamentos são caracterizados por uma mudança na luz colorida refletida quando o vidro do microscópio é movido. O processo de filtração através de um filtro de seringa com poros de 0,45 µm removeu uma parte dos cristais e diminuiu principalmente o tamanho deles, mas alguns cristais menores ainda passaram pelo filtro de seringa com poros de 0,45 µm, conforme visto nas Figuras 28B e 28C. As medições de tamanho, reduções de *PdI* e *EE%* após homogeneização e filtração confirmam ainda mais a remoção e redução do tamanho dos cristais (Tabela 6).

Uma vez que a presença de cristais insolúveis de DUT poderia interferir na análise da influência das características das vesículas dos lipossomas para o efeito de direcionamento para os FPs, apenas amostras filtradas foram utilizadas para os testes subsequentes. É essencial destacar que todas as amostras foram produzidas para atingir uma concentração final de DUT semelhante (aproximadamente 0,30 mg/mL). A eficiência de encapsulação (*EE%*) foi considerada a razão entre amostras não filtradas e filtradas que atingiram tais concentrações finais de DUT (Tabela 5).

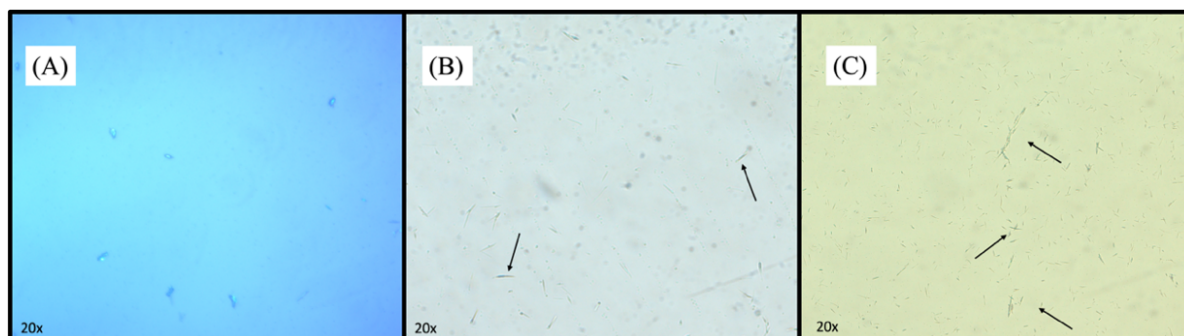


Figura 28 - Microscopia de luz polarizada de lipossomas carregados com DUT. (A) lipossomas vazios não filtrados; (B) lipossomas carregados com DUT não filtrados - TF; e (C) lipossomas carregados com DUT filtrados - TF. Ampliação: 20 $\times$. As setas indicam alguns dos cristais.

Tabela 6 - Efeito da filtração no tamanho médio dos lipossomas (nm) e PdI.

	LP PC Não filtrado	LP PC Filtrado	LP Col Não filtrado	LP Col Filtrado	TF Não filtrado	TF Filtrado
Tamanho (nm)	863,4 $\pm$ 86,7	347 $\pm$ 12,5	2382,7 $\pm$ 271,0	285,7 $\pm$ 4,67	272,1 $\pm$ 28,3	212,3 $\pm$ 12,2
PdI	0,52 $\pm$ 0,10	0,28 $\pm$ 0,04	0,81 $\pm$ 0,16	0,22 $\pm$ 0,02	0,18 $\pm$ 0,03	0,22 $\pm$ 0,02

4.2.3.2. Liberação de DUT *in vitro* - lipossomas

A Figura 29 mostra a porcentagem de liberação de DUT dos lipossomas e controle – uma solução oleosa de DUT. A solução oleosa não seria uma formulação viável para administração tópica, devido ao aspecto oleoso que deixaria no couro cabeludo. Ainda assim, foi escolhida como controle por ser uma formulação que teria DUT completamente dissolvida, portanto, com maior afinidade por ele.

Todos os lipossomas apresentaram perfis de liberação prolongada, mas TF foi a formulação que mais se aproximou da solução oleosa. A presença do tensoativo pareceu aumentar a solubilização da DUT, aumentando seu tempo de liberação. TF apresentou apenas 13,5 $\pm$ 1,5% de liberação do fármaco em 48 h, enquanto LP PC liberou significativamente mais fármaco ($p < 0,0001$) no mesmo período, 16,3 $\pm$ 1,5%. Após 48 h, LP PC Chol teve a maior quantidade de DUT liberada de 19,5 $\pm$ 1,7% ($p < 0,0001$). De fato, o colesterol ($\log P = 7,0$) é tão lipofílico quanto a DUT ($\log P = 6,8$); portanto, ambas moléculas competem naturalmente para interagir com os lipídios das vesículas, fazendo com que a DUT seja liberada deste lipossoma mais rapidamente do que os outros.

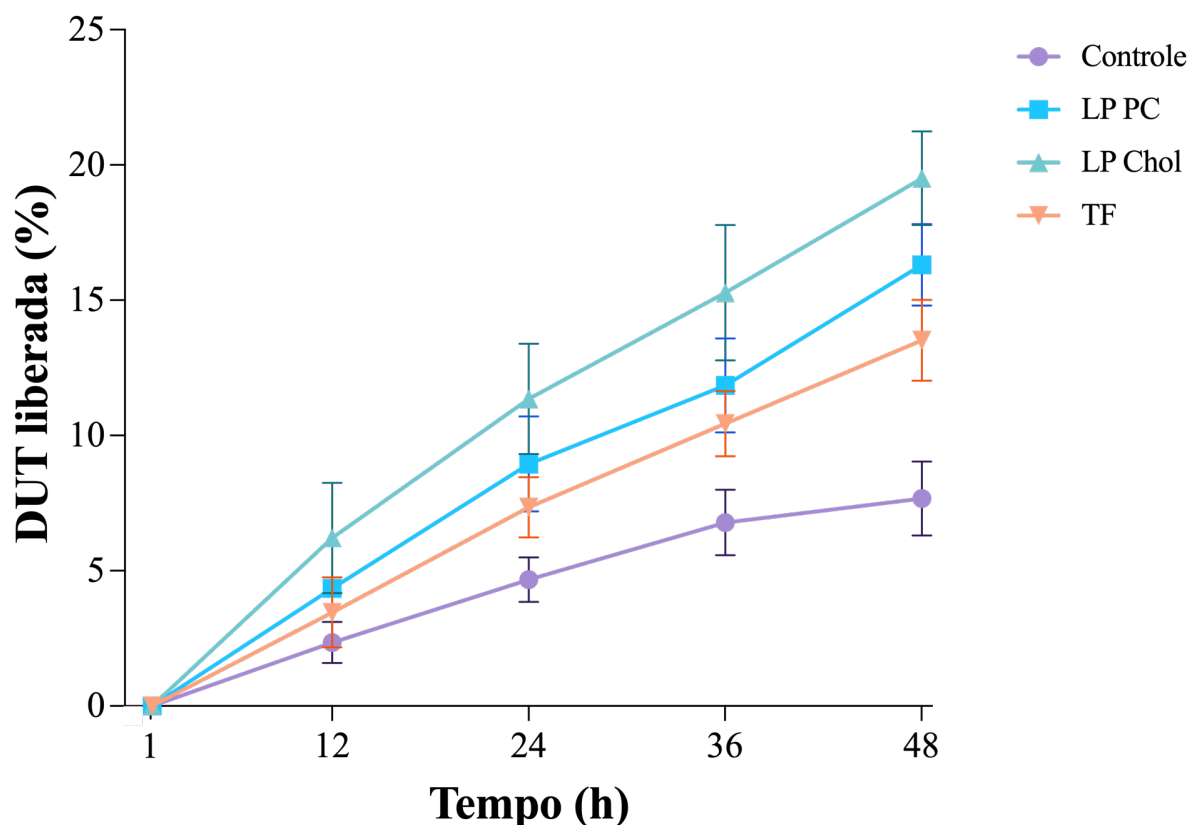


Figura 29 - Liberação de DUT dos lipossomas LP PC, LP Chol e TF, e controle (solução oleosa de DUT) ao longo de 48 h. Dados expressos como média $\pm$ DP (n = 5).

4.2.3.3. Experimento de penetração cutânea *in vitro* e efeito de direcionamento folicular - lipossomas

Os testes de penetração cutânea *in vitro* foram realizados por 12 e 24 h usando pele obtida de orelhas de suínos. Em 12 h, LP PC Chol promoveu o acúmulo mais significativo de DUT nos FPs ($2,28 \pm 0,60 \mu\text{g}/\text{cm}^2$), 1,2 e 1,3 vezes maior que LP PC e TF, respectivamente (Figura 30). Embora TF tenha apresentado menores quantidades de acúmulo de DUT em todas as camadas da pele (Figura 30) neste período, ele teve um efeito mais significativo no direcionamento dos FPs, ou seja, a razão entre a quantidade de DUT nos FPs e a DUT recuperada da soma de todas as camadas da pele foi de 0,32 ($p < 0,005$), em comparação com LP PC e LP PC Chol, que tiveram fatores de direcionamento de 0,14 e 0,15, respectivamente (Figura 31). O potencial de direcionamento folicular de TF em 12 h é semelhante a outros sistemas de liberação carregados com DUT encontrados na literatura. No mesmo período de tratamento da pele, nanocapsulas de núcleo lipídico com e sem revestimento de quitosana tiveram um fator de direcionamento de aproximadamente 0,28 (USHIROBIRA et al., 2020).

Os resultados apresentados aqui mostram uma ligeira superioridade das vesículas elásticas no direcionamento folicular de DUT em um período mais curto (12 h). No entanto, a distribuição do fármaco entre as camadas da pele é equilibrada em 24 h. De fato, o fator de direcionamento do TF diminui para 0,27 no maior tempo. Inicialmente, TF tem como alvo os FPs após a administração, ainda assim, com o tempo, o fármaco é liberado dessas estruturas e continua a se difundir do FPs para outras camadas da pele. Outra possibilidade é que toda a estrutura do TF continue a penetrar na pele a partir do FP. Embora essa última hipótese seja menos provável de ocorrer, uma vez que se espera que a vesícula lipídica se funda no conteúdo de sebo do FP, ela não pode ser descartada inteiramente.

Para o LP PC Chol, o valor de direcionamento aumenta de 0,15 em 12 h para 0,27 após 24 h, tempo no qual uma espécie de equilíbrio é alcançada em relação à quantidade de DUT em todas as camadas da pele analisadas. O mesmo comportamento não é observado para a formulação LP PC, que permanece com quase o mesmo fator de direcionamento após 12 e 24 h (0,14 e 0,13, respectivamente). Isso provavelmente se deve à liberação mais lenta do fármaco de DUT dessas formulações, o que pode exigir um tempo maior para atingir tal equilíbrio.

O controle de DUT não teve como alvo os FPs em 12 h (fator de direcionamento = 0,31), mas também atingiu o equilíbrio em 24 h (direcionamento folicular = 0,24), e não foi significativamente maior que LP Chol e TF ($p > 0,005$). Não obstante, nenhuma DUT foi detectada no compartimento do receptor (LOD = 0,14 $\mu\text{g/mL}$) para qualquer sistema de administração de fármaco testado e controle.

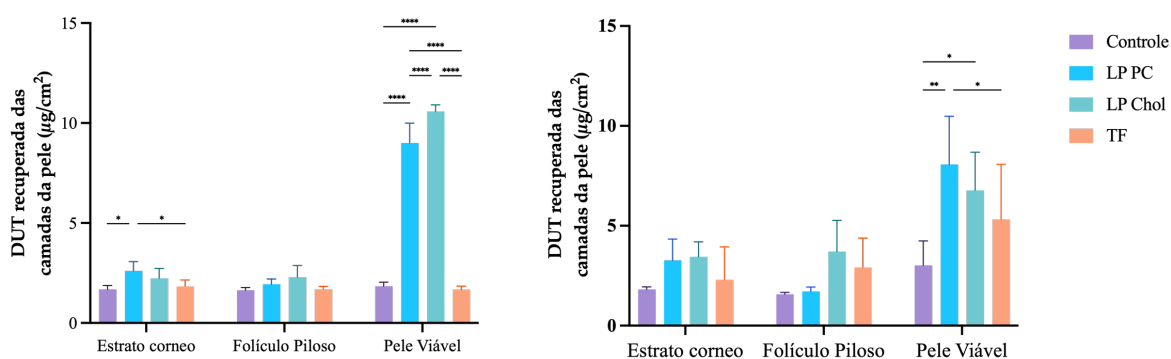


Figura 30 - Quantidade de DUT recuperada do estrato córneo, folículos capilares e pele viável após 12 h (A) e 24 h (B) de experimentos de penetração na pele in vitro com os lipossomas LP PC, LP Chol, TF e controle. Dados expressos como média $\pm$ DP ($n = 6$). **** $p < 0,0001$, *** $p < 0,005$, ** $p < 0,007$ e * $p < 0,02$.

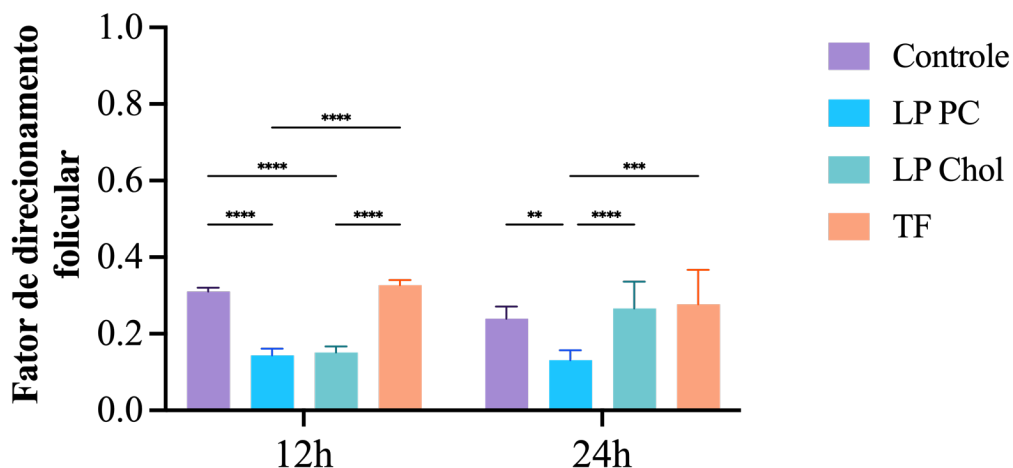


Figure 31 - Fator de direcionamento folicular do DUT dos lipossomas LP PC, LP Chol, TF e controle após 12 e 24 h de aplicação na pele. **** $p < 0,0001$, *** $p < 0,0008$ e ** $p < 0,005$.

4.2.3.4. Caracterização dos etossomas

Foram produzidos oito etossomas com concentrações crescentes de etanol de 10% até 45% (Figura 32). Os etossomas com concentrações de 10 e 15% resultaram em vesículas muito grandes e em amostras muito polidispersas, dessa forma, foram descartados para a continuidade do trabalho. Todos os etossomas filtrados (F) apresentaram tamanho reduzidos e/ou PDI alto, e, por isso, também foram descartados. A partir de 20% de etanol, as amostras não filtradas (SF) apresentaram o tamanho de interesse, em torno de 600 nm, atingindo o maior valor com 30% de etanol (ET30), $608,4 \pm 43,3$ nm com o menor PDI ($0,13 \pm 0,09$). Portanto, esses etossomas foram selecionados para a continuidade dos experimentos.

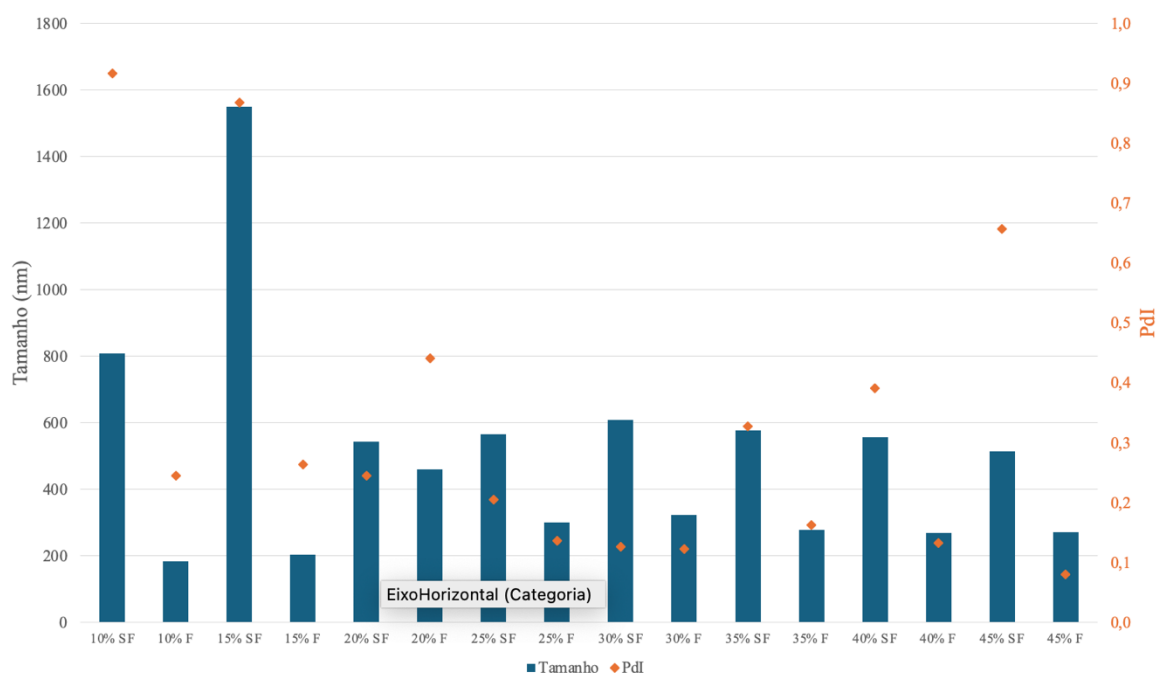


Figura 32 - Influência da concentração de etanol no tamanho hidrodinâmico e PDI de etossomas. SF: amostras não filtradas. F: amostras filtradas.

No entanto, o etanol é uma substância irritativa para a pele, principalmente após repetidas aplicações, por isso, após a obtenção dos ET30 eles foram rotaevaporados até 30 e 50% de seus volumes finais (10 mL) para remoção do etanol. Para que a concentração permanecesse a mesma, depois da secagem os volumes finais foram completados com água Mili-Q. Visualmente, os etossomas, assim como os lipossomas, também se apresentaram como um líquido esbranquiçado, sem alterações visíveis após a secagem (Figura 33).

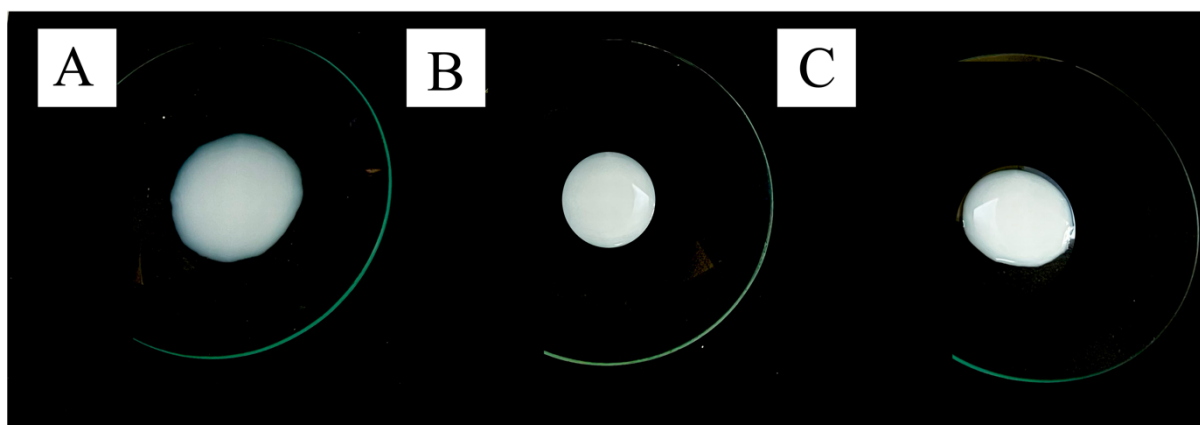


Figure 33 - Aspecto visual dos ET30. A) ET30; B) ET30 30% rotaevaporado e C) ET30 50% rotaevaporado.

O processo de secagem, ainda que tenha causado uma redução no tamanho das vesículas, não as alterou significativamente ($p > 0.05$) (Tabela 7). Como os etossomas que foram 30% secos possuíam características mais semelhantes com o ET30, eles foram selecionados para dar continuidade aos testes. Na amostra de microscopia eletrônica de transmissão do ET30, é possível visualizar a formação de vesículas esféricas (Figura 34A), enquanto os ET30 que passaram pelo processo de rotaevaporação, ainda que esféricos, eram mais polidispersos (Figura 34B) e menores do que as medidas de DLS (Tabela 7), o que pode se dever ao preparo das amostras para a microscopia.

Tabela 7 - Características dos etossomas.

Etossomas	Tamanho (nm)	PdI	Potencial Zeta (mV)	DUT (mg/mL)
ET30	$604,8 \pm 43,3$	$0,13 \pm 0,09$	$2,2 \pm 0,2$	$0,30 \pm 0,008$
ET30 30% RE	$581,7 \pm 20,5$	$0,05 \pm 0,07$	$2,7 \pm 0,1$	$0,29 \pm 0,005$

ET30 50% RE	$565,2 \pm 49,9$	$0,24 \pm 0,19$	$-3,1 \pm 0,3$	$0,26 \pm 0,010$
--------------------	------------------	-----------------	----------------	------------------

N = 3. RE: rotaevaporado.

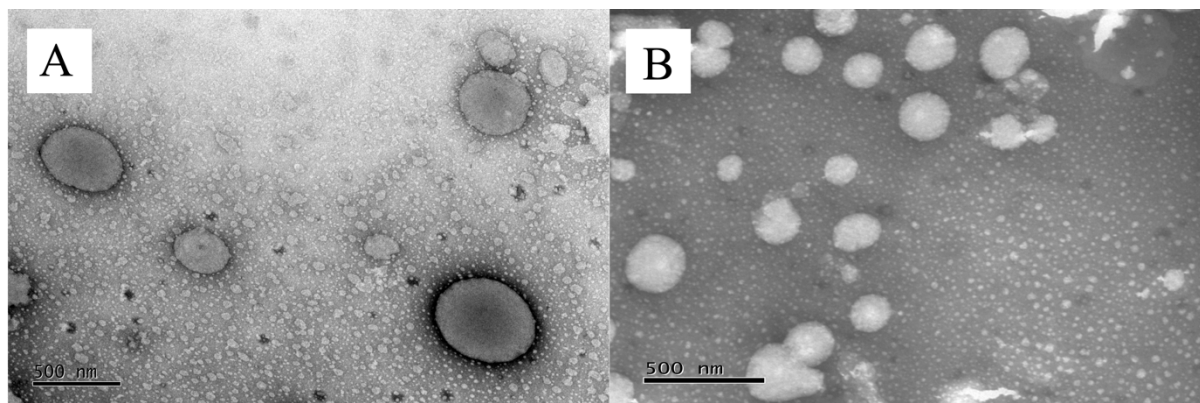


Figura 34 - Imagens de TEM dos etossomas carregados com DUT. (A) ET30, 8k e (B) ET30 30% rotaevaporado, 8k.

As micrografias feitas por luz polarizada também evidenciam a presença de cristais nas amostras (Figura 35), pois, apesar da presença de 30% de etanol, a DUT continua com baixa solubilidade neste meio, aproximadamente $1,73 \pm 0,25 \mu\text{g/mL}$. No entanto as medidas do DLS indicam que esses cristais nas amostras não filtradas de etossomas são bem menores (Tabela 7) do que os cristais presentes nas amostras não filtradas de lipossomas (Tabela 6).

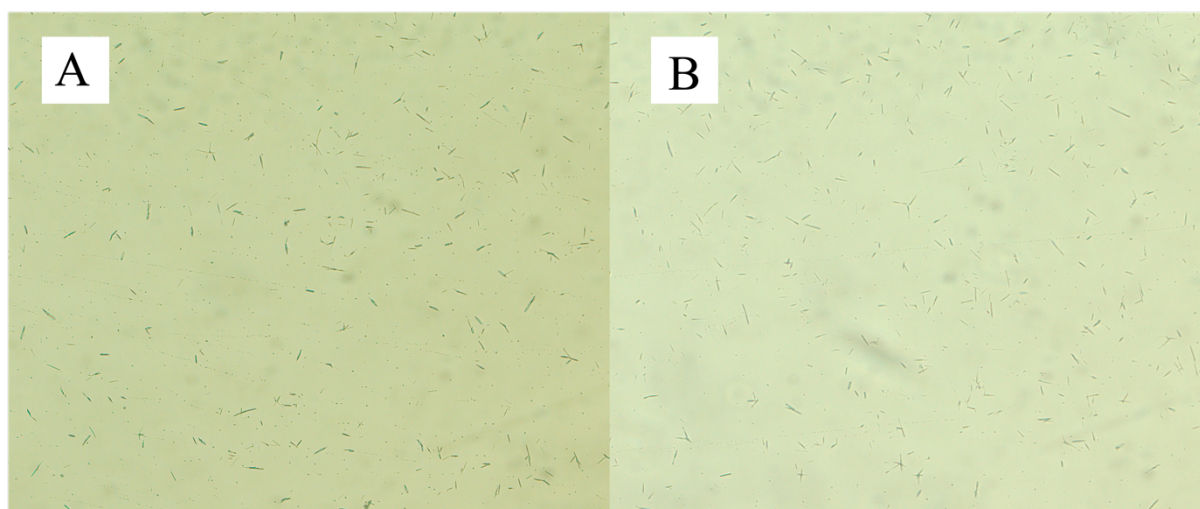


Figura 35 - Microscopia de luz polarizada de etossomas carregados com DUT. (A) ET30 e (B) ET30 30% rotaevaporado. Ampliação: 20 $\times$.

4.2.3.5. Ensaios de liberação de DUT *in vitro* – etossomas

A Figura 36 mostra o percentual de DUT liberada dos ET30, ET30 30% rotaevaporado e do controle, uma solução oleosa de DUT. Novamente, cabe ressaltar que uma formulação

oleosa de DUT não seria viável em um caso clínico, uma vez que sua aplicação seria desagradável para o paciente, deixando o cabelo com um aspecto pesado. De fato, uma solução etanólica (30%) seria mais adequada para o controle, no entanto, a solubilidade da DUT nesse meio ($1,73 \pm 0,25 \mu\text{g/mL}$) era insuficiente para atingir a mesma concentração de DUT nos etossomas, em torno de $0,30 \text{ mg/mL}$. Portanto, optou-se por utilizar o mesmo controle dos lipossomas, DUT em óleo mineral, uma vez que nesse meio ela se encontra completamente dissolvida.

O etossoma rotaevaporado e o controle apresentaram basicamente o mesmo perfil de liberação ($p > 0,05$), tendo liberado apenas $8,2 \pm 1,3 \%$ e $7,7 \pm 1,4\%$ de DUT ao final das 48 h, respectivamente. Considerando a alta lipofilicidade da DUT é esperado que ela tenha mais afinidade pelo óleo do controle e pelos fosfolipídeos das vesículas, difundindo-se lentamente para o meio mais hidrofílico. Já o ET30 liberou significativamente mais DUT que o controle e o outro etossoma a partir de 24 h ($p < 0,0001$), tendo liberado $14,6 \pm 1,86\%$ de DUT em 48 h. Para explicar a maior liberação de DUT do ET30, hipotetizou-se que parte do etanol se solubilizou na água carregando consigo uma porção da DUT que estava solubilizada nele. De fato, já foi relatado na literatura que o etanol é capaz de acelerar a liberação de fármacos (AL-SUWAYEH et al., 2014).

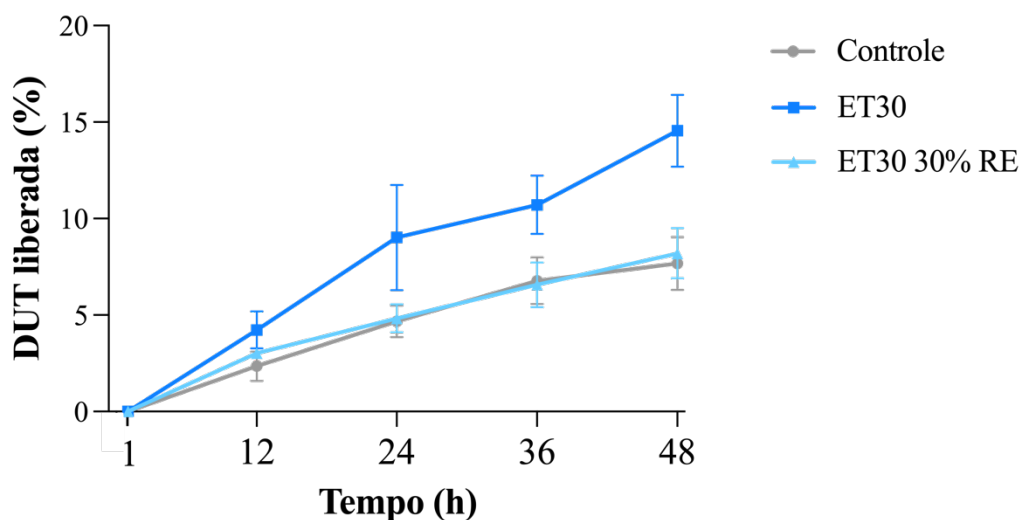


Figura 36 - Liberação de DUT dos etossomas ET30, ET30 30% rotaevaporado e controle (solução oleosa de DUT) ao longo de 48 h. Dados expressos como média $\pm$ DP (n = 5).

4.2.3.6. Experimento de penetração cutânea *in vitro* e direcionamento folicular – etossomas

Os ensaios de penetração cutânea *in vitro* foram realizados em 12 e 24 h (Figura 37). Nos dois casos, o controle oleoso de DUT promoveu um acúmulo maior de DUT em todas as

camadas da pele ($p < 0,05$), no entanto, como discutido anteriormente, o controle não foi capaz de direcionar a DUT FPs em nenhum dos dois tempos. Em 12 h o fator de direcionamento calculado foi de 0,31, e em 24 h diminuiu para 0,24, acumulando mais DUT na pele viável do que no estrato córneo e FPs.

O perfil de permeação cutânea foi similar entre os dois etossomas, com a DUT acumulada no estrato córneo em 12 h difundindo-se para os FPs e pele viável em 24 h nos dois casos, mas sem diferença estatisticamente significativa ($p > 0,05$). É importante ressaltar que o acúmulo gerado pelos etossomas na pele viável foi estatisticamente menor que o controle e que o acúmulo de DUT gerado pelos lipossomas ($p < 0,0001$) (Figura 30). Além disso, a DUT não foi detectada no compartimento do receptor ($\text{LOD} = 0,14 \mu\text{g/mL}$) em nenhum caso. Indicando uma tendência menor de ser absorvida pelos tecidos próximos e pela corrente sanguínea, diminuindo o risco de causar efeitos adversos que se quer evitar.

Quanto ao potencial de direcionamento para os FPs (Figura 38), o efeito de direcionamento gerado pelo ET30 aumentou de 0,28 para 0,34 em 12 h e 24 h, respectivamente, e foi estatisticamente maior que o fator de direcionamento do controle (0,24 em 24 h) e do etossoma rotaevaporado (0,28 em 24 h) ($p < 0,03$). O etanol é um conhecido promotor de permeação transdérmica devido a sua ação degradadora sobre os lipídios do estrato córneo (LACHENMEIER, 2008; OBATA et al., 1993). É proposto que o etanol, além de dissolver os lipídios da pele, facilite a entrada dos solutos na pele (BOMMANNAN; POTTS; GUY, 1991; HEARD; KUNG; THOMAS, 2006; HEARD; SCREEN, 2008), o que também pode ter ocorrido no sebo presente nos FPs no presente estudo. Evidentemente, mais estudos são necessários para confirmar essa hipótese.

Além disso, como discutido anteriormente, formulações com um alto teor de álcool ($>10\%$) podem causar diversos efeitos adversos na pele, como ressecamento, eritema e dermatite de contato, principalmente após repetidas aplicações. É claro que o perfil de liberação aliado à potência da DUT indica que as aplicações de uma formulação contendo ET30 não precisariam ser frequentes, ainda assim, mais estudos são necessários para avaliar o perfil de segurança de tal formulação.

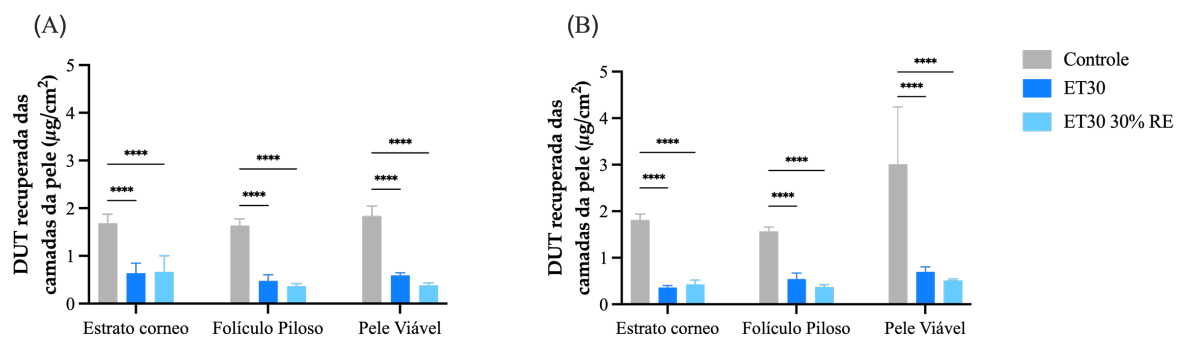


Figura 37 - Quantidade de DUT recuperada do estrato córneo, folículos capilares e pele viável após 12 h (A) e 24 h (B) de experimentos de penetração na pele in vitro com os etossomas ET30, ET30 30% rotaevaporado e controle. Dados expressos como média $\pm$ DP (n = 6). **** p < 0,0001.

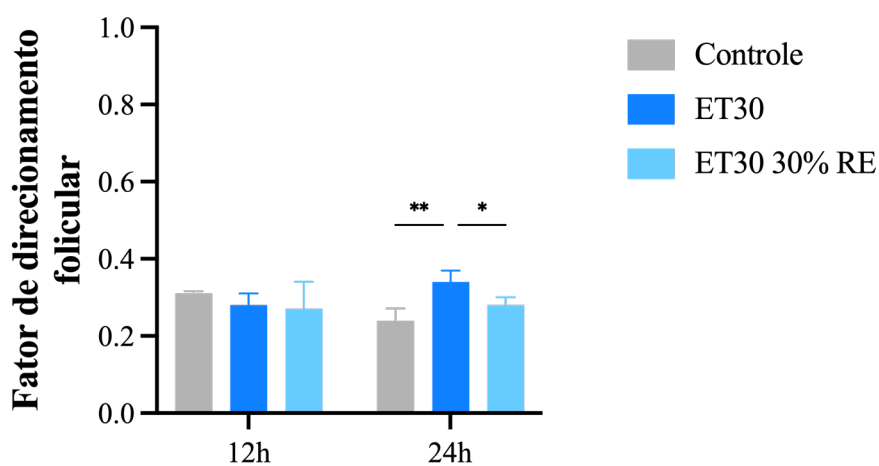


Figura 38 - Fator de direcionamento folicular da DUT dos etossomas ET30, ET30 30% rotaevaporado e controle após 12 e 24 h de aplicação na pele. ** p < 0,003 e * p < 0,03.

4.2.4. Conclusões

Nesta etapa, obtivemos vesículas carregadas com DUT com diferentes estruturas de bicamada, que impactaram o perfil de liberação do fármaco, o acúmulo de DUT na pele após um experimento de permeação e o direcionamento do fármaco para os FPs. A adição de colesterol à estrutura de bicamada, que deve aumentar a rigidez da vesícula, resultou em uma liberação mais rápida do fármaco, pois o próprio colesterol pode ter competido com a DUT pelos locais de interação lipídica. Esse comportamento também afetou a penetração cutânea, promovendo a penetração do DUT na pele, mas sem direcioná-la aos FPs. Vesículas com etanol em sua composição também apresentaram um perfil de liberação mais rápido, liberando ligeiramente menos DUT do que LP PC Chol. No entanto, diferente do colesterol, a presença do etanol melhorou o direcionamento para os FPs.

A adição de um tensoativo à bicamada do lipídica, formando um TF, que deve ter uma estrutura mais flexível, teve o efeito oposto, promovendo melhor controle sobre a liberação da DUT e um direcionamento maior nas primeiras horas. No entanto, com o tempo, a DUT pareceu se difundir do FPs para a pele viável, atingindo um equilíbrio entre todas as camadas da pele analisadas. Portanto, os TFs e os ET30 são as opções mais promissoras encontradas aqui para a administração tópica de DUT, mas são necessárias mais otimizações para uma formulação comercial. Mais estudos clínicos também devem abordar a segurança do uso prolongado dessas formulações.

4.2.5. Produtos científicos relacionados



pharmaceutics



Article

Evaluation of Dutasteride-Loaded Liposomes and Transfersomes for Follicular-Targeting for Androgenic Alopecia Topical Treatment

Jayanaraian F. M. Andrade , Breno N. Matos, Rafael V. Rocho, Geisa N. Barbalho , Marcilio Cunha-Filho ,
Guilherme M. Gelfuso and Taís Gratieri *

Laboratory of Food, Drugs, and Cosmetics (LTMAC), University of Brasilia (UnB), Brasilia 70910-900, DF, Brazil; mjayanaraian@gmail.com (J.F.M.A.); brenomatos15@hotmail.com (B.N.M.); rafael.rocho@aluno.unb.br (R.V.R.); geisabarbalho@gmail.com (G.N.B.); marciliofarm@hotmail.com (M.C.-F.); gmgelfuso@unb.br (G.M.G.)

* Correspondence: tgratieri@gmail.com

Publicado na *Pharmaceutics* em novembro de 2024.

<https://doi.org/10.3390/pharmaceutics16121524> (Open Access).

THERAPEUTIC DELIVERY
<https://doi.org/10.1080/20415990.2024.2437973>



Taylor & Francis
Taylor & Francis Group

REVIEW



Topical dutasteride for androgenic alopecia: current state and prospects

Jayanaraian F. M. Andrade^a, Andrew Verbinnen^b, Andrew Bakst^b, Marcílio Cunha-Filho^a, Guilherme M. Gelfuso^a
and Taís Gratieri

^aLaboratory of Food, Drugs, and Cosmetics (LTMAC), University of Brasilia (UnB), Brasília, Brazil; ^bHairDAO Association, County of Sussex, DE, USA

ABSTRACT

Androgenic alopecia has a high incidence, affecting 80% of men and 50% of women in their lifetimes. Although not a life-threatening disease, it can be a deep psychological burden to patients and still lacks an effective and safe treatment. Dutasteride is a 5 α -alpha-reductase inhibitor approved to treat benign prostatic hyperplasia that is also commonly prescribed *off-label* to treat androgenic alopecia. However, oral dutasteride may cause several severe sexual and neurological sideeffects. Therefore, an effective, localized dutasteride treatment that can reduce the effects of systemic uptake is of great interest. Here, we review available therapies to treat androgenic alopecia focusing on topical formulations developed thus far—including minoxidil, finasteride, and cosmetics—and on dutasteride-loaded nanocarriers targeting hair follicles.

TWEETABLE ABSTRACT

Dutasteride has gained popularity as a potent alternative to finasteride for treating alopecia. However, developing a safe and effective commercial product is challenging. We seek to identify a follicle-specific delivery vehicle that reduces dutasteride's systemic absorption.

ARTICLE HISTORY

Received 16 July 2024
Accepted 2 December 2024

KEYWORDS

Hair follicles; nanocarriers; nanotechnology; skin; topical delivery

Publicado na *Therapeutic Delivery* em dezembro de 2024.

<https://doi.org/10.1080/20415990.2024.2437973>

An Update on Nanocarriers for Follicular-Targeted Drug Delivery for Androgenetic Alopecia Topical Treatment

Journal:	<i>Expert Opinion on Drug Delivery</i>
Manuscript ID	EODD-2024-ST-0397.R1
Manuscript Type:	Review (Invited)
Keywords:	Dutasteride, Finasteride, Minoxidil, Hair follicle, Topical delivery

Artigo de revisão submetido à *Expert Opinion on Delivery*.

Status em dezembro de 2024: em revisão.

5. Conclusões gerais

Aqui, na primeira parte do trabalho, foi investigada a influência do tamanho e da carga superficial de nanopartículas poliméricas na deposição desses carreadores nos folículos pilosos. Ficou demonstrado que durante a permeação passiva, nanopartículas maiores (~ 750 nm) e positivamente carregadas, seguidas das nanopartículas de tamanho intermediário (~ 350 nm) negativamente carregadas foram mais eficientes em atingir estruturas mais profundas nos folículos, onde estão os alvos para o tratamento da alopecia, i.e., bulbo e a papila dérmica. Também ficou demonstrado que a iontoforese foi eficiente em promover um aumento significativo do transporte dessas nanopartículas para os folículos pilosos.

Na segunda parte do trabalho, a dutasterida foi carregada com sucesso em vesículas lipídicas com diferentes estruturas de bicamada: um lipossoma simples, um lipossoma rígido, um transfersoma e dois etossomas. Todas as formulações apresentaram um perfil de liberação controlada e os transfersomas e etossomas com 30% de álcool em sua composição foram mais eficientes em direcionar a dutasterida para os folículos pilosos. A dutasterida é um fármaco muito promissor para o tratamento da alopecia androgenética, no entanto suas características físico-químicas tornam sua veiculação para administração tópica muito desafiadora. Talvez esse seja o motivo de haver pouquíssimos trabalhos na literatura que exploram a dutasterida em sistemas de liberação de fármacos. Dos poucos trabalhos acerca do tema, a maioria não performou os controles apropriados que tornasse possível uma comparação direta com os resultados aqui encontrados. Dentre as limitações, as mais recorrentes são a falha em quantificar a dutasterida nos folículos pilosos, e a utilização de pele de roedores ou pele dermatomizada para os estudos de penetração cutânea *in vitro*, que são modelos muito mais permeáveis que a pele humana ou a suína.

Dessa forma, os resultados aqui encontrados representam mais um passo em direção à obtenção de um tratamento mais seguro e eficaz para os pacientes que sofrem com a alopecia androgenética.

REFERÊNCIAS

ABLA, Nada; NAIK, Aarti; GUY, Richard H.; KALIA, Yogeshvar N. Contributions of electromigration and electroosmosis to peptide iontophoresis across intact and impaired skin. **Journal of Controlled Release**, [S. l.], v. 108, n. 2–3, p. 319–330, 2005. ISSN: 01683659. DOI: 10.1016/j.jconrel.2005.08.011.

ABLA, Nada; NAIK, Aarti; GUY, Richard H.; KALIA, Yogeshvar N. Topical Iontophoresis of Valaciclovir Hydrochloride Improves Cutaneous Aciclovir Delivery. **Pharmaceutical Research**, [S. l.], v. 23, n. 8, p. 1842–1849, 2006. ISSN: 0724-8741, 1573-904X. DOI: 10.1007/s11095-006-9017-2.

ABRAMS, D.; HUANG, Y.; MCQUARRIE, S.; ROA, W.; CHEN, H.; LÖBENBERG, R.; AZARMI, S.; MILLER, G. G.; FINLAY, W. H. Optimization of a two-step desolvation method for preparing gelatin nanoparticles and cell uptake studies in 143B osteosarcoma cancer cells. [S. l.], 2006. DOI: 10.7939/R3J96097M. Disponível em: <https://era.library.ualberta.ca/items/6a5e9cf1-a23f-41ec-b0f2-db35bb1dc271>. Acesso em: 10 jan. 2024.

ADAMOWICZ, Roksana; ZAŁĘCKI, Piotr; DUKIEL, Anna; NOWICKA, Danuta. Association between Androgenetic Alopecia and Psychosocial Disease Burden: A Cross-Sectional Survey among Polish Men. **Dermatology Research and Practice**, [S. l.], v. 2022, p. 1845044, 2022. ISSN: 1687-6105. DOI: 10.1155/2022/1845044.

AGUILELLA, Vicente; KONTTURI, Kyösti; MURTOMÄKI, Lasse; RAMÍREZ, Patricio. Estimation of the pore size and charge density in human cadaver skin. **Journal of Controlled Release**, [S. l.], v. 32, n. 3, p. 249–257, 1994. ISSN: 01683659. DOI: 10.1016/0168-3659(94)90235-6.

AKRAM, Muhammad Waseem; JAMSHAD, Humzah; REHMAN, Fiza Ur; ZAEEM, Muhammad; KHAN, Jehan Zeb; ZEB, Ahmad. Transfersomes: a Revolutionary Nanosystem for Efficient Transdermal Drug Delivery. **AAPS PharmSciTech**, [S. l.], v. 23, n. 1, p. 7, 2021. ISSN: 1530-9932. DOI: 10.1208/s12249-021-02166-9.

ALSANTALI, Adel; SHAPIRO, Jerry. Androgens and hair loss. **Current Opinion in Endocrinology, Diabetes & Obesity**, [S. l.], v. 16, n. 3, p. 246–253, 2009. ISSN: 1752-296X. DOI: 10.1097/MED.0b013e32832b100a.

AL-SUWAYEH, Saleh A.; TAHA, Ehab I.; AL-QAHTANI, Fahad M.; AHMED, Mahrous O.; BADRAN, Mohamed M. Evaluation of skin permeation and analgesic activity effects of carbopol lornoxicam topical gels containing penetration enhancer. **TheScientificWorldJournal**, [S. l.], v. 2014, p. 127495, 2014. ISSN: 1537-744X. DOI: 10.1155/2014/127495.

ANDRADE, Jayanaraian F. M.; CUNHA-FILHO, Marcilio; GELFUSO, Guilherme M.; GRATIERI, Tais. Iontophoresis for the cutaneous delivery of nanoentrapped drugs. **Expert Opinion on Drug Delivery**, [S. l.], v. 20, n. 6, p. 785–798, 2023. ISSN: 1742-5247, 1744-

7593. DOI: 10.1080/17425247.2023.2209719.

ANDRADE, Lígia Marquez; DE FÁTIMA REIS, Carolina; MAIONE-SILVA, Lorena; ANJOS, Jorge Luiz V.; ALONSO, Antonio; SERPA, Rafael Caixeta; MARRETO, Ricardo Neves; LIMA, Eliana Martins; TAVEIRA, Stéphânia Fleury. Impact of lipid dynamic behavior on physical stability, in vitro release and skin permeation of genistein-loaded lipid nanoparticles. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, [S. l.], v. 88, n. 1, p. 40–47, 2014. ISSN: 09396411. DOI: 10.1016/j.ejpb.2014.04.015.

ANGELO, T.; BARBALHO, G. N.; GELFUSO, G. M.; GRATIERI, T. Minoxidil topical treatment may be more efficient if applied on damp scalp in comparison with dry scalp: Minoxidil topical treatment. **Dermatologic Therapy**, [S. l.], v. 29, n. 5, p. 330–333, 2016. ISSN: 13960296. DOI: 10.1111/dth.12369.

ANGELO, Tamara et al. Effect of physical stimuli on hair follicle deposition of clobetasol-loaded Lipid Nanocarriers. **Scientific Reports**, [S. l.], v. 10, n. 1, p. 176, 2020. ISSN: 2045-2322. DOI: 10.1038/s41598-019-56760-w.

ANSELMO, Aaron C.; MITRAGOTRI, Samir. An overview of clinical and commercial impact of drug delivery systems. **Journal of Controlled Release**, [S. l.], v. 190, p. 15–28, 2014. ISSN: 01683659. DOI: 10.1016/j.jconrel.2014.03.053.

ARIF, Tasleem; DORJAY, Konchok; ADIL, Mohammad; SAMI, Marwa. Dutasteride in Androgenetic Alopecia: An Update. **Current Clinical Pharmacology**, [S. l.], v. 12, n. 1, 2017. ISSN: 15748847. DOI: 10.2174/1574884712666170310111125. Disponível em: <http://www.eurekaselect.com/150807/article>. Acesso em: 23 jan. 2024.

ASIM, Mehmood; SHAH, Rohan; SHARIF, Shawana; OUELLETTE, Samantha; SHAH, Amar; RAO, Babar. A Randomized Control Trial Comparing the Efficacy of Platelet-Rich Plasma and 5% Topical Minoxidil for the Treatment of Androgenetic Alopecia. **Journal of drugs in dermatology: JDD**, [S. l.], v. 22, n. 9, p. 905–909, 2023. ISSN: 1545-9616. DOI: 10.36849/JDD.7031.

AUKERMAN, Erica L.; JAFFERANY, Mohammad. The psychological consequences of androgenetic alopecia: A systematic review. **Journal of Cosmetic Dermatology**, [S. l.], v. 22, n. 1, p. 89–95, 2023. ISSN: 1473-2165. DOI: 10.1111/jocd.14983.

BAJPAI, A. K.; CHOUBEY, Jyoti. Design of gelatin nanoparticles as swelling controlled delivery system for chloroquine phosphate. **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**, [S. l.], v. 17, n. 4, p. 345–358, 2006. ISSN: 0957-4530, 1573-4838. DOI: 10.1007/s10856-006-8235-9.

BAJZA, Ágnes; KOCSIS, Dorottya; BEREZVAI, Orsolya; LAKI, András József; LUKÁCS, Bence; IMRE, Tímea; IVÁN, Kristóf; SZABÓ, Pál; ERDŐ, Franciska. Verification of P-Glycoprotein Function at the Dermal Barrier in Diffusion Cells and Dynamic “Skin-On-A-Chip” Microfluidic Device. **Pharmaceutics**, [S. l.], v. 12, n. 9, p. 804, 2020. ISSN: 1999-4923. DOI: 10.3390/pharmaceutics12090804.

BAKER, Paola; HUANG, Christina; RADİ, Rakan; MOLL, Samara B.; JULES, Emmanuela; ARBİSER, Jack L. Skin Barrier Function: The Interplay of Physical, Chemical, and Immunologic Properties. *Cells*, [S. l.], v. 12, n. 23, p. 2745, 2023. ISSN: 2073-4409. DOI: 10.3390/cells12232745.

BEHRANGI, Elham; BAROUGH, Mahdiah Shokrollahi; KHORAMDAD, Malihe; HEJAZI, Pardis; KOLTAPÉH, Masoud Pourghahramani; GOODARZI, Azadeh. Efficacy and safety of tofacitinib for treatment of alopecia areata in children: A systematic review and meta-analysis. *Journal of Cosmetic Dermatology*, [S. l.], v. 21, n. 12, p. 6644–6652, 2022. ISSN: 1473-2130, 1473-2165. DOI: 10.1111/jocd.15425.

BIEBER, T. et al. Pooled safety analysis of baricitinib in adult patients with atopic dermatitis from 8 randomized clinical trials. *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology*, [S. l.], v. 35, n. 2, p. 476–485, 2021. ISSN: 0926-9959, 1468-3083. DOI: 10.1111/jdv.16948.

BLUME-PEYTAVI, Ulrike; HILLMANN, Kathrin; DIETZ, Ekkehart; CANFIELD, Douglas; GARCIA BARTELS, Natalie. A randomized, single-blind trial of 5% minoxidil foam once daily versus 2% minoxidil solution twice daily in the treatment of androgenetic alopecia in women. *Journal of the American Academy of Dermatology*, [S. l.], v. 65, n. 6, p. 1126–1134.e2, 2011. ISSN: 01909622. DOI: 10.1016/j.jaad.2010.09.724.

BOMMANNAN, D.; POTTS, Russell O.; GUY, Richard H. Examination of the effect of ethanol on human stratum corneum in vivo using infrared spectroscopy. *Journal of Controlled Release*, [S. l.], v. 16, n. 3, p. 299–304, 1991. ISSN: 01683659. DOI: 10.1016/0168-3659(91)90006-Y.

BUSANELLO, Estela B.; TURCATEL, Elias. Androgenic alopecia and dutasteride in hair mesotherapy: A short review. *Our Dermatology Online*, [S. l.], v. 9, n. 1, p. 75–79, 2018. ISSN: 20819390. DOI: 10.7241/ourd.20181.22.

CAMERA, Emanuela; LUDOVICI, Matteo; GALANTE, Marisa; SINAGRA, Jo-Linda; PICARDO, Mauro. Comprehensive analysis of the major lipid classes in sebum by rapid resolution high-performance liquid chromatography and electrospray mass spectrometry. *Journal of Lipid Research*, [S. l.], v. 51, n. 11, p. 3377–3388, 2010. ISSN: 00222275. DOI: 10.1194/jlr.D008391.

CARDOSO, Camila Oliveira; TOLENTINO, Seila; GRATIERI, Tais; CUNHA-FILHO, Marcilio; LOPEZ, Renata; GELFUSO, Guilherme. Topical Treatment for Scarring and Non-Scarring Alopecia: An Overview of the Current Evidence. *Clinical, Cosmetic and Investigational Dermatology*, [S. l.], v. Volume 14, p. 485–499, 2021. ISSN: 1178-7015. DOI: 10.2147/CCID.S284435.

CÁZARES-DELGADILLO, J.; NAIK, A.; GANEM-RONDERO, A.; QUINTANAR-GUERRERO, D.; KALIA, Y. N. Transdermal Delivery of Cytochrome C—A 12.4 kDa Protein—Across Intact Skin by Constant-Current Iontophoresis. *Pharmaceutical Research*, [S. l.], v. 24, n. 7, p. 1360–1368, 2007. ISSN: 0724-8741, 1573-904X. DOI: 10.1007/s11095-007-9294-4.

CÁZARES-DELGADILLO, Jennyfer; GANEM-RONDERO, Adriana; MERINO, Virginia; KALIA, Yogeshvar N. Controlled transdermal iontophoresis for poly-pharmacotherapy: Simultaneous delivery of granisetron, metoclopramide and dexamethasone sodium phosphate in vitro and in vivo. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, [S. l.], v. 85, p. 31–38, 2016. ISSN: 09280987. DOI: 10.1016/j.ejps.2016.01.027.

CEVC, Gregor; BLUME, Gabriele; SCHÄTZLEIN, Andreas; GEBAUER, Dieter; PAUL, Amla. The skin: a pathway for systemic treatment with patches and lipid-based agent carriers. **Advanced Drug Delivery Reviews**, [S. l.], v. 18, n. 3, p. 349–378, 1996. ISSN: 0169409X. DOI: 10.1016/0169-409X(95)00091-K.

CHI, Woo; WU, Eleanor; MORGAN, Bruce A. Dermal papilla cell number specifies hair size, shape and cycling and its reduction causes follicular decline. **Development**, [S. l.], v. 140, n. 8, p. 1676–1683, 2013. ISSN: 1477-9129, 0950-1991. DOI: 10.1242/dev.090662.

CHRISTMANN, Rebekka et al. Tofacitinib Loaded Squalenyl Nanoparticles for Targeted Follicular Delivery in Inflammatory Skin Diseases. **Pharmaceutics**, [S. l.], v. 12, n. 12, p. 1131, 2020. ISSN: 1999-4923. DOI: 10.3390/pharmaceutics12121131.

CLARK, Richard V.; HERMANN, David J.; CUNNINGHAM, Glenn R.; WILSON, Timothy H.; MORRILL, Betsy B.; HOBBS, Stuart. Marked Suppression of Dihydrotestosterone in Men with Benign Prostatic Hyperplasia by Dutasteride, a Dual 5 α -Reductase Inhibitor. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, [S. l.], v. 89, n. 5, p. 2179–2184, 2004. ISSN: 0021-972X, 1945-7197. DOI: 10.1210/jc.2003-030330.

COTSARELIS, George. Epithelial Stem Cells: A Folliculocentric View. **Journal of Investigative Dermatology**, [S. l.], v. 126, n. 7, p. 1459–1468, 2006. ISSN: 0022202X. DOI: 10.1038/sj.jid.5700376.

COURTS, A. The *N*-terminal amino acid residues of gelatin. 2. Thermal degradation. **Biochemical Journal**, [S. l.], v. 58, n. 1, p. 74–79, 1954. ISSN: 0306-3283. DOI: 10.1042/bj0580074.

CROOK, K.; STEVENSON, Bj; DUBOUCHET, M.; PORTEOUS, Dj. Inclusion of cholesterol in DOTAP transfection complexes increases the delivery of DNA to cells in vitro in the presence of serum. **Gene Therapy**, [S. l.], v. 5, n. 1, p. 137–143, 1998. ISSN: 0969-7128, 1476-5462. DOI: 10.1038/sj.gt.3300554.

CULLANDER, Christopher; GUY, Richard H. Sites of Iontophoretic Current Flow Into the Skin: Identification and Characterization with the Vibrating Probe Electrode. **Journal of Investigative Dermatology**, [S. l.], v. 97, n. 1, p. 55–64, 1991. ISSN: 0022202X. DOI: 10.1111/1523-1747.ep12478060.

CURDY, Catherine; KALIA, Yogeshvar N.; GUY, Richard H. Post-iontophoresis recovery of human skin impedance in vivo. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, [S. l.], v. 53, n. 1, p. 15–21, 2002. ISSN: 09396411. DOI: 10.1016/S0939-6411(01)00216-8.

DAI, Ying-Xiu; CHEN, Chih-Chiang. Tofacitinib therapy for children with severe alopecia areata. **Journal of the American Academy of Dermatology**, [S. l.], v. 80, n. 4, p. 1164–1166, 2019. ISSN: 01909622. DOI: 10.1016/j.jaad.2018.12.041.

DANAEI, M.; DEHGHANKHOLD, M.; ATAEL, S.; HASANZADEH DAVARANI, F.; JAVANMARD, R.; DOKHANI, A.; KHORASANI, S.; MOZAFARI, M. Impact of Particle Size and Polydispersity Index on the Clinical Applications of Lipidic Nanocarrier Systems. **Pharmaceutics**, [S. l.], v. 10, n. 2, p. 57, 2018. ISSN: 1999-4923. DOI: 10.3390/pharmaceutics10020057.

DARADE, Aditya R.; LAPTEVA, Maria; HOFFMANN, Thomas; MANDLER, Markus; SCHNEEBERGER, Achim; KALIA, Yogeshvar N. Effect of mRNA Delivery Modality and Formulation on Cutaneous mRNA Distribution and Downstream eGFP Expression. **Pharmaceutics**, [S. l.], v. 14, n. 1, p. 151, 2022. ISSN: 1999-4923. DOI: 10.3390/pharmaceutics14010151.

DE LACHARRIÈRE, Olivier; DELOCHE, Claire; MISCIALI, Cosimo; PIRACCINI, Bianca Maria; VINCENZI, Colombina; BASTIEN, Philippe; TARDY, Isabelle; BERNARD, Bruno A.; TOSTI, Antonella. Hair Diameter Diversity: A Clinical Sign Reflecting the Follicle Miniaturization. **Archives of Dermatology**, [S. l.], v. 137, n. 5, p. 641–646, 2001. ISSN: 0003-987X.

DE SÁ, Fernando Augusto Pires; TAVEIRA, Stephânia Fleury; GELFUSO, Guilherme Martins; LIMA, Eliana Martins; GRATIERI, Taís. Liposomal voriconazole (VOR) formulation for improved ocular delivery. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, [S. l.], v. 133, p. 331–338, 2015. ISSN: 09277765. DOI: 10.1016/j.colsurfb.2015.06.036.

DEL RÍO-SANCHO, Sergio; CROS, Cecile; COUTAZ, Bethsabée; CUENDET, Muriel; KALIA, Yogeshvar N. Cutaneous iontophoresis of μ -conotoxin CnIIIC—A potent Na V 1.4 antagonist with analgesic, anaesthetic and myorelaxant properties. **International Journal of Pharmaceutics**, [S. l.], v. 518, n. 1–2, p. 59–65, 2017. ISSN: 03785173. DOI: 10.1016/j.ijpharm.2016.12.054.

DIAS, Gabriela Hermida; CÁUPER, Fábio Raphael Moreira; CORRÊA, Thaís Cristina Ferreira; GONDIM, Ramires; CRUZ, Katia Santana. Isolamento e caracterização de *Candida* sp. no mamilo de lactantes de uma maternidade da rede pública na cidade de Manaus. **Scientia Amazonia**, [S. l.], p. 9, 2018.

DOS SANTOS, Giselly Almeida et al. Besifloxacin liposomes with positively charged additives for an improved topical ocular delivery. **Scientific Reports**, [S. l.], v. 10, n. 1, p. 19285, 2020. ISSN: 2045-2322. DOI: 10.1038/s41598-020-76381-y.

DUBEY, S.; KALIA, Y. N. Non-invasive iontophoretic delivery of enzymatically active ribonuclease A (13.6kDa) across intact porcine and human skins. **Journal of Controlled Release**, [S. l.], v. 145, n. 3, p. 203–209, 2010. ISSN: 01683659. DOI: 10.1016/j.jconrel.2010.04.020.

DUBEY, S.; KALIA, Y. N. Electrically-assisted delivery of an anionic protein across intact skin: Cathodal iontophoresis of biologically active ribonuclease T1. **Journal of Controlled Release**, [S. l.], v. 152, n. 3, p. 356–362, 2011. ISSN: 01683659. DOI: 10.1016/j.jconrel.2011.03.004.

DUBEY, S.; PEROZZO, R.; SCAPOZZA, L.; KALIA, Y. N. Noninvasive Transdermal Iontophoretic Delivery of Biologically Active Human Basic Fibroblast Growth Factor. **Molecular Pharmaceutics**, [S. l.], v. 8, n. 4, p. 1322–1331, 2011. ISSN: 1543-8384, 1543-8392. DOI: 10.1021/mp200125j.

ELZOGHBY, Ahmed O. Gelatin-based nanoparticles as drug and gene delivery systems: Reviewing three decades of research. **Journal of Controlled Release**, [S. l.], v. 172, n. 3, p. 1075–1091, 2013. ISSN: 01683659. DOI: 10.1016/j.jconrel.2013.09.019.

ENSHELL-SEIJFFERS, David; LINDON, Catherine; MORGAN, Bruce A. The serine protease Corin is a novel modifier of the agouti pathway. **Development**, [S. l.], v. 135, n. 2, p. 217–225, 2008. ISSN: 1477-9129, 0950-1991. DOI: 10.1242/dev.011031.

ERICKSON, Harold P. Size and Shape of Protein Molecules at the Nanometer Level Determined by Sedimentation, Gel Filtration, and Electron Microscopy. **Biological Procedures Online**, [S. l.], v. 11, n. 1, p. 32–51, 2009. ISSN: 1480-9222. DOI: 10.1007/s12575-009-9008-x.

EUN, Hee Chul et al. Efficacy, safety, and tolerability of dutasteride 0.5 mg once daily in male patients with male pattern hair loss: A randomized, double-blind, placebo-controlled, phase III study. **Journal of the American Academy of Dermatology**, [S. l.], v. 63, n. 2, p. 252–258, 2010. ISSN: 01909622. DOI: 10.1016/j.jaad.2009.09.018.

FANG, Chia-Lang; ALJUFFALI, Ibrahim A.; LI, Yi-Ching; FANG, Jia-You. Delivery and targeting of nanoparticles into hair follicles. **Therapeutic Delivery**, [S. l.], v. 5, n. 9, p. 991–1006, 2014. ISSN: 2041-5990, 2041-6008. DOI: 10.4155/tde.14.61.

FEINGOLD, Kenneth R.; ELIAS, Peter M. Role of lipids in the formation and maintenance of the cutaneous permeability barrier. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids**, [S. l.], v. 1841, n. 3, p. 280–294, 2014. ISSN: 13881981. DOI: 10.1016/j.bbalip.2013.11.007.

FERREIRA, Sineida Berbert; FERREIRA, Rachel Berbert; SCHEINBERG, Morton Aaron. Topical tofacitinib in treatment of alopecia areata. **Einstein (São Paulo)**, [S. l.], v. 18, p. eAI5452, 2020. ISSN: 1679-4508, 2317-6385. DOI: 10.31744/einstein_journal/2020AI5452.

FERREIRA-NUNES, Ricardo; SILVA, Sandra Márcia Mazutti Da; SOUZA, Paulo Eduardo Narcizo De; MAGALHÃES, Pérola de Oliveira; CUNHA-FILHO, Marcílio; GRATIERI, Taís; GELFUSO, Guilherme Martins. Incorporation of Eugenia dysenterica extract in microemulsions preserves stability, antioxidant effect and provides enhanced cutaneous permeation. **Journal of Molecular Liquids**, [S. l.], v. 265, p. 408–415, 2018. ISSN: 01677322. DOI: 10.1016/j.molliq.2018.06.023.

FLORY, Paul J.; WEAVER, Edwin S. Helix [UNK] Coil Transitions in Dilute Aqueous Collagen Solutions ¹. **Journal of the American Chemical Society**, [S. l.], v. 82, n. 17, p. 4518–4525, 1960. ISSN: 0002-7863, 1520-5126. DOI: 10.1021/ja01502a018.

GARG, Varun; SINGH, Harmanpreet; BIMBRAWH, Sneha; SINGH, Sachin Kumar; GULATI, Monica; VAIDYA, Yogyata; KAUR, Prabhjot. Ethosomes and Transfersomes: Principles, Perspectives and Practices. **Current Drug Delivery**, [S. l.], v. 14, n. 5, 2017. ISSN: 15672018. DOI: 10.2174/1567201813666160520114436. Disponível em: <http://www.eurekaselect.com/142368/article>. Acesso em: 3 set. 2024.

GELFUSO, Guilherme Martins; FIGUEIREDO, Fábio Vasconcelos; GRATIERI, Taís; LOPEZ, Renata Fonseca Vianna. The Effects of pH and Ionic Strength on Topical Delivery of a Negatively Charged Porphyrin (TPPS4). **Journal of Pharmaceutical Sciences**, [S. l.], v. 97, n. 10, p. 4249–4257, 2008. ISSN: 00223549. DOI: 10.1002/jps.21295.

GELFUSO, Guilherme Martins; GRATIERI, Tais; DELGADO-CHARRO, M. Begoña; GUY, Richard H.; VIANNA LOPEZ, Renata Fonseca. Iontophoresis-Targeted, Follicular Delivery of Minoxidil Sulfate for the Treatment of Alopecia. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, [S. l.], v. 102, n. 5, p. 1488–1494, 2013. ISSN: 00223549. DOI: 10.1002/jps.23485.

GOEL, Anukrati; PENDLINGTON, Ruth; GLAVIN, Stephen; CHEN, Tao; BELSEY, Natalie A. Characterisation of skin penetration pathways using stimulated Raman scattering microscopy. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, [S. l.], v. 204, p. 114518, 2024. ISSN: 09396411. DOI: 10.1016/j.ejpb.2024.114518.

GOYAL, Ritu; MACRI, Lauren K.; KAPLAN, Hilton M.; KOHN, Joachim. Nanoparticles and nanofibers for topical drug delivery. **Journal of Controlled Release**, [S. l.], v. 240, p. 77–92, 2016. ISSN: 01683659. DOI: 10.1016/j.jconrel.2015.10.049.

GRATIERI, Taís; KALIA, Yogeshvar N. Mathematical models to describe iontophoretic transport in vitro and in vivo and the effect of current application on the skin barrier. **Advanced Drug Delivery Reviews**, [S. l.], v. 65, n. 2, p. 315–329, 2013. ISSN: 0169409X. DOI: 10.1016/j.addr.2012.04.012.

GRATIERI, Taís; KALIA, Yogeshvar N. Iontophoresis in Penetration Enhancement. Em: DRAGIĆEVIĆ, Nina; MAIBACH, Howard (eds.). **Percutaneous Absorption**. 5. ed., Boca Raton: CRC Press, 2021. p. 667–686. ISBN: 978-0-429-20297-1. DOI: 10.1201/9780429202971-46. Disponível em: <https://www.taylorfrancis.com/books/9780429202971/chapters/10.1201/9780429202971-46>. Acesso em: 10 fev. 2023.

GRATIERI, Taís; ZARHLOULE, Rhita; DUBEY, Sachin; KALIA, Yogeshvar N. The influence of skin barrier impairment on the iontophoretic transport of low and high molecular weight permeants. **International Journal of Pharmaceutics**, [S. l.], v. 602, p. 120607, 2021. ISSN: 03785173. DOI: 10.1016/j.ijpharm.2021.120607.

GUBELIN HARCHA, Walter; BARBOZA MARTÍNEZ, Julia; TSAI, Tsen-Fang;

KATSUOKA, Kensei; KAWASHIMA, Makoto; TSUBOI, Ryoji; BARNES, Allison; FERRON-BRADY, Geraldine; CHETTY, Dushen. A randomized, active- and placebo-controlled study of the efficacy and safety of different doses of dutasteride versus placebo and finasteride in the treatment of male subjects with androgenetic alopecia. **Journal of the American Academy of Dermatology**, [S. l.], v. 70, n. 3, p. 489- 498.e3, 2014. ISSN: 01909622. DOI: 10.1016/j.jaad.2013.10.049.

HEARD, Charles M.; KUNG, Denise; THOMAS, Chris P. Skin penetration enhancement of mefenamic acid by ethanol and 1,8-cineole can be explained by the ‘pull’ effect. **International Journal of Pharmaceutics**, [S. l.], v. 321, n. 1–2, p. 167–170, 2006. ISSN: 03785173. DOI: 10.1016/j.ijpharm.2006.05.018.

HEARD, Charles M.; SCREEN, Cerian. Probing the permeation enhancement of mefenamic acid by ethanol across full-thickness skin, heat-separated epidermal membrane and heat-separated dermal membrane. **International Journal of Pharmaceutics**, [S. l.], v. 349, n. 1–2, p. 323–325, 2008. ISSN: 03785173. DOI: 10.1016/j.ijpharm.2007.08.006.

HERMAN, Anna; HERMAN, Andrzej P. Essential oils and their constituents as skin penetration enhancer for transdermal drug delivery: a review. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, [S. l.], v. 67, n. 4, p. 473–485, 2015. ISSN: 2042-7158, 0022-3573. DOI: 10.1111/jphp.12334.

HERZ-RUELAS, Maira Elizabeth; ÁLVAREZ-VILLALOBOS, Neri Alejandro; MILLÁN-ALANÍS, Juan Manuel; DE LEÓN-GUTIÉRREZ, Humberto; OCAMPO-GARZA, Sonia Sofía; GÓMEZ-FLORES, Minerva; GRIMALT, Ramón. Efficacy of Intralesional and Oral Dutasteride in the Treatment of Androgenetic Alopecia: A Systematic Review. **Skin Appendage Disorders**, [S. l.], v. 6, n. 6, p. 338–345, 2020. ISSN: 2296-9195. DOI: 10.1159/000510697.

HIRSHBURG, Jason M.; KELSEY, Petra A.; THERRIEN, Chelsea A.; GAVINO, A. Carlo; REICHENBERG, Jason S. Adverse Effects and Safety of 5-alpha Reductase Inhibitors (Finasteride, Dutasteride): A Systematic Review. **The Journal of Clinical and Aesthetic Dermatology**, [S. l.], v. 9, n. 7, p. 56–62, 2016. ISSN: 1941-2789.

HONARI, Golar; MAIBACH, Howard. Skin Structure and Function. *Em: Applied Dermatotoxicology*. [s.l.] : Elsevier, 2014. p. 1–10. ISBN: 978-0-12-420130-9. DOI: 10.1016/B978-0-12-420130-9.00001-3. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780124201309000013>. Acesso em: 10 jan. 2024.

HUANG, Jundong; LI, Tingting; TAN, Zixin; TANG, Yan; LI, Ji; LIU, Fenfang; SHI, Wei. Effectiveness of Tofacitinib in Pre-adolescent Alopecia Areata: A Retrospective Case Series and Literature Review. **Acta Dermato-Venereologica**, [S. l.], v. 103, p. adv13418, 2023. ISSN: 1651-2057, 0001-5555. DOI: 10.2340/actadv.v103.13418.

HUNG, Wei-Chin; LEE, Ming-Tao; CHEN, Fang-Yu; HUANG, Huey W. The Condensing Effect of Cholesterol in Lipid Bilayers. **Biophysical Journal**, [S. l.], v. 92, n. 11, p. 3960–3967, 2007. ISSN: 00063495. DOI: 10.1529/biophysj.106.099234.

HUNT, Nigel; MCHALE, Sue. The psychological impact of alopecia. **BMJ**, [S. l.], v. 331, n. 7522, p. 951–953, 2005. ISSN: 0959-8138, 1468-5833. DOI: 10.1136/bmj.331.7522.951.

IBRAHIM, Omer; BAYART, Cheryl B.; HOGAN, Sara; PILIANG, Melissa; BERGFELD, Wilma F. Treatment of Alopecia Areata With Tofacitinib. **JAMA dermatology**, [S. l.], v. 153, n. 6, p. 600–602, 2017. ISSN: 2168-6084. DOI: 10.1001/jamadermatol.2017.0001.

JAFARI, Atoosa; DANESHAMOUZ, Saeid; GHASEMIYEH, Parisa; MOHAMMADI-SAMANI, Soliman. Ethosomes as dermal/transdermal drug delivery systems: applications, preparation and characterization. **Journal of Liposome Research**, [S. l.], v. 33, n. 1, p. 34–52, 2023. ISSN: 0898-2104, 1532-2394. DOI: 10.1080/08982104.2022.2085742.

JAIN, Sanjay K.; VERMA, Amit; JAIN, Ankit; HURKAT, Pooja. Transfollicular drug delivery: current perspectives. **Research and Reports in Transdermal Drug Delivery**, [S. l.], p. 1, 2016. ISSN: 2253-1580. DOI: 10.2147/RRTD.S75809.

JEONG, Woo Yeup; KIM, Sodam; LEE, So Yun; LEE, Hyeseon; HAN, Dong Wook; YANG, Seung Yun; KIM, Ki Su. Transdermal delivery of Minoxidil using HA-PLGA nanoparticles for the treatment in alopecia. **Biomaterials Research**, [S. l.], v. 23, n. 1, p. 16, 2019. ISSN: 2055-7124. DOI: 10.1186/s40824-019-0164-z.

JERJEN, Rebekka; MEAH, Nekma; TRINDADE DE CARVALHO, Lara; WALL, Dmitri; EISMAN, Samantha; SINCLAIR, Rodney. Treatment of alopecia areata in pre-adolescent children with oral tofacitinib: A retrospective study. **Pediatric Dermatology**, [S. l.], v. 38, n. 1, p. 103–108, 2021. ISSN: 0736-8046, 1525-1470. DOI: 10.1111/pde.14422.

JHA, Sheetal; K. SHARMA, Pramod; MALVIYA, Rishabha. Liposomal Drug Delivery System for Cancer Therapy: Advancement and Patents. **Recent Patents on Drug Delivery & Formulation**, [S. l.], v. 10, n. 3, p. 177–183, 2016. ISSN: 18722113. DOI: 10.2174/1872211310666161004155757.

JOVANOVIĆ, Aleksandra A.; BALANČ, Bojana D.; OTA, Ajda; AHLIN GRABNAR, Pegi; DJORDJEVIĆ, Verica B.; ŠAVIKIN, Katarina P.; BUGARSKI, Branko M.; NEDOVIĆ, Viktor A.; POKLAR ULRIH, Nataša. Comparative Effects of Cholesterol and β -Sitosterol on the Liposome Membrane Characteristics. **European Journal of Lipid Science and Technology**, [S. l.], v. 120, n. 9, p. 1800039, 2018. ISSN: 1438-7697, 1438-9312. DOI: 10.1002/ejlt.201800039.

KADDAH, Samar; KHREICH, Nathalie; KADDAH, Fouad; CHARCOSSET, Catherine; GREIGE-GERGES, Hélène. Cholesterol modulates the liposome membrane fluidity and permeability for a hydrophilic molecule. **Food and Chemical Toxicology**, [S. l.], v. 113, p. 40–48, 2018. ISSN: 02786915. DOI: 10.1016/j.fct.2018.01.017.

KAJIMOTO, Kazuaki; YAMAMOTO, Masahiko; WATANABE, Misuzu; KIGASAWA, Kaoru; KANAMURA, Kiyoshi; HARASHIMA, Hideyoshi; KOGURE, Kentaro. Noninvasive and persistent transfollicular drug delivery system using a combination of liposomes and iontophoresis. **International Journal of Pharmaceutics**, [S. l.], v. 403, n. 1–2, p. 57–65, 2011.

ISSN: 03785173. DOI: 10.1016/j.ijpharm.2010.10.021.

KALARIA, Dhaval R.; SINGHAL, Mayank; PATRAVALE, Vandana; MERINO, Virginia; KALIA, Yogeshvar N. Simultaneous controlled iontophoretic delivery of pramipexole and rasagiline in vitro and in vivo: Transdermal polypharmacy to treat Parkinson's disease. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, [S. l.], v. 127, p. 204–212, 2018. ISSN: 09396411. DOI: 10.1016/j.ejpb.2018.02.031.

KALIA, Yogeshvar N.; NAIK, Aarti; GARRISON, James; GUY, Richard H. Iontophoretic drug delivery. **Advanced Drug Delivery Reviews**, [S. l.], v. 56, n. 5, p. 619–658, 2004. ISSN: 0169409X. DOI: 10.1016/j.addr.2003.10.026.

KALIA, Yogeshvar N.; NONATO, Lourdes B.; GUY, Richard H. The effect of iontophoresis on skin barrier integrity: non-invasive evaluation by impedance spectroscopy and transepidermal water loss. **Pharmaceutical Research**, [S. l.], v. 13, n. 6, p. 957–960, 1996. ISSN: 07248741. DOI: 10.1023/A:1016081902162.

KANITAKIS, Jean. Anatomy, histology and immunohistochemistry of normal human skin. **European journal of dermatology: EJD**, [S. l.], v. 12, n. 4, p. 390–399; quiz 400–401, 2002. ISSN: 1167-1122.

KATZER, Tatiele; LEITE JUNIOR, Ademir; BECK, Ruy; DA SILVA, Cristiane. Physiopathology and current treatments of androgenetic alopecia: Going beyond androgens and anti-androgens. **Dermatologic Therapy**, [S. l.], v. 32, n. 5, 2019. ISSN: 1396-0296, 1529-8019. DOI: 10.1111/dth.13059. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/dth.13059>. Acesso em: 10 jan. 2024.

KELLY, Yanna; BLANCO, Aline; TOSTI, Antonella. Androgenetic Alopecia: An Update of Treatment Options. **Drugs**, [S. l.], v. 76, n. 14, p. 1349–1364, 2016. ISSN: 0012-6667, 1179-1950. DOI: 10.1007/s40265-016-0629-5.

KENNEDY CRISPIN, Milène et al. Safety and efficacy of the JAK inhibitor tofacitinib citrate in patients with alopecia areata. **JCI Insight**, [S. l.], v. 1, n. 15, 2016. ISSN: 2379-3708. DOI: 10.1172/jci.insight.89776. Disponível em: <https://insight.jci.org/articles/view/89776>. Acesso em: 9 jan. 2024.

KHAN, Saeed Ahmad; SCHNEIDER, Marc. Improvement of Nanoprecipitation Technique for Preparation of Gelatin Nanoparticles and Potential Macromolecular Drug Loading: Improvement of Nanoprecipitation Technique for Preparation of Gelatin Nanoparticles **Macromolecular Bioscience**, [S. l.], v. 13, n. 4, p. 455–463, 2013. ISSN: 16165187. DOI: 10.1002/mabi.201200382.

KIBBIE, Jon; KINES, Kelsey; NORRIS, David; DUNNICK, Cory A. Oral tofacitinib for the treatment of alopecia areata in pediatric patients. **Pediatric Dermatology**, [S. l.], v. 39, n. 1, p. 31–34, 2022. ISSN: 0736-8046, 1525-1470. DOI: 10.1111/pde.14855.

KNORR, Fanny; LADEMANN, Jürgen; PATZELT, Alexa; STERRY, Wolfram; BLUME-

PEYTAVI, Ulrike; VOGT, Annika. Follicular transport route – Research progress and future perspectives. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, [S. l.], v. 71, n. 2, p. 173–180, 2009. ISSN: 09396411. DOI: 10.1016/j.ejpb.2008.11.001.

KOLARSICK, Paul A. J.; KOLARSICK, Maria Ann; GOODWIN, Carolyn. Anatomy and Physiology of the Skin: **Journal of the Dermatology Nurses' Association**, [S. l.], v. 3, n. 4, p. 203–213, 2011. ISSN: 1945-760X. DOI: 10.1097/JDN.0b013e3182274a98.

KOMMAREDDY, Sushma; SHENOY, Dinesh B.; AMIJI, Mansoor M. Gelatin Nanoparticles and Their Biofunctionalization. Em: KUMAR, Challa S. S. R. (org.). **Nanotechnologies for the Life Sciences**. 1. ed., [s.l.] : Wiley, 2003. ISBN: 978-3-527-31301-3. DOI: 10.1002/9783527610419.ntls0011. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/9783527610419.ntls0011>. Acesso em: 12 nov. 2023.

KRISHNAN, Gayathri; ROBERTS, Michael S.; GRICE, Jeffrey; ANISSIMOV, Yuri G.; MOGHIMI, Hamid R.; BENSON, Heather A. E. Iontophoretic skin permeation of peptides: an investigation into the influence of molecular properties, iontophoretic conditions and formulation parameters. **Drug Delivery and Translational Research**, [S. l.], v. 4, n. 3, p. 222–232, 2014. ISSN: 2190-393X, 2190-3948. DOI: 10.1007/s13346-013-0181-8.

LACHENMEIER, Dirk W. Safety evaluation of topical applications of ethanol on the skin and inside the oral cavity. **Journal of Occupational Medicine and Toxicology (London, England)**, [S. l.], v. 3, p. 26, 2008. ISSN: 1745-6673. DOI: 10.1186/1745-6673-3-26.

LADEMANN, J.; KNORR, F.; RICHTER, H.; JUNG, S.; MEINKE, M. C.; RÜHL, E.; ALEXIEV, U.; CALDERON, M.; PATZELT, A. Hair follicles as a target structure for nanoparticles. **Journal of Innovative Optical Health Sciences**, [S. l.], v. 08, n. 04, p. 1530004, 2015. ISSN: 1793-5458, 1793-7205. DOI: 10.1142/S1793545815300049.

LADEMANN, J.; RICHTER, H.; SCHAEFER, U. F.; BLUME-PEYTAVI, U.; TEICHMANN, A.; OTBERG, N.; STERRY, W. Hair Follicles – A Long-Term Reservoir for Drug Delivery. **Skin Pharmacology and Physiology**, [S. l.], v. 19, n. 4, p. 232–236, 2006. ISSN: 1660-5527, 1660-5535. DOI: 10.1159/000093119.

LADEMANN, Juergen; PATZELT, Alexa; RICHTER, Heike; ANTONIOU, Christina; STERRY, Wolfram; KNORR, Fanny. Determination of the cuticula thickness of human and porcine hairs and their potential influence on the penetration of nanoparticles into the hair follicles. **Journal of Biomedical Optics**, [S. l.], v. 14, n. 2, p. 021014, 2009. ISSN: 10833668. DOI: 10.1117/1.3078813.

LAPTEVA, Maria; SALLAM, Marwa A.; GOYON, Alexandre; GUILLARME, Davy; VEUTHEY, Jean-Luc; KALIA, Yogeshvar N. Non-invasive targeted iontophoretic delivery of cetuximab to skin. **Expert Opinion on Drug Delivery**, [S. l.], v. 17, n. 4, p. 589–602, 2020. ISSN: 1742-5247, 1744-7593. DOI: 10.1080/17425247.2020.1731470.

LEE, Hyun-Ji; KIM, Miri. Skin Barrier Function and the Microbiome. **International Journal**

of Molecular Sciences, [*S. l.*], v. 23, n. 21, p. 13071, 2022. ISSN: 1422-0067. DOI: 10.3390/ijms232113071.

LI, Jing; WANG, Xuling; ZHANG, Ting; WANG, Chunling; HUANG, Zhenjun; LUO, Xiang; DENG, Yihui. A review on phospholipids and their main applications in drug delivery systems. **Asian Journal of Pharmaceutical Sciences**, [*S. l.*], v. 10, n. 2, p. 81–98, 2015. ISSN: 18180876. DOI: 10.1016/j.ajps.2014.09.004.

LIMA, Ana Luiza; GRATIERI, Tais; CUNHA-FILHO, Marcilio; GELFUSO, Guilherme M. Polymeric nanocapsules: A review on design and production methods for pharmaceutical purpose. **Methods**, [*S. l.*], v. 199, p. 54–66, 2022. ISSN: 10462023. DOI: 10.1016/j.ymeth.2021.07.009.

LIN, Jessica; SAKNITE, Inga; VALDEBRAN, Manuel; BALU, Mihaela; LENTSCH, Griffin; WILLIAMS, Joshua N.; KOENIG, Karsten; TROMBERG, Bruce J.; ATANASKOVA MESINKOVSKA, Natasha. Feature characterization of scarring and non-scarring types of alopecia by multiphoton microscopy. **Lasers in Surgery and Medicine**, [*S. l.*], v. 51, n. 1, p. 95–103, 2019. ISSN: 0196-8092, 1096-9101. DOI: 10.1002/lsm.23017.

LIN, Wan-Zhen Sophie; MALMSTADT, Noah. Liposome production and concurrent loading of drug simulants by microfluidic hydrodynamic focusing. **European Biophysics Journal**, [*S. l.*], v. 48, n. 6, p. 549–558, 2019. ISSN: 0175-7571, 1432-1017. DOI: 10.1007/s00249-019-01383-2.

LIU, Li-Ping; WARIBOKO, Mary Adumo; HU, Xiao; WANG, Zi-Han; WU, Qian; LI, Yu-Mei. Factors associated with early-onset androgenetic alopecia: A scoping review. **PLOS ONE**, [*S. l.*], v. 19, n. 3, p. e0299212, 2024. ISSN: 1932-6203. DOI: 10.1371/journal.pone.0299212.

LIU, Lucy Y.; CRAIGLOW, Brittany G.; DAI, Feng; KING, Brett A. Tofacitinib for the treatment of severe alopecia areata and variants: A study of 90 patients. **Journal of the American Academy of Dermatology**, [*S. l.*], v. 76, n. 1, p. 22–28, 2017. ISSN: 01909622. DOI: 10.1016/j.jaad.2016.09.007.

LIU, Xiangli; TESTA, Bernard; FAHR, Alfred. Lipophilicity and Its Relationship with Passive Drug Permeation. **Pharmaceutical Research**, [*S. l.*], v. 28, n. 5, p. 962–977, 2010. ISSN: 0724-8741, 1573-904X. DOI: 10.1007/s11095-010-0303-7.

LOLLI, Francesca; PALLOTTI, Francesco; ROSSI, Alfredo; FORTUNA, Maria C.; CARO, Gemma; LENZI, Andrea; SANSONE, Andrea; LOMBARDO, Francesco. Androgenetic alopecia: a review. **Endocrine**, [*S. l.*], v. 57, n. 1, p. 9–17, 2017. ISSN: 1355-008X, 1559-0100. DOI: 10.1007/s12020-017-1280-y.

LV, Hongtao; ZHANG, Shubiao; WANG, Bing; CUI, Shaohui; YAN, Jie. Toxicity of cationic lipids and cationic polymers in gene delivery. **Journal of Controlled Release**, [*S. l.*], v. 114, n. 1, p. 100–109, 2006. ISSN: 01683659. DOI: 10.1016/j.jconrel.2006.04.014.

MADHESWARAN, Thiagarajan; BASKARAN, Rengarajan; THAPA, Raj Kumar; RHYU, Jeong Yeon; CHOI, Hye Yoon; KIM, Jong Oh; YONG, Chul Soon; YOO, Bong Kyu. Design and In Vitro Evaluation of Finasteride-Loaded Liquid Crystalline Nanoparticles for Topical Delivery. **AAPS PharmSciTech**, [S. l.], v. 14, n. 1, p. 45–52, 2013. ISSN: 1530-9932. DOI: 10.1208/s12249-012-9888-y.

MARAHATTA, Suchana; AGRAWAL, Sudha; ADHIKARI, Baikuntha Raj. Psychological Impact of Alopecia Areata. **Dermatology Research and Practice**, [S. l.], v. 2020, p. 1–5, 2020. ISSN: 1687-6113, 1687-6105. DOI: 10.1155/2020/8879343.

MARTINS ANDRADE, Jayanaraian F.; DA CUNHA MIRANDA, Thamires; CUNHA-FILHO, Marcílio; TAVEIRA, Stephânia Fleury; GELFUSO, Guilherme M.; GRATIERI, Taís. Iontophoresis application for drug delivery in high resistivity membranes: nails and teeth. **Drug Delivery and Translational Research**, [S. l.], 2022. ISSN: 2190-393X, 2190-3948. DOI: 10.1007/s13346-022-01244-0. Disponível em: <https://link.springer.com/10.1007/s13346-022-01244-0>. Acesso em: 17 dez. 2022.

MATOS, Breno Noronha; REIS, Thaiene Avila; GRATIERI, Taís; GELFUSO, Guilherme Martins. Chitosan nanoparticles for targeting and sustaining minoxidil sulphate delivery to hair follicles. **International Journal of Biological Macromolecules**, [S. l.], v. 75, p. 225–229, 2015. ISSN: 01418130. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2015.01.036.

MCCLEMENTS, David Julian; RAO, Jiajia. Food-Grade Nanoemulsions: Formulation, Fabrication, Properties, Performance, Biological Fate, and Potential Toxicity. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, [S. l.], v. 51, n. 4, p. 285–330, 2011. ISSN: 1040-8398, 1549-7852. DOI: 10.1080/10408398.2011.559558.

MEASE, Philip et al. Incidence of venous and arterial thromboembolic events reported in the tofacitinib rheumatoid arthritis, psoriasis and psoriatic arthritis development programmes and from real-world data. **Annals of the Rheumatic Diseases**, [S. l.], v. 79, n. 11, p. 1400–1413, 2020. ISSN: 1468-2060. DOI: 10.1136/annrheumdis-2019-216761.

MEIDAN, Victor M.; BONNER, Michael C.; MICHNIAK, Bozena B. Transfollicular drug delivery—Is it a reality? **International Journal of Pharmaceutics**, [S. l.], v. 306, n. 1–2, p. 1–14, 2005. ISSN: 03785173. DOI: 10.1016/j.ijpharm.2005.09.025.

MESSENGER, A. G.; RUNDEGREN, J. Minoxidil: mechanisms of action on hair growth. **British Journal of Dermatology**, [S. l.], v. 150, n. 2, p. 186–194, 2004. ISSN: 0007-0963, 1365-2133. DOI: 10.1111/j.1365-2133.2004.05785.x.

MONTENEGRO, Lucia; LAI, Francesco; OFFERTA, Alessia; SARPIETRO, Maria Grazia; MICICCHÈ, Lucia; MACCIONI, Anna Maria; VALENTI, Donatella; FADDA, Anna Maria. From nanoemulsions to nanostructured lipid carriers: A relevant development in dermal delivery of drugs and cosmetics. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**, [S. l.], v. 32, p. 100–112, 2016. ISSN: 17732247. DOI: 10.1016/j.jddst.2015.10.003.

NAIK, Aarti; KALIA, Yogeshvar N.; GUY, Richard H. Transdermal drug delivery:

overcoming the skin's barrier function. **Pharmaceutical Science & Technology Today**, [S. l.], v. 3, n. 9, p. 318–326, 2000. ISSN: 14615347. DOI: 10.1016/S1461-5347(00)00295-9.

NISHIMURA, Emi K. et al. Dominant role of the niche in melanocyte stem-cell fate determination. **Nature**, [S. l.], v. 416, n. 6883, p. 854–860, 2002. ISSN: 0028-0836, 1476-4687. DOI: 10.1038/416854a.

NORLÉN, Lars; LUNDBORG, Magnus; WENNERBERG, Christian; NARANGIFARD, Ali; DANEHOLT, Bertil. The Skin's Barrier: A Cryo-EM Based Overview of its Architecture and Stepwise Formation. **Journal of Investigative Dermatology**, [S. l.], v. 142, n. 2, p. 285–292, 2022. ISSN: 0022202X. DOI: 10.1016/j.jid.2021.06.037.

NSAIRAT, Hamdi; KHATER, Dima; SAYED, Usama; ODEH, Fadwa; AL BAWAB, Abeer; ALSHAER, Walhan. Liposomes: structure, composition, types, and clinical applications. **Heliyon**, [S. l.], v. 8, n. 5, p. e09394, 2022. ISSN: 24058440. DOI: 10.1016/j.heliyon.2022.e09394.

OBATA, Yasuko; TAKAYAMA, Kozo; MAITANI, Yoshie; MACHIDA, Yoshiharu; NAGAI, Tsuneji. Effect of ethanol on skin permeation of nonionized and ionized diclofenac. **International Journal of Pharmaceutics**, [S. l.], v. 89, n. 3, p. 191–198, 1993. ISSN: 03785173. DOI: 10.1016/0378-5173(93)90243-9.

OLIVEIRA, Paula M.; ALENCAR-SILVA, Thuany; PIRES, Felipe Q.; CUNHA-FILHO, Marcilio; GRATIERI, Tais; CARVALHO, Juliana Lott; GELFUSO, Guilherme M. Nanostructured lipid carriers loaded with an association of minoxidil and latanoprost for targeted topical therapy of alopecia. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, [S. l.], v. 172, p. 78–88, 2022. ISSN: 09396411. DOI: 10.1016/j.ejpb.2022.02.003.

OLSEN, Elise A.; DUNLAP, Frank E.; FUNICELLA, Toni; KOPERSKI, Judith A.; SWINEHART, James M.; TSCHEN, Eduardo H.; TRANCIK, Ronald J. A randomized clinical trial of 5% topical minoxidil versus 2% topical minoxidil and placebo in the treatment of androgenetic alopecia in men. **Journal of the American Academy of Dermatology**, [S. l.], v. 47, n. 3, p. 377–385, 2002. ISSN: 01909622. DOI: 10.1067/mjd.2002.124088.

OLSEN, Elise A.; HORDINSKY, Maria; WHITING, David; STOUGH, Dow; HOBBS, Stuart; ELLIS, Melissa L.; WILSON, Timothy; RITTMASER, Roger S. The importance of dual 5 α -reductase inhibition in the treatment of male pattern hair loss: Results of a randomized placebo-controlled study of dutasteride versus finasteride. **Journal of the American Academy of Dermatology**, [S. l.], v. 55, n. 6, p. 1014–1023, 2006. ISSN: 01909622. DOI: 10.1016/j.jaad.2006.05.007.

OSSADNIK, M.; CZAICA, V.; TEICHMANN, A.; STERRY, W.; TIETZ, H. -J.; LADEMANN, J.; KOCH, S. Differential stripping: introduction of a method to show the penetration of topically applied antifungal substances into the hair follicles. **Mycoses**, [S. l.], v. 50, n. 6, p. 457–462, 2007. ISSN: 0933-7407, 1439-0507. DOI: 10.1111/j.1439-0507.2007.01415.x.

OYARZÚN, Pablo; GALLARDO-TOLEDO, Eduardo; MORALES, Javier; ARRIAGADA, Francisco. Transfersomes as Alternative Topical Nanodosage Forms for The Treatment of Skin Disorders. **Nanomedicine**, [S. l.], v. 16, n. 27, p. 2465–2489, 2021. ISSN: 1743-5889, 1748-6963. DOI: 10.2217/nmm-2021-0335.

PAIVA-SANTOS, Ana Cláudia; SILVA, Ana Luísa; GUERRA, Catarina; PEIXOTO, Diana; PEREIRA-SILVA, Miguel; ZEINALI, Mahdi; MASCARENHAS-MELO, Filipa; CASTRO, Ricardo; VEIGA, Francisco. Ethosomes as Nanocarriers for the Development of Skin Delivery Formulations. **Pharmaceutical Research**, [S. l.], v. 38, n. 6, p. 947–970, 2021. ISSN: 0724-8741, 1573-904X. DOI: 10.1007/s11095-021-03053-5.

PANG, Xuan; HAN, Song; ZHENG, Kang; JIANG, Liu; WANG, Jianping; QIAN, Shaosong. Cellulose nanocrystal-stabilized Pickering emulsion gels as vehicles for follicular delivery of minoxidil. **International Journal of Biological Macromolecules**, [S. l.], v. 277, p. 134297, 2024. ISSN: 01418130. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2024.134297.

PANTELEYEV, Andrey A. Functional anatomy of the hair follicle: The Secondary Hair Germ. **Experimental Dermatology**, [S. l.], v. 27, n. 7, p. 701–720, 2018. ISSN: 0906-6705, 1600-0625. DOI: 10.1111/exd.13666.

PATZELT, Alexa; LADEMANN, Juergen. Drug delivery to hair follicles. **Expert Opinion on Drug Delivery**, [S. l.], v. 10, n. 6, p. 787–797, 2013. ISSN: 1742-5247, 1744-7593. DOI: 10.1517/17425247.2013.776038.

PATZELT, Alexa; LADEMANN, Juergen. Recent advances in follicular drug delivery of nanoparticles. **Expert Opinion on Drug Delivery**, [S. l.], v. 17, n. 1, p. 49–60, 2020. ISSN: 1742-5247, 1744-7593. DOI: 10.1080/17425247.2020.1700226.

PATZELT, Alexa; RICHTER, Heike; KNORR, Fanny; SCHÄFER, Ulrich; LEHR, Claus-Michael; DÄHNE, Lars; STERRY, Wolfram; LADEMANN, Juergen. Selective follicular targeting by modification of the particle sizes. **Journal of Controlled Release**, [S. l.], v. 150, n. 1, p. 45–48, 2011. ISSN: 01683659. DOI: 10.1016/j.jconrel.2010.11.015.

PEPIC, Ivan; HAFNER, Anita; LOVRIC, Jasmina; PERINA LAKOS, Gorana. Nanotherapeutics in the EU: an overview on current state and future directions. **International Journal of Nanomedicine**, [S. l.], p. 1005, 2014. ISSN: 1178-2013. DOI: 10.2147/IJN.S55359.

PEREIRA, Máira N.; SCHULTE, Heidi L.; DUARTE, Natane; LIMA, Eliana M.; SÁ-BARRETO, Livia L.; GRATIERI, Tais; GELFUSO, Guilherme M.; CUNHA-FILHO, Marcilio S. S. Solid effervescent formulations as new approach for topical minoxidil delivery. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, [S. l.], v. 96, p. 411–419, 2017. ISSN: 09280987. DOI: 10.1016/j.ejps.2016.10.016.

PEREIRA, Máira N.; TOLENTINO, Seila; PIRES, Felipe Q.; ANJOS, Jorge L. V.; ALONSO, Antonio; GRATIERI, Tais; CUNHA-FILHO, Marcilio; GELFUSO, Guilherme M. Nanostructured lipid carriers for hair follicle-targeted delivery of clindamycin and rifampicin

to hidradenitis suppurativa treatment. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, [S. l.], v. 197, p. 111448, 2021. ISSN: 09277765. DOI: 10.1016/j.colsurfb.2020.111448.

PHATALE, Vivek; VAIPHEI, Klaudi K.; JHA, Shikha; PATIL, Dnyaneshwar; AGRAWAL, Mukta; ALEXANDER, Amit. Overcoming skin barriers through advanced transdermal drug delivery approaches. **Journal of Controlled Release**, [S. l.], v. 351, p. 361–380, 2022. ISSN: 01683659. DOI: 10.1016/j.jconrel.2022.09.025.

PHILLIPS, T. Grant; SLOMIANY, W. Paul; ALLISON, Robert. Hair Loss: Common Causes and Treatment. [S. l.], v. 96, n. 6, 2017.

PIRES, Felipe Q.; DA SILVA, Joyce Kelly R.; SA-BARRETO, Livia Lira; GRATIERI, Tais; GELFUSO, Guilherme M.; CUNHA-FILHO, Marcilio. Lipid nanoparticles as carriers of cyclodextrin inclusion complexes: A promising approach for cutaneous delivery of a volatile essential oil. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, [S. l.], v. 182, p. 110382, 2019. ISSN: 09277765. DOI: 10.1016/j.colsurfb.2019.110382.

PRATT, C. Herbert; KING, Lloyd E.; MESSENGER, Andrew G.; CHRISTIANO, Angela M.; SUNDBERG, John P. Alopecia areata. **Nature Reviews Disease Primers**, [S. l.], v. 3, n. 1, p. 17011, 2017. ISSN: 2056-676X. DOI: 10.1038/nrdp.2017.11.

PRICE, Vera H. Treatment of Hair Loss. **New England Journal of Medicine**, [S. l.], v. 341, n. 13, p. 964–973, 1999. ISSN: 0028-4793, 1533-4406. DOI: 10.1056/NEJM199909233411307.

QUINTÃO, Wanessa de Souza Cardoso et al. Microemulsions incorporating Brosimum gaudichaudii extracts as a topical treatment for vitiligo: In vitro stimulation of melanocyte migration and pigmentation. **Journal of Molecular Liquids**, [S. l.], v. 294, p. 111685, 2019. ISSN: 01677322. DOI: 10.1016/j.molliq.2019.111685.

RABBANI, Piul; TAKEO, Makoto; CHOU, WeiChin; MYUNG, Peggy; BOSENBERG, Marcus; CHIN, Lynda; TAKETO, M. Mark; ITO, Mayumi. Coordinated Activation of Wnt in Epithelial and Melanocyte Stem Cells Initiates Pigmented Hair Regeneration. **Cell**, [S. l.], v. 145, n. 6, p. 941–955, 2011. ISSN: 00928674. DOI: 10.1016/j.cell.2011.05.004.

RATHNAYAKE, Deepani; SINCLAIR, Rodney. Male androgenetic alopecia. **Expert Opinion on Pharmacotherapy**, [S. l.], v. 11, n. 8, p. 1295–1304, 2010. ISSN: 1465-6566, 1744-7666. DOI: 10.1517/14656561003752730.

ROOK, A. Endocrine Influences on Hair Growth. **BMJ**, [S. l.], v. 1, n. 5435, p. 609–614, 1965. ISSN: 0959-8138, 1468-5833. DOI: 10.1136/bmj.1.5435.609.

ROSEN, Jamie; LANDRISCINA, Angelo; FRIEDMAN, Adam. Nanotechnology-Based Cosmetics for Hair Care. **Cosmetics**, [S. l.], v. 2, n. 3, p. 211–224, 2015. ISSN: 2079-9284. DOI: 10.3390/cosmetics2030211.

SAHOO, Sanjeeb K.; LABHASETWAR, Vinod. Nanotech approaches to drug delivery and

imaging. **Drug Discovery Today**, [S. l.], v. 8, n. 24, p. 1112–1120, 2003. ISSN: 13596446. DOI: 10.1016/S1359-6446(03)02903-9.

SALIM, Shefrin; KAMALASANAN, Kaladhar. Controlled drug delivery for alopecia: A review. **Journal of Controlled Release**, [S. l.], v. 325, p. 84–99, 2020. ISSN: 01683659. DOI: 10.1016/j.jconrel.2020.06.019.

SANKE, Sarita; CHANDER, Ram; JAIN, Anju; GARG, Taru; YADAV, Pravesh. A Comparison of the Hormonal Profile of Early Androgenetic Alopecia in Men With the Phenotypic Equivalent of Polycystic Ovarian Syndrome in Women. **JAMA Dermatology**, [S. l.], v. 152, n. 9, p. 986, 2016. ISSN: 2168-6068. DOI: 10.1001/jamadermatol.2016.1776.

SANTER, Verena; DEL RÍO SANCHO, Sergio; LAPTEVA, Maria; KALIA, Yogeshvar N. Targeted intracorneal delivery—Biodistribution of triamcinolone acetonide following topical iontophoresis of cationic amino acid ester prodrugs. **International Journal of Pharmaceutics**, [S. l.], v. 525, n. 1, p. 43–53, 2017. ISSN: 03785173. DOI: 10.1016/j.ijpharm.2017.04.030.

SANTOS, G. A.; ANGELO, T.; ANDRADE, L. M.; SILVA, S. M. M.; MAGALHÃES, P. O.; CUNHA-FILHO, M.; GELFUSO, G. M.; TAVEIRA, S. F.; GRATIERI, T. The role of formulation and follicular pathway in voriconazole cutaneous delivery from liposomes and nanostructured lipid carriers. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, [S. l.], v. 170, p. 341–346, 2018. ISSN: 09277765. DOI: 10.1016/j.colsurfb.2018.06.037.

SARDANA, Kabir; BATHULA, Savitha; KHURANA, Ananta. Which is the Ideal JAK Inhibitor for Alopecia Areata - Baricitinib, Tofacitinib, Ritlecitinib or Ifidancitinib - Revisiting the Immunomechanisms of the JAK Pathway. **Indian Dermatology Online Journal**, [S. l.], v. 14, n. 4, p. 465–474, 2023. ISSN: 2229-5178. DOI: 10.4103/idoj.idoj_452_22.

SCHAEFER, H.; REDELMEIER, Thomas E. **Skin barrier: principles of percutaneous absorption**. Basel ; New York: Karger, 1996. 310 p. ISBN: 978-3-8055-6326-0.

SCHAFERKORTING, M.; MEHNERT, W.; KORTING, H. Lipid nanoparticles for improved topical application of drugs for skin diseases☆. **Advanced Drug Delivery Reviews**, [S. l.], v. 59, n. 6, p. 427–443, 2007. ISSN: 0169409X. DOI: 10.1016/j.addr.2007.04.006.

SCHMITT, Thomas; NEUBERT, Reinhard H. H. State of the art in Stratum Corneum research: The biophysical properties of ceramides. **Chemistry and Physics of Lipids**, [S. l.], v. 216, p. 91–103, 2018. ISSN: 00093084. DOI: 10.1016/j.chemphyslip.2018.09.017.

SCHNEIDER, Marlon R.; SCHMIDT-ULLRICH, Ruth; PAUS, Ralf. The Hair Follicle as a Dynamic Miniorgan. **Current Biology**, [S. l.], v. 19, n. 3, p. R132–R142, 2009. ISSN: 09609822. DOI: 10.1016/j.cub.2008.12.005.

SCHOELLHAMMER, Carl M.; BLANKSCHTEIN, Daniel; LANGER, Robert. Skin permeabilization for transdermal drug delivery: recent advances and future prospects. **Expert Opinion on Drug Delivery**, [S. l.], v. 11, n. 3, p. 393–407, 2014. ISSN: 1742-5247, 1744-7593. DOI: 10.1517/17425247.2014.875528.

SGUIZZATO, Maddalena et al. Ethosomes for Coenzyme Q10 Cutaneous Administration: From Design to 3D Skin Tissue Evaluation. **Antioxidants**, [S. l.], v. 9, n. 6, p. 485, 2020. ISSN: 2076-3921. DOI: 10.3390/antiox9060485.

SHAH, Sanket; DHAWAN, Vivek; HOLM, René; NAGARSENKER, Mangal S.; PERRIE, Yvonne. Liposomes: Advancements and innovation in the manufacturing process. **Advanced Drug Delivery Reviews**, [S. l.], v. 154–155, p. 102–122, 2020. ISSN: 0169409X. DOI: 10.1016/j.addr.2020.07.002.

SHANSHANWAL, SujitJ. S.; DHURAT, RachitaS. Superiority of dutasteride over finasteride in hair regrowth and reversal of miniaturization in men with androgenetic alopecia: A randomized controlled open-label, evaluator-blinded study. **Indian Journal of Dermatology, Venereology, and Leprology**, [S. l.], v. 83, n. 1, p. 47, 2017. ISSN: 0378-6323. DOI: 10.4103/0378-6323.188652.

SHARMA, Aseem et al. Tretinoin enhances minoxidil response in androgenetic alopecia patients by upregulating follicular sulfotransferase enzymes. **Dermatologic Therapy**, [S. l.], v. 32, n. 3, 2019. ISSN: 1396-0296, 1529-8019. DOI: 10.1111/dth.12915. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/dth.12915>. Acesso em: 10 jan. 2024.

SHARMA, Purushottam; JAIN, Deepika; MAITHANI, Mukesh; KUMAR MISHRA, Santosh; KHARE, Piush; JAIN, Vikas; SINGH, Ranjit. Development and Characterization of Dutasteride Bearing Liposomal Systems for Topical Use. **Current Drug Discovery Technologies**, [S. l.], v. 8, n. 2, p. 136–145, 2011. ISSN: 15701638. DOI: 10.2174/157016311795563901.

SHAROV, Andrey; TOBIN, Desmond J.; SHAROVA, Tatyana Y.; ATOYAN, Ruzanna; BOTCHKAREV, Vladimir A. Changes in Different Melanocyte Populations During Hair Follicle Involution (Catagen). **Journal of Investigative Dermatology**, [S. l.], v. 125, n. 6, p. 1259–1267, 2005. ISSN: 0022202X. DOI: 10.1111/j.0022-202X.2005.23959.x.

SHREBERK-HASSIDIM, Rony; RAMOT, Yuval; ZLOTOGORSKI, Abraham. Janus kinase inhibitors in dermatology: A systematic review. **Journal of the American Academy of Dermatology**, [S. l.], v. 76, n. 4, p. 745– 753.e19, 2017. ISSN: 01909622. DOI: 10.1016/j.jaad.2016.12.004.

SINGHAL, Mayank; MERINO, Virginia; ROSINI, Michela; CAVALLI, Andrea; KALIA, Yogeshvar N. Controlled Iontophoretic Delivery *in Vitro* and *in Vivo* of ARN14140—A Multitarget Compound for Alzheimer’s Disease. **Molecular Pharmaceutics**, [S. l.], v. 16, n. 8, p. 3460–3468, 2019. ISSN: 1543-8384, 1543-8392. DOI: 10.1021/acs.molpharmaceut.9b00252.

SINGHAL, Mayank; SERNA, César; KALARIA, Dhaval; KALIA, Yogeshvar N. Effect of continuous and multi-phasic current profiles on the iontophoretic transport of pramipexole, rasagiline and huperzine A: Depicting temporal variation and biodistribution in the skin. **International Journal of Pharmaceutics**, [S. l.], v. 599, p. 120445, 2021 a. ISSN: 03785173. DOI: 10.1016/j.ijpharm.2021.120445.

SINGHAL, Mayank; SERNA, César; MERINO, Virginia; KALIA, Yogeshvar N. Current profile controlled transdermal delivery of pramipexole from an iontophoretic patch system in vitro and in vivo. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, [S. l.], v. 166, p. 175–181, 2021 b. ISSN: 09396411. DOI: 10.1016/j.ejpb.2021.06.010.

SIQUEIRA, N. M.; CONTRI, R. V.; PAESE, K.; BECK, R. C. R.; POHLMANN, A. R.; GUTERRES, S. S. Innovative Sunscreen Formulation Based on Benzophenone-3-Loaded Chitosan-Coated Polymeric Nanocapsules. **Skin Pharmacology and Physiology**, [S. l.], v. 24, n. 3, p. 166–174, 2011. ISSN: 1660-5527, 1660-5535. DOI: 10.1159/000323273.

STENN, K. S.; PAUS, R. Controls of Hair Follicle Cycling. **Physiological Reviews**, [S. l.], v. 81, n. 1, p. 449–494, 2001. ISSN: 0031-9333, 1522-1210. DOI: 10.1152/physrev.2001.81.1.449.

STEVENS, Kelly R.; EINERSON, Nicole J.; BURMANIA, Jeanine A.; KAO, Weiyuan John. In vivo biocompatibility of gelatin-based hydrogels and interpenetrating networks. **Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition**, [S. l.], v. 13, n. 12, p. 1353–1366, 2002. ISSN: 0920-5063, 1568-5624. DOI: 10.1163/15685620260449741.

SUCHONWANIT, P.; SRISUWANWATTANA, P.; CHALERMROJ, N.; KHUNKHET, S. A randomized, double-blind controlled study of the efficacy and safety of topical solution of 0.25% finasteride admixed with 3% minoxidil vs. 3% minoxidil solution in the treatment of male androgenetic alopecia. **Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology**, [S. l.], v. 32, n. 12, p. 2257–2263, 2018. ISSN: 0926-9959, 1468-3083. DOI: 10.1111/jdv.15171.

TAKEUCHI, Issei; TAKESHITA, Tomoyoshi; SUZUKI, Takaaki; MAKINO, Kimiko. Iontophoretic transdermal delivery using chitosan-coated PLGA nanoparticles for positively charged drugs. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, [S. l.], v. 160, p. 520–526, 2017. ISSN: 09277765. DOI: 10.1016/j.colsurfb.2017.10.011.

TAN, Isabella J.; JAFFERANY, Mohammad. Psychosocial impact of alopecia areata in paediatric and adolescent populations: A systematic review. **Journal of Paediatrics and Child Health**, [S. l.], p. jpc.16678, 2024. ISSN: 1034-4810, 1440-1754. DOI: 10.1111/jpc.16678.

TEGTMAYER, Kyle; ZHAO, Jeffrey; MALONEY, Nolan J.; ATASSI, Giancarlo; BEESTRUM, Molly; LIO, Peter A. Off-label studies on tofacitinib in dermatology: a review. **Journal of Dermatological Treatment**, [S. l.], v. 32, n. 4, p. 399–409, 2021. ISSN: 0954-6634, 1471-1753. DOI: 10.1080/09546634.2019.1673877.

TEICHMANN, Alexa; OTBERG, Nina; JACOBI, Ute; STERRY, Wolfram; LADEMANN, Jürgen. Follicular Penetration: Development of a Method to Block the Follicles Selectively against the Penetration of Topically Applied Substances. **Skin Pharmacology and Physiology**, [S. l.], v. 19, n. 4, p. 216–223, 2006. ISSN: 1660-5527, 1660-5535. DOI: 10.1159/000093117.

TOLENTINO, Seila; PEREIRA, Maira N.; CUNHA-FILHO, Marcilio; GRATIERI, Tais;

GELFUSO, Guilherme M. Targeted clindamycin delivery to pilosebaceous units by chitosan or hyaluronic acid nanoparticles for improved topical treatment of acne vulgaris. **Carbohydrate Polymers**, [S. l.], v. 253, p. 117295, 2021. ISSN: 01448617. DOI: 10.1016/j.carbpol.2020.117295.

TOLENTINO, Seila; PEREIRA, Maira N.; DE SOUSA, Mikaella C.; CUNHA-FILHO, Marcilio; GELFUSO, Guilherme M.; GRATIERI, Tais. The influence of sebaceous content on the performance of nanosystems designed for the treatment of follicular diseases. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**, [S. l.], v. 59, p. 101895, 2020. ISSN: 17732247. DOI: 10.1016/j.jddst.2020.101895.

TOMODA, Keishiro; TERASHIMA, Hiroto; SUZUKI, Kenichi; INAGI, Toshio; TERADA, Hiroshi; MAKINO, Kimiko. Enhanced transdermal delivery of indomethacin-loaded PLGA nanoparticles by iontophoresis. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, [S. l.], v. 88, n. 2, p. 706–710, 2011. ISSN: 09277765. DOI: 10.1016/j.colsurfb.2011.08.004.

TOMODA, Keishiro; TERASHIMA, Hiroto; SUZUKI, Kenichi; INAGI, Toshio; TERADA, Hiroshi; MAKINO, Kimiko. Enhanced transdermal delivery of indomethacin using combination of PLGA nanoparticles and iontophoresis in vivo. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, [S. l.], v. 92, p. 50–54, 2012 a. ISSN: 09277765. DOI: 10.1016/j.colsurfb.2011.11.016.

TOMODA, Keishiro; WATANABE, Aya; SUZUKI, Kenichi; INAGI, Toshio; TERADA, Hiroshi; MAKINO, Kimiko. Enhanced transdermal permeability of estradiol using combination of PLGA nanoparticles system and iontophoresis. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, [S. l.], v. 97, p. 84–89, 2012 b. ISSN: 09277765. DOI: 10.1016/j.colsurfb.2012.04.002.

TRÜEB, Ralph M.; DIAS, Maria Fernanda Reis Gavazzoni. Alopecia Areata: a Comprehensive Review of Pathogenesis and Management. **Clinical Reviews in Allergy & Immunology**, [S. l.], v. 54, n. 1, p. 68–87, 2018. ISSN: 1080-0549, 1559-0267. DOI: 10.1007/s12016-017-8620-9.

TURANLI, Yasin; ACARTÜRK, Füsün. Preparation and characterization of colon-targeted pH/Time-dependent nanoparticles using anionic and cationic polymethacrylate polymers. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, [S. l.], v. 171, p. 106122, 2022. ISSN: 09280987. DOI: 10.1016/j.ejps.2022.106122.

TURNER, Norris G.; GUY, Richard H. Visualization and Quantitation of Iontophoretic Pathways Using Confocal Microscopy. **Journal of Investigative Dermatology Symposium Proceedings**, [S. l.], v. 3, n. 2, p. 136–142, 1998. ISSN: 10870024. DOI: 10.1038/jidsymp.1998.28.

TYAGI, Vasundhara; DEL RÍO-SANCHO, Sergio; LAPTEVA, Maria; KALIA, Yogeshvar N. Topical iontophoresis of buflomedil hydrochloride increases drug bioavailability in the mucosa: A targeted approach to treat oral submucous fibrosis. **International Journal of Pharmaceutics**, [S. l.], v. 569, p. 118610, 2019. ISSN: 03785173. DOI: 10.1016/j.ijpharm.2019.118610.

TYAGI, Vasundhara; SERNA-JIMÉNEZ, César E.; KALIA, Yogeshvar N. Controlled simultaneous iontophoresis of buflomedil hydrochloride and dexamethasone sodium phosphate to the mucosa for oral submucous fibrosis. **International Journal of Pharmaceutics**, [S. l.], v. 607, p. 121009, 2021. ISSN: 03785173. DOI: 10.1016/j.ijpharm.2021.121009.

URYSIAK-CZUBATKA, Izabela; KMIEĆ, Małgorzata L.; BRONIARCZYK-DYŁA, Grażyna. Assessment of the usefulness of dihydrotestosterone in the diagnostics of patients with androgenetic alopecia. **Advances in Dermatology and Allergology**, [S. l.], v. 4, p. 207–215, 2014. ISSN: 1642-395X. DOI: 10.5114/pdia.2014.40925.

USHIROBIRA, Camila Y.; AFIUNE, Luana A. F.; PEREIRA, Maira N.; CUNHA-FILHO, Marcilio; GELFUSO, Guilherme M.; GRATIERI, Tais. Dutasteride nanocapsules for hair follicle targeting: Effect of chitosan-coating and physical stimulus. **International Journal of Biological Macromolecules**, [S. l.], v. 151, p. 56–61, 2020. ISSN: 01418130. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2020.02.143.

VERMA, Amit; JAIN, Sanjay K.; HURKAT, Pooja; JAIN, Ankit. Transfollicular drug delivery: current perspectives. **Research and Reports in Transdermal Drug Delivery**, [S. l.], p. 1, 2016. ISSN: 2253-1580. DOI: 10.2147/RRTD.S75809.

WANG, Wenxi; CHEN, Lina; HUANG, Xinyan; SHAO, Anna. Preparation and Characterization of Minoxidil Loaded Nanostructured Lipid Carriers. **AAPS PharmSciTech**, [S. l.], v. 18, n. 2, p. 509–516, 2017. ISSN: 1530-9932. DOI: 10.1208/s12249-016-0519-x.

WEISS, Agnes-Valencia; SCHORR, Daniel; METZ, Julia K.; YILDIRIM, Metin; KHAN, Saeed Ahmad; SCHNEIDER, Marc. Gelatin nanoparticles with tunable mechanical properties: effect of crosslinking time and loading. **Beilstein Journal of Nanotechnology**, [S. l.], v. 13, p. 778–787, 2022. ISSN: 2190-4286. DOI: 10.3762/bjnano.13.68.

WU, Libo; ZHANG, Jian; WATANABE, Wiwik. Physical and chemical stability of drug nanoparticles. **Advanced Drug Delivery Reviews**, [S. l.], v. 63, n. 6, p. 456–469, 2011. ISSN: 0169409X. DOI: 10.1016/j.addr.2011.02.001.

YASMIN, Rehana; SHAH, Mohsin; KHAN, Saeed Ahmad; ALI, Roshan. Gelatin nanoparticles: a potential candidate for medical applications. **Nanotechnology Reviews**, [S. l.], v. 6, n. 2, p. 191–207, 2017. ISSN: 2191-9097, 2191-9089. DOI: 10.1515/ntrev-2016-0009.

YTTERBERG, Steven R. et al. Cardiovascular and Cancer Risk with Tofacitinib in Rheumatoid Arthritis. **New England Journal of Medicine**, [S. l.], v. 386, n. 4, p. 316–326, 2022. ISSN: 0028-4793, 1533-4406. DOI: 10.1056/NEJMoa2109927.

ZHANG, Wei et al. Penetration and distribution of PLGA nanoparticles in the human skin treated with microneedles. **International Journal of Pharmaceutics**, [S. l.], v. 402, n. 1–2, p. 205–212, 2010. ISSN: 03785173. DOI: 10.1016/j.ijpharm.2010.09.037.

ZHONG, Qixin; ZHANG, Linhan. Nanoparticles fabricated from bulk solid lipids: Preparation, properties, and potential food applications. **Advances in Colloid and Interface Science**, [S. l.],

l.], v. 273, p. 102033, 2019. ISSN: 00018686. DOI: 10.1016/j.cis.2019.102033.

ANEXO I

Outros produtos científicos não relacionados à tese:

Drug Delivery and Translational Research
<https://doi.org/10.1007/s13346-021-00901-0>

ORIGINAL ARTICLE



New perspectives on the topical management of recurrent candidiasis

Ana Carolina S. Ré¹ · Jayanaraian F. Martins² · Márcilio Cunha-Filho² · Guilherme M. Gelfuso² · Carolina P. Aires¹ · Tais Gratieri^{2,3}

Accepted: 6 January 2021
 © Controlled Release Society 2021

Abstract

Candidiasis is a common opportunistic infection caused by fungi of the *Candida* genus that affects mainly mucocutaneous tissues (e.g., vaginal, oral, and mammary). This condition has been known for a long time; thus, innumerable topical and systemic treatments are already available on the market worldwide. Yet, recurrent superficial candidiasis (RSC) is an expected outcome, still lacking effective and convenient treatments. Although several individual conditions may contribute to disease recurrence, biofilms' presence seems to be the main etiological factor contributing to antifungal resistance. More than proposing novel antifungal agents, current research seems to be focusing on improving the pharmaceutical technology aspects of formulations to address such a challenge. These include extending and improving intimate contact of drug delivery systems with the mucocutaneous tissues, increasing drug loading dose, and enhancing topical drug permeation. This review discusses the current understanding of the RSC and the use of pharmaceutical technology tools in obtaining better results. Even though several drawbacks of conventional formulations have been circumvented with the help of nano- or microencapsulation techniques and with the use of mucoadhesive formulation excipients, many challenges remain. In particular, the need to mask the unpalatable taste of formulations for the treatment of oral candidiasis, and the necessity of formulations with a “dryer” sensorial feeling and improved performances in providing higher bioavailability for the treatment of mammary and vaginal candidiasis.

Publicado na *Drug Delivery and Translational Research* em janeiro de 2021.

<https://doi.org/10.1007/s13346-021-00901-0>

International Journal of Pharmaceutics 635 (2023) 122794



Contents lists available at ScienceDirect

International Journal of Pharmaceutics

journal homepage: www.elsevier.com/locate/ijpharm



Novel technologies to improve the treatment of endodontic microbial infections: Inputs from a drug delivery perspective

Thamires C. Miranda^a, Jayanaraian F.M. Andrade^a, Guilherme M. Gelfuso^a,
 Márcilio Cunha-Filho^a, Laudimar A. Oliveira^b, Tais Gratieri^{a,*}

^a Laboratory of Food, Drugs, and Cosmetics (LTMAC), University of Brasília, 70910-900, Brasília, DF, Brazil

^b Department of Dentistry, Faculty of Health Sciences, University of Brasília, 70910-900, Brasília, DF, Brazil



Publicado na *International Journal of Pharmaceutics* em agosto de 2022.

<https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2023.122794>



Iontophoresis application for drug delivery in high resistivity membranes: nails and teeth

Jayanaraian F. Martins Andrade¹ · Thamires da Cunha Miranda¹ · Marcílio Cunha-Filho¹ · Stephânia Fleury Taveira² · Guilherme M. Gelfuso¹ · Taís Gratieri¹

Accepted: 22 September 2022
 © Controlled Release Society 2022

Abstract

Iontophoresis has been vastly explored to improve drug permeation, mainly for transdermal delivery. Despite the skin's electrical resistance and barrier properties, it has a relatively high aqueous content and is permeable to many drugs. In contrast, nails and teeth are accessible structures for target drug delivery but possess low water content compared to the skin and impose significant barriers to drug permeation. Common diseases of these sites, such as nail onychomycosis and endodontic microbial infections that reach inaccessible regions for mechanical removal, often depend on time-consuming and ineffective treatments relying on drug's passive permeation. Iontophoresis application in nail and teeth structures may be a safe and effective way to improve drug transport across the nail and drug distribution through dental structures, making treatments more effective and comfortable for patients. Here, we provide an overview of iontophoresis applications in these “hard tissues,” considering specificities such as their high electrical resistivity. Iontophoresis presents a promising option to enhance drug permeation through the nail and dental tissues, and further developments in these areas could lead to widespread clinical use.

Keywords Dentin · Enamel · Iontophoresis · High resistivity membranes · Nails

Publicado na *Drug Delivery and Translational Research* em setembro de 2022.

<https://doi.org/10.1007/s13346-022-01244-0>

Carbohydrate Polymers 302 (2023) 120420



Contents lists available at ScienceDirect

Carbohydrate Polymers

journal homepage: www.elsevier.com/locate/carbpol



α -Cyclodextrin-based poly(pseudo)rotaxane for antifungal drug delivery to the vaginal mucosa

Rayssa H.F. Costa^a, Anna Paula Krawczyk-Santos^b, Jayanaraian F. Martins Andrade^a, Geisa N. Barbalho^a, Rosane M. Almeida^c, Yanna K.M. Nóbrega^c, Marcilio Cunha-Filho^a, Guilherme M. Gelfuso^a, Stephânia F. Taveira^b, Taís Gratieri^{a,*}

^a Laboratory of Food, Drugs, and Cosmetics (LTMAC), University of Brasília (UnB), 70910-900 Brasília, DF, Brazil

^b Laboratory of Nanosystems and Drug Delivery Devices (NanoSYS), School of Pharmacy, Federal University of Goiás (UFG), 74605-170 Goiânia, GO, Brazil

^c Clinical Microbiology and Immunology Laboratory, Department of Pharmacy, University of Brasília (UnB), 70910-900 Brasília, DF, Brazil



Publicado na *Carbohydrate Polymers* em outubro de 2022.

<https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2022.120420> – Open Access.



Contents lists available at ScienceDirect

International Journal of Pharmaceutics

journal homepage: www.elsevier.com/locate/ijpharm

Enhanced topical paromomycin delivery for cutaneous leishmaniasis treatment: Passive and iontophoretic approaches

Fernando A.P. de Sá^a, Jayanaraian F.M. Andrade^a, Thamires C. Miranda^a,
Marcilio Cunha-Filho^a, Guilherme M. Gelfuso^a, Maria Lapteva^b, Yogeshvar N. Kalia^b,
Taís Gratieri^{a,*}

^a Laboratory of Food, Drugs, and Cosmetics (LTMAC), University of Brasília (UnB), 70910-900, Brasília, DF, Brazil

^b School of Pharmaceutical Sciences, University of Geneva, CMU-1 rue Michel Servet, 1211 Geneva, Switzerland

Publicado na *International Journal of Pharmaceutics* em novembro de 2023.

<https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2023.123617>