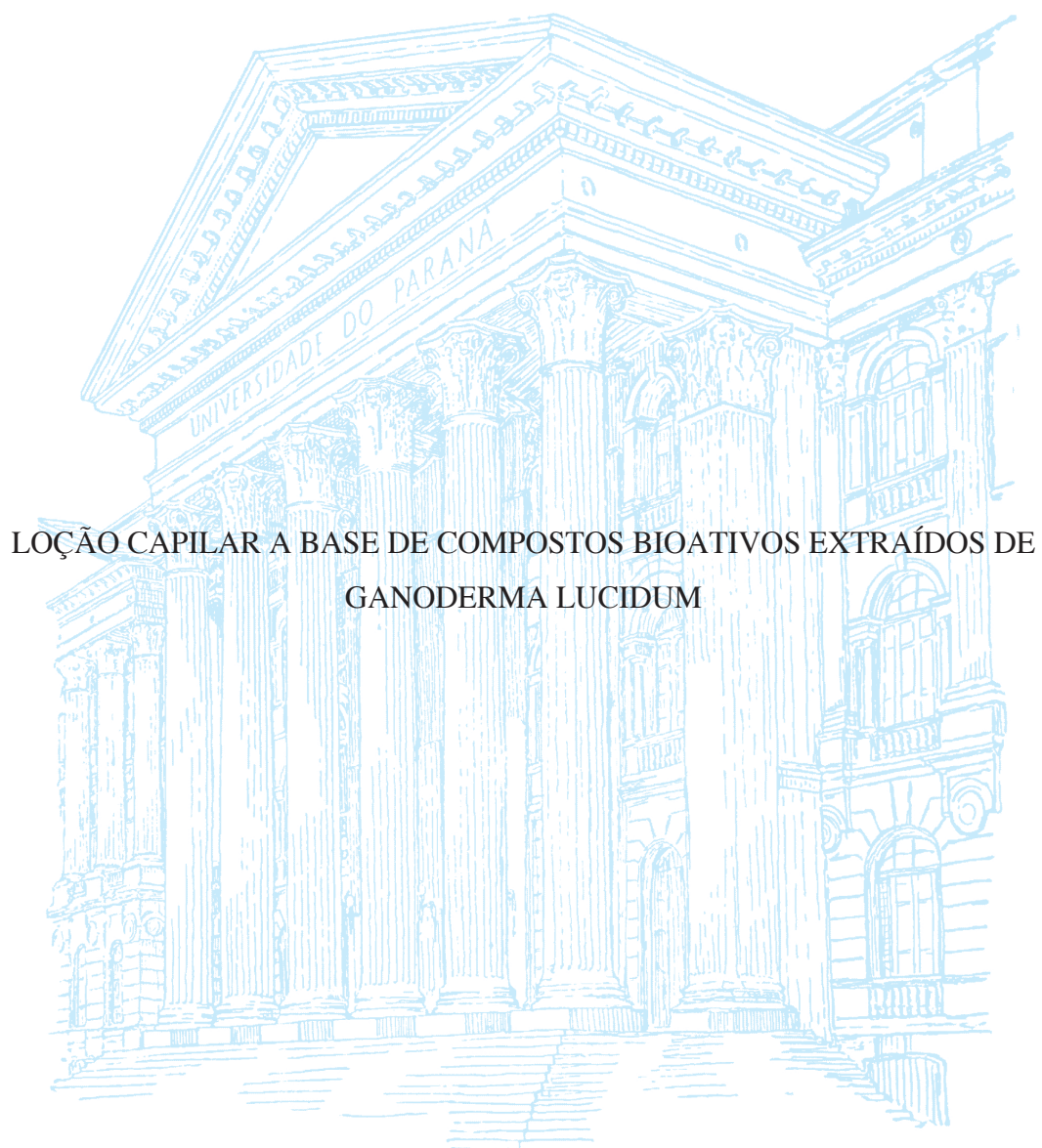


UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

LILIANA ISABEL CHITOLINA ZOZ



LOÇÃO CAPILAR A BASE DE COMPOSTOS BIOATIVOS EXTRAÍDOS DE
GANODERMA LUCIDUM

CURITIBA

2018

LILIANA ISABEL CHITOLINA ZOZ

LOÇÃO CAPILAR A BASE DE COMPOSTOS BIOATIVOS EXTRAÍDOS DE
GANODERMA LUCIDUM

Tese apresentada como requisito parcial à obtenção do grau de Doutora em Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia, no curso de Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia, Setor de Tecnologia, da Universidade Federal do Paraná.

Orientador: Prof. Dr. Carlos Ricardo Soccol
Co-orientadora: Dra. Andrea Thomaz Soccol Scholz

CURITIBA

2018

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELO SISTEMA DE BIBLIOTECAS/UFPR
BIBLIOTECA DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA

Z911 Zoz, Liliana Isabel Chitolina
Loção capilar a base de compostos bioativos extraídos de esporos de *Ganoderma lucidum* / Liliana Isabel Chitolina Zoz. – Curitiba, 2018.
120 p. : il. color. ; 30 cm.

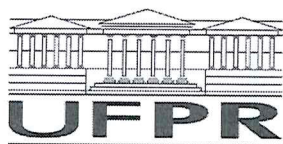
Tese - Universidade Federal do Paraná, Setor de Tecnologia, Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia, 2018.

Orientador: Carlos Ricardo Soccol.
Coorientadora: Andrea Thomaz Soccol Scholz.

1. Alopecia. 2. Folículos capilares. 3. Loção capilar. 4. *Ganoderma lucidum*. 5. 5- α -redutase.
I. Universidade Federal do Paraná. II. Soccol, Carlos Ricardo. III. Scholz, Andrea Thomaz Soccol.
IV. Título

CDD: 660.6

Bibliotecária: Romilda Santos - CRB-9/1214



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
SETOR TECNOLOGIA
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO ENGENHARIA DE
BIOPROCESSOS E BIOTECNOLOGIA

TERMO DE APROVAÇÃO

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em ENGENHARIA DE BIOPROCESSOS E BIOTECNOLOGIA da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da tese de Doutorado de **LILIANA ISABEL CHITOLINA ZOZ** intitulada: **Loção Capilar a Base de Compostos Bioativos Extraídos de *Ganoderma lucidum***, após terem inquirido a aluna e realizado a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua APROVAÇÃO no rito de defesa.

A outorga do título de doutor está sujeita à homologação pelo colegiado, ao atendimento de todas as indicações e correções solicitadas pela banca e ao pleno atendimento das demandas regimentais do Programa de Pós-Graduação.

Curitiba, 23 de Março de 2018.

CARLOS RICARDO SOCCOL
Presidente da Banca Examinadora

VANETE THOMAZ SOCCOL
Avaliador Interno

ADENISE LORENCI WOJCIECHOWSKI
Avaliador Interno

MARIA GIOVANA BINDER PAGNONCELLI
Avaliador Externo

LUCIANA PORTO DE SOUZA VANDENBERGHE
Avaliador Interno

ANDREA THOMAZ SOCCOL
Avaliador Externo

Dedico este trabalho
À Deus, por guiar meus passos e
me ajudar nas horas mais difíceis,
Aos meus pais, Valdemiro e Salete,
por todo apoio e amor incondicional.

AGRADECIMENTOS

À Deus, por me carregar nos braços nos momentos mais difíceis dessa jornada, e à Santa Rita de Cássia, por sua intercessão em todos os momentos.

Aos meus pais, Valdemiro e Salete Zoz, pelos exemplos e ensinamentos de vida, pelo apoio e ajuda para a realização desse sonho.

Ao professor Carlos Ricardo Soccol, por toda a orientação dada, sempre de muito enriquecimento profissional para mim, e principalmente pela oportunidade de trabalhar com um projeto que tanto me encanta.

À professora Vanete Thomaz Soccol, meu exemplo de profissional, sempre muito dedicada ao seu trabalho e aos alunos. Sou infinitamente grata por todos os ensinamentos, desde o mestrado.

À doutora Andrea Thomaz Soccol, por toda a ajuda de extrema importância para que esse trabalho fosse concluído, e pela confiança em meu trabalho.

Ao Programa de Pós Graduação em Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia, por toda a infraestrutura oferecida, e aos professores, sempre solícitos para ajudar os alunos.

Às doutoras Lígia Durski e Tatiane Cunha, pois sem vocês certamente eu não teria conseguido superar todas as dificuldades do dia-a-dia.

Aos amigos que permaneceram ao meu lado e entenderam esse período de ausência aos eventos sociais.

Aos colegas de trabalho que também foram de extrema importância para que eu percorresse esse caminho, dividindo laboratórios e compartilhando conhecimentos profissionais.

“Seu trabalho vai preencher uma parte grande da sua vida, e a única maneira de ficar realmente satisfeito é fazer o que você acredita ser um ótimo trabalho. E a única maneira de fazer um excelente trabalho é amar o que você faz.”

Steve Jobs

RESUMO

A alopecia, conhecida popularmente como queda capilar, atinge tanto homens quanto mulheres, em todas as faixas etárias. Sua incidência tem aumentado com o ritmo de vida cada vez mais estressante. É a doença com maior impacto psicossocial, levando a casos extremos até mesmo ao suicídio. A alopecia pode ocorrer devido a diversos fatores, sendo que a ação hormonal andrógena de diidrotestosterona (DHT) é a causa mais frequente. Esse hormônio é responsável pela miniaturização do folículo capilar e consequente queda dos fios de cabelo. O fungo *Ganoderma lucidum* é amplamente utilizado na medicina chinesa por suas propriedades anticancerígenas. No câncer de próstata, ele atua inibindo a enzima 5- α -redutase, responsável pela conversão de testosterona em DHT. Com base nessas informações, esporos de *G. lucidum* foram rompidos e seu material foi extraído em solução aquosa. Essa solução foi utilizada no desenvolvimento de uma loção capilar para tratamento de alopecia. A avaliação da loção capilar foi feita em duas etapas. Na primeira testou-se a loção em modelo experimental usando camundongos C57BL/6. Foram avaliados crescimento, desenvolvimento dos folículos e atividade hormonal em machos e fêmeas dos animais macro e microscopicamente. Neste modelo constatou-se aumento superior a 50% na quantidade de folículos, e de até 10 vezes o diâmetro dos mesmos. Em machos as análises hormonais indicaram alterações não significativas ($p > 0,05$) dos níveis de testosterona, decréscimo significativo ($p < 0,05$) para DHT e aumento dos níveis de estradiol ($p < 0,05$). Para as fêmeas, a única resposta hormonal diferente foi a queda dos níveis de testosterona ($p < 0,05$). A segunda etapa consistiu em avaliar a loção em homens e mulheres. Os mesmos parâmetros realizados no modelo experimental foram aqui avaliados. Pôde-se observar o surgimento de novos folículos capilares, melhora da queda capilar, aumento da haste dos fios de cabelo, tornando-os mais fortes e resistentes, brilhosos e hidratados, com aceitação da fórmula por 99% dos pacientes. A loção capilar formulada a partir do extrato de esporos de *G. lucidum* mostrou ser um cosmético de alto potencial tecnológico e industrial.

Palavras-chave: Alopecia. Folículos capilares. Loção capilar. *Ganoderma lucidum*. 5- α -redutase. Testosterona. Diidrotestosterona.

ABSTRACT

Alopecia, popularly known as hair loss, affects both men and women in all age groups. Its incidence has increased with the increasingly stressful of lifestyle. It is the disease with the greatest psychosocial impact, leading to extreme cases even to suicide. Alopecia can occur due to several factors, and the androgenic hormone action of dihydrotestosterone (DHT) is the most frequent cause. This hormone is responsible for the miniaturization of the hair follicle and consequent fall of hair strands. The fungus *Ganoderma lucidum* is widely used in Chinese medicine for its anticancer properties. In prostate cancer, it works by inhibiting the enzyme 5- α -reductase, responsible for the conversion of testosterone to DHT. Based on this information, spores of *G. lucidum* were disrupted and their material was extracted in aqueous solution. This solution was used in the development of a hair lotion for the treatment of alopecia. The evaluation of capillary lotion was done in two stages. In the first experiment the lotion was tested in an experimental model using C57BL/6 mice. Growth, follicle development and hormonal activity were evaluated in males and females of the animals, machro and microscopically. In this model, an increase of more than 50% in the number of follicles and up to 10 times the diameter of the follicles was observed. In males, hormonal analyzes indicated non-significant changes ($p > 0.05$) in testosterone levels, a significant decrease ($p < 0.05$) for DHT and an increase in estradiol levels ($p < 0.05$). For females, the only different hormonal response was the decrease in testosterone levels ($p < 0.05$). The second stage consisted in evaluating lotion in men and women. The same parameters performed in the experimental model were evaluated here. It was observed the growth of new hair follicles, improved hair loss, hair shaft enlargement, making them stronger and resistant, shiny and hydrated, with acceptance of the formula by 99% of the patients. The hair lotion formulated from the spore extract of *G. lucidum* showed to be a cosmetic of high technological and industrial potential.

Key words: Alopecia. Hair follicles. Hair lotion. *Ganoderma lucidum*. 5- α -reductase. Testosterone. Dihydrotestosterone.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 – ESTRUTURAS BÁSICAS DO FOLICULO CAPILAR.....	27
FIGURA 2 – ESTRUTURA DA HASTE CAPILAR.....	27
FIGURA 3 – ESTRUTURAS CAPILARES AMPLIADAS.....	29
FIGURA 4 – FASES DO CRESCIMENTO CAPILAR.....	30
FIGURA 5 – FLUXOGRAMA DAS ETAPAS REALIZADAS NO ESTUDO....	44
FIGURA 6 – CAMUNDONGO C57BL/06 ANTES (a) E DEPOIS (b) DA REMOÇÃO DE PELOS DE ÁREA DORSAL DE 2 x 3 CM.....	50
FIGURA 7 – PROCESSO DE RETIRADA DE AMOSTRA DE PELE DE CAMUNDONGOS UTILIZANDO <i>PUNCH</i> DESCARTÁVEL (a) COM AUXÍLIO DE PINÇA.....	50
FIGURA 8 – FOLÍCULOS CAPILARES EM FASE DE CRESCIMENTO ANÁGENA (1) E CATÁGENA/TELÓGENA (2) E MEDIDAS UTILIZADAS COMO PARÂMETROS.....	52
FIGURA 9 – IMAGEM DOS FRASCOS ENTREGUES AOS PACIENTES. A FLECHA SINALIZA O CÓDIGO CONTIDO EM CADA RÓTULO DA LOÇÃO DO ESTUDO DUPLO-CEGO.....	56
FIGURA 10 – MICROSCOPIA ELETRÔNICA DOS ESPOROS DE <i>G. lucidum</i> ANTES DO ROMPIMENTO (a) E APÓS O ROMPIMENTO CELULAR (b) PELO MÉTODO DE MACERAÇÃO COM PÉROLAS DE VIDRO.....	59
FIGURA 11 – ASPECTO DOS EXTRATOS OBTIDOS A PARTIR DOS ESPOROS DO FUNGO <i>G. lucidum</i> . a: EXTRAÇÃO COM MACERAÇÃO EM CADINHO E PISTILO; b: EXTRAÇÃO COM MACERAÇÃO EM CADINHO E PISTILO + PÉROLAS DE VIDRO; c: EXTRAÇÃO POR MACERAÇÃO EM CADINHO E PISTILO + PÉROLAS DE VIDRO + AGITAÇÃO EM VÓRTEX.....	60
FIGURA 12 – FOTOGRAFIA DA LOÇÃO CAPILAR FORMULADA A PARTIR DE BIOCOMPOSOS ATIVOS EXTRATO DE ESPOROS DO FUNGO <i>G. lucidum</i>	62
FIGURA 13 – FOTOGRAFIAS EXEMPLIFICANDO OS ANIMAIS MACHOS DOS GRUPOS (a) CONTROLE NEGATIVO (CN) E (b)	

CONTROLE POSITIVO (CP) COM OS GRUPOS DE TRATAMENTOS T1 (c), T2 (d), T3 (e).....	64
FIGURA 14 – EXEMPLO DE CORTES HISTOLÓGICOS EM ANIMAIS MACHOS DOS GRUPOS a) CONTROLE NEGATIVO (CN), b) CONTROLE POSITIVO (CP) E c) TRATAMENTO 3 (T3).....	66
FIGURA 15 – FOTOGRAFIAS EXEMPLIFICANDO OS ANIMAIS FÊMEAS DOS GRUPOS (a) CONTROLE NEGATIVO (CN) E (b) CONTROLE POSITIVO (CP) COM OS GRUPOS DE TRATAMENTOS T1 (c), T2 (d), T3 (e).....	73
FIGURA 16 – EXEMPLO DE CORTES HISTOLÓGICOS EM ANIMAIS FÊMEAS DOS GRUPOS (a) CONTROLE NEGATIVO (CN), (b) CONTROLE POSITIVO (CP) E (c) TRATAMENTO 2 (T2).....	74
FIGURA 17 – FOTOGRAFIA CAPILAR DO PACIENTE H1 NO TEMPO 0 (a), APÓS 30 DIAS DE TRATAMENTO (b) E APÓS 90 DIAS DE TRATAMENTO (c).....	81
FIGURA 18 – FOTOGRAFIA CAPILAR DO PACIENTE H2 NO TEMPO 0 (a) E COM 60 DIAS DE TRATAMENTO (b).....	82
FIGURA 19 – FOTOGRAFIA CAPILAR DO PACIENTE H3 NO TEMPO 0 (a) E COM 90 DIAS DE TRATAMENTO (b).....	82
FIGURA 20 – FOTOGRAFIA CAPILAR DO PACIENTE H4 NO TEMPO 0 (a) E COM 30 DIAS DE TRATAMENTO (b).....	83
FIGURA 21 – FOTOGRAFIA CAPILAR DO PACIENTE H5 TEMPO 0 (a) E COM 60 DIAS DE TRATAMENTO (b).....	84
FIGURA 22 – FOTOGRAFIA CAPILAR DO PACIENTE H6 NO TEMPO 0 (a) E COM 30 DIAS DE TRATAMENTO (b).....	84
FIGURA 23 – FOTOS MICROSCÓPICAS DE COURO CABELUDO DE PACIENTE HOMEM NO TEMPO 0 (a) E COM 30 DIAS DE TRATAMENTO (b). AS SETAS INDICAM NOVOS FIOS DE CABELO QUE NASCERAM E CRESCERAM APÓS TRATAMENTO COM A LOÇÃO TESTE.....	85
FIGURA 24 – FOTOGRAFIA CAPILAR DA PACIENTE M1 NO TEMPO 0 (a) E APÓS 30 DIAS DE USO DA LOÇÃO (b).....	89

FIGURA 25 – FOTOGRAFIA CAPILAR DA PACIENTE M2 NO TEMPO 0 (a) E APÓS 30 DIAS DE USO DA LOÇÃO (b).....	89
FIGURA 26 – FOTOGRAFIA CAPILAR DA PACIENTE M3 (a) E M2 (b) APÓS 60 DIAS DE USO DA LOÇÃO.....	90
FIGURA 27 – FOTOS MICROSCÓPICAS DE COURO CABELUDO DE PACIENTE FEMININA NO TEMPO 0 (a) E COM 30 DIAS DE TRATAMENTO (b). AS SETAS INDICAM NOVOS FIOS DE CABELO QUE NASCERAM E CRESCERAM APÓS TRATAMENTO COM A LOÇÃO TESTE.....	90

LISTA DE TABELAS

- TABELA 1 – QUANTIDADE DE ANIMAIS POR GRUPO E COMPOSIÇÃO DA LOÇÃO CAPILAR AO QUAL CADA ANIMAL FOI SUBMETIDO..... 49
- TABELA 2 – CONCENTRAÇÕES E DILUIÇÕES FEITAS DE CADA REAGENTE PARA A PADRONIZAÇÃO DO TESTE IMUNOENZIMÁTICO (ELISA) PARA A DETERMINAÇÃO DOS HORMÔNIOS ESTRADIOL, TESTOSTERONA E DIIDROTESTOSTERONA EM ANIMAIS..... 53
- TABELA 3 – POTENCIAL ANTIOXIDANTE (EXPRESSO EM IC₅₀ – μG/ML) OBTIDOS NOS TRÊS DIFERENTES MÉTODOS DE EXTRAÇÃO DE ESPOROS DE *G. lucidum*, AVALIADOS PELO MÉTODO DE DPPH..... 60
- TABELA 4 – RESULTADOS DOS TESTES FARMACOTÉCNICOS (ESTABILIDADE PRELIMINAR, ESTABILIDADE ACELERADA, TEMPO DE PRATELEIRA E COMPATIBILIDADE ENTRE PRODUTO E EMBALAGEM) E SEUS PARÂMETROS ANALISADOS (ORGANOLÉPTICOS, COR, ODORE E SENSAÇÃO AO TATO; E FÍSICO-QUÍMICOS: PH E CENTRIFUGAÇÃO) EM COMPARAÇÃO COM AMOSTRA REFERÊNCIA, DE ACORDO COM REGULAMENTAÇÃO TÉCNICA DA ANVISA..... 63
- TABELA 5 – VALORES DAS MÉDIAS OBTIDAS A PARTIR DA CLASSIFICAÇÃO VISUAL DE CRESCIMENTO DE PELOS DE ANIMAIS MACHOS DOS GRUPOS CN, CP, T1, T2 E T3 E ANÁLISE ESTATÍSTICA..... 65
- TABELA 6 – MÉDIA DA QUANTIDADE E CLASSIFICAÇÃO DE FOLÍCULOS (ANÁGENOS OU CATÁGENOS/TELÓGENOS) CONTADOS EM LAMINAS HISTOLÓGICAS DE ANIMAIS MACHOS, DOS GRUPOS CN, CP E T3 E SUA ANÁLISE ESTATÍSTICA..... 67
- TABELA 7 – MÉDIA E ANÁLISE ESTATÍSTICA DO TAMANHO DE FOLÍCULOS ANÁGENOS CONTADOS EM LAMINAS

	HISTOLÓGICAS DE ANIMAIS MACHOS, DOS GRUPOS CN, CP E T3.....	67
TABELA 8	– MÉDIA E ANÁLISE ESTATÍSTICA DO TAMANHO DE FOLÍCULOS CATÁGENOS/TELÓGENOS CONTADOS EM LAMINAS HISTOLÓGICAS DE ANIMAIS MACHOS, DOS GRUPOS CN, CP E T3.....	68
TABELA 9	– CONCENTRAÇÕES DE ANTÍGENO, SORO E CONJUGADO, UTILIZADOS NA PADRONIZAÇÃO DO TESTE ELISA PARA DETERMINAÇÃO DE ESTRADIOL, TESTOSTERONA E DHT, EM MODELO ANIMAL.....	68
TABELA 10	– RESPOSTA HORMONAL DE TESTOSTERONA DOS ANIMAIS MACHOS DOS GRUPOS CN, CP, T1, T2 E T3.....	69
TABELA 11	– RESPOSTA HORMONAL DE DHT DOS ANIMAIS MACHOS DOS GRUPOS CN, CP, T1, T2 E T3.....	70
TABELA 12	– RESPOSTA HORMONAL DE ESTRADIOL DOS ANIMAIS MACHOS DOS GRUPOS CN, CP, T1, T2 E T3.....	61
TABELA 13	– VALORES DAS MÉDIAS OBTIDAS A PARTIR DA CLASSIFICAÇÃO VISUAL DE CRESCIMENTO DE PELOS DE ANIMAIS FÊMEAS DOS GRUPOS CN, CP, T1, T2 E T3 E ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	72
TABELA 14	– MÉDIA DA QUANTIDADE E CLASSIFICAÇÃO DE FOLÍCULOS (ANÁGENOS OU CATÁGENOS/TELÓGENOS) CONTADOS EM LAMINAS HISTOLÓGICAS DE ANIMAIS FÊMEAS, DOS GRUPOS CN, CP E T3 E SUA ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	75
TABELA 15	– MÉDIA E ANÁLISE ESTATÍSTICA DO TAMANHO DE FOLÍCULOS ANÁGENOS CONTADOS EM LAMINAS HISTOLÓGICAS DE ANIMAIS FÊMEAS, DOS GRUPOS CN, CP E T3.....	75
TABELA 16	– MÉDIA E ANÁLISE ESTATÍSTICA DO TAMANHO DE FOLÍCULOS CATÁGENOS/TELÓGENOS CONTADOS EM LAMINAS HISTOLÓGICAS DE ANIMAIS FÊMEAS, DOS GRUPOS CN, CP E T3.....	76

TABELA 17 – RESPOSTA HORMONAL DE TESTOSTERONA DOS ANIMAIS FÊMEAS DOS GRUPOS CN, CP, T1, T2 E T3.....	76
TABELA 18 – RESPOSTA HORMONAL DE DHT DOS ANIMAIS FÊMEAS DOS GRUPOS CN, CP, T1, T2 E T3.....	77
TABELA 19 – RESPOSTA HORMONAL DE ESTRADIOL DOS ANIMAIS FÊMEAS DOS GRUPOS CN, CP, T1, T2 E T3.....	78
TABELA 20 – PORCENTAGEM DE CADA RELATO DE MELHORIA OU EFEITO ADVERSO FEITO POR PACIENTES HOMENS EM TRATAMENTO ATRAVÉS DE FICHA DE AUTO AVALIAÇÃO.....	80
TABELA 21 – ANÁLISE ESTATÍSTICA DO TEMPO DE RESPOSTA DA LOÇÃO TESTE EM PACIENTES HOMENS DE ACORDO COM A IDADE.....	85
TABELA 22 – MÉDIAS INICIAIS DOS HORMÔNIOS TESTOSTERONA, DHT E ESTRADIOL, DOS PACIENTES HOMENS SUBMETIDOS A TESTES COM LOÇÃO CAPILAR FORMULADA COM EXTRATO DE ESPORO DE <i>G. LUCIDUM</i> . ANÁLISE ESTATÍSTICA DESSES VALORES DE ACORDO COM O TEMPO DE RESPOSTA POSITIVA.....	86
TABELA 23 – CLASSE DE MEDICAMENTOS UTILIZADOS PELOS PACIENTES HOMENS (%) E ANÁLISE ESTATÍSTICA DE POSSÍVEL INTERAÇÃO EM TEMPO DE RESPOSTA AO TRATAMENTO DA LOÇÃO TESTE.....	87
TABELA 24 – ANÁLISE DE POSSÍVEL INTERFERÊNCIA EM RESPOSTA AO TRATAMENTO COM LOÇÃO TESTE, EM PACIENTES HOMENS QUE HAVIAM FEITO TRATAMENTOS CAPILARES ANTERIORES.....	87
TABELA 25 – PORCENTAGEM DE CADA RELATO DE MELHORIA OU EFEITO ADVERSO FEITO POR PACIENTES MULHERES EM TRATAMENTO ATRAVÉS DE FICHA DE AUTO AVALIAÇÃO.....	88

TABELA 26 – ANÁLISE ESTATÍSTICA DO TEMPO DE RESPOSTA DA LOÇÃO TESTE EM PACIENTES MULHERES DE ACORDO COM A IDADE.....	91
TABELA 27 – MÉDIAS INICIAIS DOS HORMÔNIOS TESTOSTERONA, DHT E ESTRADIOL, DE PACIENTES MULHERES SUBMETIDAS A TESTES COM LOÇÃO CAPILAR FORMULADA COM EXTRATO DE ESPORO DE <i>G. LUCIDUM</i> . ANÁLISE ESTATÍSTICA DESSES VALORES DE ACORDO COM O TEMPO DE RESPOSTA POSITIVA.....	91
TABELA 28 – CLASSE DE MEDICAMENTOS UTILIZADOS PELAS PACIENTES MULHERES (%) E ANÁLISE ESTATÍSTICA DE POSSÍVEL INTERAÇÃO EM TEMPO DE RESPOSTA AO TRATAMENTO DA LOÇÃO TESTE.....	92
TABELA 29 – ANÁLISE DE POSSÍVEL INTERFERÊNCIA EM RESPOSTA AO TRATAMENTO COM LOÇÃO TESTE, EM PACIENTES MULHERES QUE HAVIAM FEITO TRATAMENTOS CAPILARES ANTERIORES.....	93

LISTA DE GRÁFICOS

- GRÁFICO 1 – MÉDIA DA VARIAÇÃO HORMÔNAL DE TESTOSTERONA EM ANIMAIS MACHOS SEPARADOS EM GRUPOS (CN, CP, T1, T2 E T3). O CUT OFF DETERMINADO FOI >1,943..... 69
- GRÁFICO 2 – MÉDIA DA VARIAÇÃO HORMÔNAL DE DHT EM ANIMAIS MACHOS SEPARADOS EM GRUPOS (CN, CP, T1, T2 E T3). O CUT OFF DETERMINADO FOI >0,297..... 70
- GRÁFICO 3 – MÉDIA DA VARIAÇÃO HORMÔNAL DE ESTRADIOL EM ANIMAIS MACHOS SEPARADOS EM GRUPOS (CN, CP, T1, T2 E T3). O CUT OFF DETERMINADO FOI >0,251..... 71
- GRÁFICO 4 – MÉDIA DA VARIAÇÃO HORMÔNAL DE TESTOSTERONA EM ANIMAIS FÊMEAS SEPARADAS EM GRUPOS (CN, CP, T1, T2 E T3). O CUT OFF DETERMINADO FOI >1,925..... 77
- GRÁFICO 5 – MÉDIA DA VARIAÇÃO HORMÔNAL DE DHT EM ANIMAIS FÊMEAS SEPARADAS EM GRUPOS (CN, CP, T1, T2 E T3). O CUT OFF DETERMINADO FOI >0,293..... 78
- GRÁFICO 6 – MÉDIA DA VARIAÇÃO HORMÔNAL DE ESTRADIOL EM ANIMAIS FÊMEAS SEPARADAS EM GRUPOS (CN, CP, T1, T2 E T3). O CUT OFF DETERMINADO FOI >0,252..... 79

LISTA DE SIGLAS

- ANVISA – Agencia Nacional de Vigilância Sanitária
- FDA – Food and Drug Administration

LISTA DE ABREVIATURAS

ATP	–	Adenosina trifosfato
CEP	–	Comitê de Ética e Pesquisa
CEUA	–	Comissão de Ética no Uso de Animais
CN	–	Controle negativo
CP	–	Controle positivo
DHT	–	Diidrotestosterona
DPPH	–	2,2-difenil-1-picrilhidrazil
ELISA	–	Enzima imuno ensaio
HE	–	Hematoxilina Eosina
TCLE	–	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
T1	–	Tratamento 1
T2	–	Tratamento 2
T3	–	Tratamento 3

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	23
1.1	OBJETIVOS.....	24
1.1.1	Objetivo geral.....	24
1.1.2	Objetivos específicos.....	24
2	REVISÃO DE LITERATURA	26
2.1	CABELO.....	26
2.1.1	Queda capilar.....	31
2.1.1.1	Impacto psicossocial e sócio cultural.....	31
2.1.2	Principais tipos e causas de alopecia.....	32
2.1.2.1	Alopecia cicatricial.....	32
2.1.2.2	Alopecia não cicatricial.....	32
2.1.2.2.1	Alopecia androgenética.....	32
2.1.2.2.2	Eflúvio telógeno.....	34
2.1.2.2.3	Alopecia areata.....	35
2.1.3	Tratamentos disponíveis.....	35
2.1.4	Potencial econômico.....	38
2.2	MACROMICETOS.....	39
2.2.1	<i>Ganoderma lucidum</i>	39
3	METODOLOGIA	42
3.1	ROMPIMENTO DOS ESPOROS.....	42
3.2	LOÇÃO CAPILAR.....	42
3.3	MODELO ANIMAL.....	42
3.4	TESTE EM HUMANO.....	43
4	MATERIAL E MÉTODOS	45
4.1	OBTENÇÃO DE EXTRATO DE ESPOROS DE <i>Ganoderma lucidum</i> ...	45
4.1.1	Método de extração de compostos bioativos.....	45
4.1.2	Avaliação do potencial antioxidante dos extratos.....	45
4.1.3	Avaliação da eficácia de rompimento celular por microscopia eletrônica de varredura.....	46
4.2	PREPARO DA LOÇÃO.....	46
4.2.1	Testes farmacotécnicos da loção capilar formulada.....	47

4.2.1.1	Teste de estabilidade preliminar da loção capilar.....	47
4.2.1.2	Teste de estabilidade acelerada da loção capilar.....	47
4.2.1.3	Tempo de prateleira do produto.....	48
4.2.1.4	Teste de compatibilidade entre formulação e material de acondicionamento.....	46
4.3	MODELO DE AVALIAÇÃO <i>IN VIVO</i> – ANIMAIS.....	48
4.3.1	Análise macroscópica da área com aplicação do produto.....	51
4.3.2	Estudos histológicos de pele de animais utilizados no estudo.....	51
4.3.3	Testes hormonais realizados em animais utilizados no estudo.....	52
4.3.3.1	Padronização do teste imunoenzimático (ELISA) para a determinação dos hormônios estradiol, testosterona e DHT em modelo animal.....	52
4.3.3.2	Determinação de estradiol pelo método ELISA.....	54
4.3.3.3	Determinação de testosterona pelo método ELISA.....	54
4.3.3.4	Determinação de DHT pelo método ELISA.....	55
4.4	AVALIAÇÃO DA LOÇÃO CAPILAR EM HUMANOS.....	55
4.4.1	Fichas de auto avaliação e análise subjetiva dos pacientes do estudo.....	57
4.4.2	Análises macroscópicas das imagens obtidas dos pacientes participantes do estudo.....	57
4.4.3	Análises microscópicas obtidas de couro cabeludo de pacientes participante do estudo.....	58
4.4.4	Análises Hormonais em humanos.....	58
4.5	ANÁLISES ESTATÍSTICAS	58
5	RESULTADOS	59
5.1	RUPTURA DOS ESPOROS.....	59
5.1.1	Eficácia dos processos de ruptura celular.....	59
5.1.2	Avaliação microscópica do rompimento dos esporos.....	59
5.2	PRODUÇÃO DO EXTRATO A PARTIR DE ESPOROS DE <i>Ganoderma lucidum</i>	60
5.2.1	Avaliação do potencial antioxidante dos extratos de <i>G. lucidum</i> para posterior utilização em loção capilar.....	60
5.3	PREPARO DA LOÇÃO CAPILAR.....	61
5.3.1	Características da loção capilar.....	61

5.3.2	Testes farmacotécnicos da loção capilar.....	62
5.4	AVALIAÇÃO DA LOÇÃO CAPILAR EM MODELO ANIMAL.....	64
5.4.1	Avaliação da loção capilar em modelo animal: Machos.....	64
5.4.1.1	Análise macroscópica de animais machos utilizados no estudo.....	64
5.4.1.2	Análise microscópica da pele dos animais machos utilizados no estudo...	65
5.4.1.3	Análises das respostas hormonais de animais machos utilizados no estudo.....	68
5.4.1.3.1	Resultado da padronização do teste imunoenzimático (ELISA) para a determinação dos hormônios estradiol, testosterona e DHT em modelo animal.....	68
5.4.1.3.2	Resultado da determinação de testosterona pelo método ELISA em animais machos.....	68
5.4.1.3.3	Resultado da determinação de DHT pelo método ELISA em animais machos.....	69
5.4.1.3.4	Resultado da determinação de estradiol pelo método ELISA em animais machos.....	70
5.4.2	Avaliação da loção capilar em modelo animal – animais fêmeas.....	71
5.4.2.1	Análise macroscópica de animais fêmeas utilizadas no estudo.....	71
5.4.2.2	Análise microscópica da pele dos animais fêmeas utilizados no estudo....	72
5.4.2.3	Análises das respostas hormonais de animais fêmeas utilizadas no estudo.....	76
5.4.2.3.1	Resultado da determinação de testosterona pelo método ELISA em animais fêmeas.....	76
5.4.2.3.2	Resultado da determinação de DHT pelo método ELISA em animais fêmeas.....	77
5.4.2.3.3	Resultado da determinação de estradiol pelo método ELISA em animais fêmeas.....	78
5.5	AVALIAÇÃO DA LOÇÃO CAPILAR EM SERES HUMANOS.....	79
5.5.1	Avaliação dos efeitos da loção capilar em seres humanos – homens.....	79
5.5.1.1	Análise subjetiva – avaliação dos pacientes homens ao tratamento.....	79
5.5.1.2	Análise macroscópica de couro cabeludo realizada em pacientes homens	80
5.5.1.3	Análise microscópica de couro cabeludo de pacientes homens.....	83
5.5.1.4	Análise de variáveis endógenas e correlação com o tratamento com loção	

teste em homens.....	85
5.5.1.4.1 Alteração de resultados perante a idade de homens.....	85
5.5.1.4.2 Alteração de resultados perante a dosagem hormonal inicial de homens..	86
5.5.1.5 Análise de variáveis exógenas e correlação com tratamento em homens..	86
5.5.1.5.1 Alteração de resultados perante tratamento x medicamentos em homens.	86
5.5.1.5.2 Alteração de resultados perante tratamentos capilares anteriores para homens.....	87
5.5.2 Avaliação dos efeitos da loção capilar em seres humanos – mulheres.....	87
5.5.2.1 Análise subjetiva – avaliação dos pacientes mulheres ao tratamento.....	88
5.5.2.2 Análise macroscópica de couro cabeludo realizada em pacientes mulheres.....	88
5.5.2.3 Análise Microscópica de Couro Cabeludo de Pacientes Mulheres.....	90
5.5.2.4 Análise de variáveis endógenas e correlação com o tratamento com loção teste em mulheres.....	91
5.5.2.4.1 Alteração de resultados perante a idade de mulheres.....	91
5.5.2.4.2 Alteração de resultados perante a dosagem hormonal inicial de mulheres.....	91
5.5.2.5 Análise de variáveis exógenas e correlação com tratamento em mulheres	92
5.5.2.5.1 Alteração de resultados perante tratamento x medicamentos em mulheres.....	92
5.5.2.5.2 Alteração de resultados perante tratamentos capilares anteriores para mulheres.....	93
6 DISCUSSÃO.....	94
7 CONCLUSÃO.....	100
REFERENCIAS.....	101
ANEXO A – Certificado de aprovação na Comissão de Ética no uso de animais.....	107
ANEXO B – Parecer consubstanciado do CEP.....	108
ANEXO C – Termo de consentimento livre e esclarecido.....	112
ANEXO D – Ficha de autoavaliação inicial entregue aos pacientes..	116
ANEXO E – Ficha de autoavaliação de 30, 60 e 90 dias entregue aos pacientes.....	119

1 INTRODUÇÃO

A vida estressante que os seres humanos levam hoje em dia afeta o organismo de diversas maneiras. A queda capilar é a mais comum afetando homens e mulheres. Conhecida como alopecia, tem impacto significativo na aparência tanto de homens como das mulheres, podendo levar a casos sérios de depressão e até ao suicídio. Os cabelos são uma grande preocupação em praticamente todas as culturas, representando sinal de saúde, higiene, força, beleza, estando intimamente ligado à autoestima. Segundo a Sociedade Brasileira de Dermatologia, estima-se que 1,7% da população apresente um episódio de alopecia ao menos uma vez na vida. A alopecia pode levar a perda parcial ou total dos cabelos, sendo mais comum em homens. Em homens, a perda de cabelo tende a ser no topo do couro cabeludo, e nas mulheres, de maneira mais difusa.

As causas de alopecia são várias e envolvem fatores como: doenças, deficiências nutricionais, idade, efeitos hormonais e estresse, além de tratamentos quimioterápicos (Choi *et al.*, 2014). A causa mais comum é a ação hormonal da diidrotestosterona (DHT), forma ativa do hormônio testosterona. A DHT é formada a partir da conversão enzimática da testosterona pela enzima 5- α -redutase. As células da papila dérmica são afetadas principalmente por DHT dentre todos os hormônios andrógenos. Esse hormônio aumenta o risco de queda capilar por alterar o ciclo de crescimento do cabelo (Patel *et al.*, 2015).

O tratamento atual, e mais corriqueiro, é o uso tópico de minoxidil, utilizado tanto para homens quanto para as mulheres. O tratamento é longo, podendo gerar resultados satisfatórios apenas após um ano de uso e não é suficientemente eficaz (Harfmann e Bechtel, 2015). Associado a ele os homens tem outra alternativa, que é o uso oral do medicamento finasterida. Porém, este produto reduz em até 2/3 a quantidade de DHT livre e é relatado, em vários pacientes, um efeito adverso indesejável como a impotência e perda de desejo sexual. Outros efeitos associados ao uso de finasterida são: ansiedade/depressão, rigidez muscular, cólicas, tremores e fadiga crônica (Caruso *et al.*, 2015). Em mulheres a sua eficácia não foi comprovada e seu uso não é indicado (Price *et al.*, 2000).

O fungo *Ganoderma lucidum* é comumente utilizado na medicina chinesa e tem chamado a atenção por seus metabólitos de estrutura altamente diversificada com propriedades químicas e biológicas, principalmente sob o sistema autoimune

(Habijanac *et al.*, 2015; Guo *et al.*, 2009; Bao *et al.*, 2002). Estudos foram feitos utilizando seus polissacarídeos e efeitos citotóxicos em células tumorais e foram comprovados como nos cânceres de mama, atividade antioxidante, atividade inibitória da protease HIV-1, supressão de resposta inflamatória e efeitos neuroprotetores entre outros (Min *et al.*, 1998, 2001; Sliva *et al.*, 2003; Dudhgaonkar *et al.*, 2009; Smina *et al.*, 2011; Zhou *et al.*, 2012).

Em busca de substâncias naturais que pudessem ser utilizadas no tratamento do câncer de próstata, os compostos bioativos do fungo *G. lucidum* mostraram eficácia (Sliva *et al.*, 2003). O método pelo qual essas moléculas agem no combate ao câncer de próstata não está completamente elucidado. Mas, uma importante forma de ação descrita foi a atividade inibitória da enzima 5- α -redutase, responsável pela conversão de testosterona em DHT (Liu *et al.*, 2006, 2012; Zhang *et al.*, 2016). Com esta informação levantou-se a hipótese que compostos de *G. lucidum* poderia ser usado na prevenção e tratamento à alopecia, por diminuição dos níveis de DHT ou outras alterações que possam acontecer em células de folículos capilares. Uma vez comprovada a primeira hipótese, espera-se encontrar a dosagem ideal de extrato para que essa loção seja capaz de cessar a queda capilar, aumentar a quantidade e qualidade dos fios de cabelo, independente de interferentes como idade, medicamentos ou tratamentos anteriores, e que seja de fácil utilização e esteja à disposição de toda a população que sofre com esse problema.

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 Objetivo Geral

Produzir uma loção capilar obtida a partir de biocompostos extraídos de esporos do fungo *Ganoderma lucidum*, e comprovar sua eficácia no tratamento de alopecia em humanos e melhora da qualidade dos fios de cabelo.

1.1.2 Objetivos Específicos

- desenvolver método de rompimento para romper os esporos de *Ganoderma lucidum*;

- extrair compostos bioativos de esporos do fungo *G. lucidum*;
- formular uma loção capilar contendo esses compostos que seja estável de acordo com os padrões exigidos pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA);
 - avaliar a eficácia da loção em modelo animal para observar os efeitos referentes ao crescimento capilar;
 - testar o potencial da loção formulada no tratamento a alopecia em humanos;
 - definir doses efetivas de extrato de esporos de *G. lucidum* na loção, para crescimento capilar em homens e mulheres, levando em consideração alterações hormonais, medicamentosas e de faixa etária;
 - avaliar outros parâmetros como: melhoras nos fios de cabelo, como aumento de brilho, resistência, volume.

2 REVISÃO DE LITERATURA

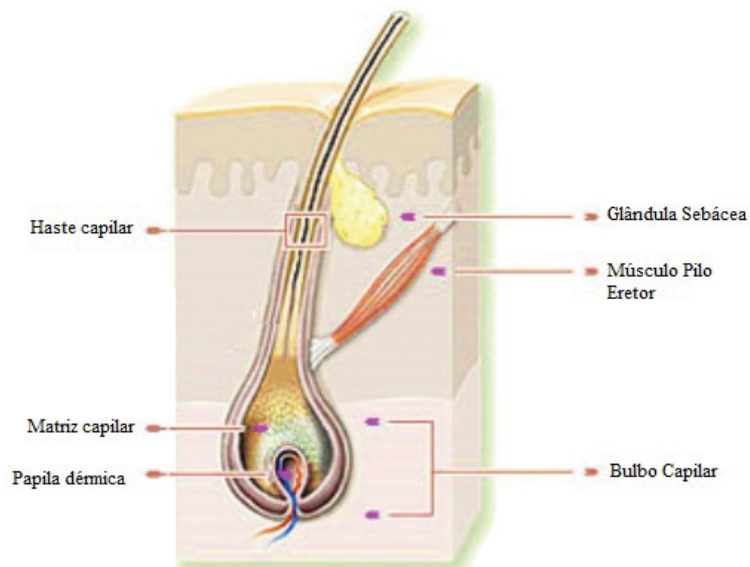
2.1 CABELO

O cabelo é uma estrutura própria dos mamíferos. Em humanos, protege a pele contra danos mecânicos, contra raios ultravioletas e facilita o controle homeotérmico. Outras funções podem ser conferidas ao cabelo, como o aumento da percepção da superfície da pele para estímulos táteis e importante papel na comunicação social e sexual, variando conforme a cultura de cada região. Uma desordem no seu crescimento, como perda de cabelo ou hirsutismo, apresenta um fator psicológico de alto impacto na qualidade de vida dos seres humanos (Randall e Botchkareva, 2009; Buffoli *et al.*, 2014).

O cabelo tem duas estruturas (Figura 1). A haste, que é uma estrutura tubular, longa (maior de 2 cm), fina (geralmente com pouco mais de 60 µm de diâmetro) e flexível, de células epiteliais queratinizadas e visível na superfície da epiderme. A outra estrutura se estende por mais de 3 mm e está na camada mais profunda da pele, derme, sendo a estrutura viva do cabelo: os folículos capilares, de crescimento epitelial cilíndrico, anexo à glândula sebácea, que se amplia na base dentro do bulbo capilar, envolvendo a papila dérmica mesenquimal (Buffoli *et al.*, 2014). O resto do corpo humano é recoberto com velus, um cabelo independente de hormônio, curto (menos de 2 cm), fino (diâmetro menor que 30 µm), sem pigmentação e que se estende por apenas 1 mm dentro da derme (Vogt *et al.*, 2007; Wosicka e Cal, 2010).

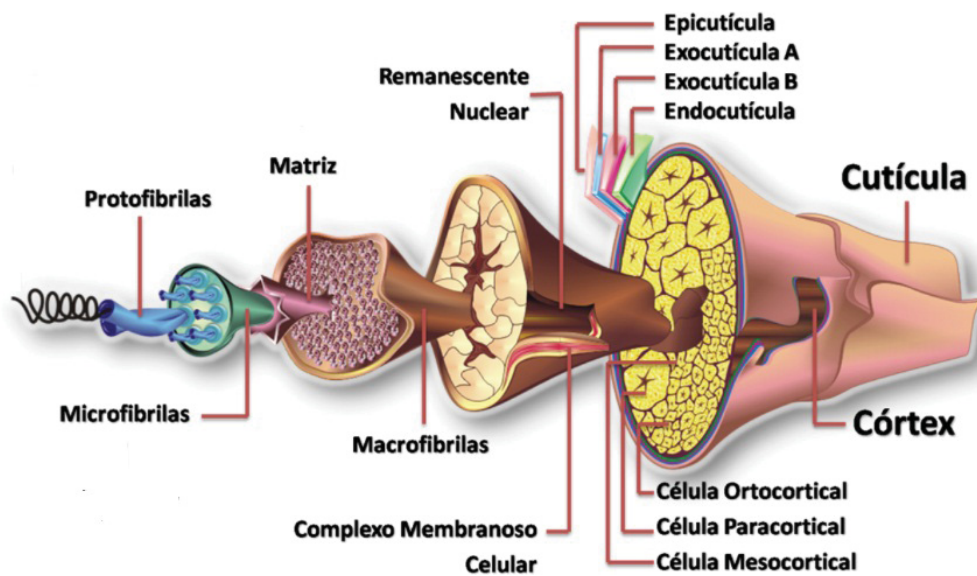
A haste do cabelo (Figura 2) consiste do córtex, das células cuticulares e da medula. A medula é a parte central do cabelo. O córtex representa a maior composição de fibras, tem um papel muito importante nas propriedades físicas e mecânicas do cabelo, e é a parte periférica, composta aproximadamente de 50-60% de microfibrilas (hastes de microfibrilas incorporadas em uma matriz). A cutícula recobre a haste do cabelo desde a sua raiz até o topo da epiderme, e é formada por células sobrepostas planas, formada por várias estruturas sublamelares (a epicutícula, a exocutícula A, a exocutícula B e a endocutícula). A integridade e as propriedades da cutícula tem um papel importante na proteção do córtex à danos físicos e químicos e na manutenção da limpeza e do desembaraço do cabelo, com um grande impacto na sua aparência (Randall e Botchkareva, 2009; Buffoli *et al.*, 2014).

FIGURA 1 – ESTRUTURAS BÁSICAS DO FOLICULO CAPILAR.



FONTE: Adaptado de Innovacion Capilar.

FIGURA 2 – ESTRUTURA DA HASTE CAPILAR.



FONTE: Adaptado de Eroschenko, 2008.

O folículo capilar é a estrutura essencial para o crescimento do cabelo. O folículo é uma invaginação epidérmica que se estende até a hipoderme. É composto por bainha radicular externa, bainha radicular interna e bulbo capilar (Randall e Botchkareva, 2009; Buffoli *et al.*, 2014).

A bainha radicular externa é um reservatório de células tronco multipotentes (queratinócitos e melanócitos) e queratinócitos. Essa bainha forma uma protuberância entre a inserção do músculo pilo erector e o ducto da glândula sebácea. Ao lado dérmico da bainha existe um arranjo de duas camadas de fibras colágenas, a camada vítrea (Azulay e Azulay, 2008; Randall e Botchkareva, 2009).

A bainha radicular interna consiste de 3 camadas: a camada de Henley, a camada de Huxley e a cutícula. A camada cuticular prende a haste do cabelo ao folículo. As células da bainha radicular interna produzem queratina e trico-hialina, que servem como um cimento intracelular, dando força à bainha radicular interna para suportar e moldar o crescimento da haste do cabelo, bem como guiar seu movimento para cima. A bainha radicular interna separa a haste do cabelo da bainha radicular externa (Azulay e Azulay, 2008; Randall e Botchkareva, 2009).

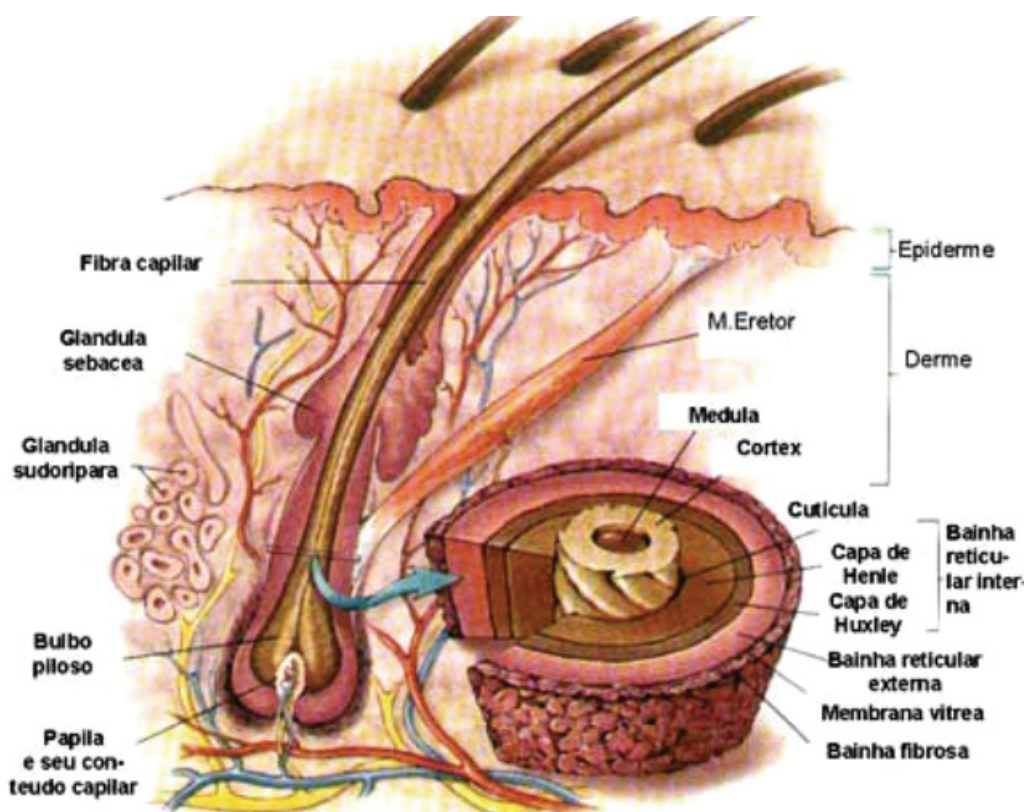
O bulbo capilar é a porção do folículo que ativamente produz o cabelo. Ele inclui a papila dérmica folicular, células da papila dérmica, mucopolissacarídeos ricos em estroma, fibras nervosas e um loop capilar único. Acima do bulbo, o folículo é composto de duas partes anatômicas: o infundíbulo e o istmo. O infundíbulo é uma estrutura em forma de funil preenchida com sebo, produzido pela glândula sebácea. Ele se estende da superfície da pele ao ducto sebáceo, serve como um reservatório e fornece uma interface para interações das células associadas ao folículo piloso. O istmo se estende do ducto da glândula sebácea à inserção do músculo pilo erector (Figura 3) (Azulay e Azulay, 2008; Randall e Botchkareva, 2009).

Os folículos capilares produzem os fios de cabelo passando pelo mesmo ciclo repetitivo de crescimento (Figura 4), alternando entre as fases de crescimento ativo (anágena), de transição (catágena) e de repouso (telógena) (Oh *et al.*, 2016). A duração de cada ciclo é coordenada por diversos hormônios e citocinas, e depende de alguns fatores como idade, estágio de desenvolvimento do indivíduo, hábitos nutricionais, e alterações ambientais, como a luz do dia (Buffoli *et al.*, 2014).

Normalmente, a fase anágena dura entre dois e seis anos e é essencial para a formação do cabelo saudável. Essa fase pode ser subdividida em seis outras etapas.

Na etapa anágena I a V (pró anágena) as células progenitoras se proliferam, englobam a papila dérmica em crescimento, crescem dentro da pele e começam a diferenciação em haste capilar e bainha radicular interna; a haste formada começa o desenvolvimento e os melanócitos localizados na matriz começam a produção de pigmentos. A etapa anágena VI (meta anágena) é na qual há a restauração total da unidade produtora da fibra de cabelo, que é caracterizada pela formação do bulbo capilar circundando a papila dérmica, e uma nova haste capilar aparece na superfície da pele. O metabolismo da papila dérmica é bastante ativo e garante a rápida divisão celular. Nesta fase o cabelo é bastante sensível e qualquer alteração, como estresse ou deficiência nutricional, pode limitar o seu crescimento (Krause e Foitzik, 2006; Buffoli *et al.*, 2014; Panteleyev, 2016).

FIGURA 3 – ESTRUTURAS CAPILARES AMPLIADAS.

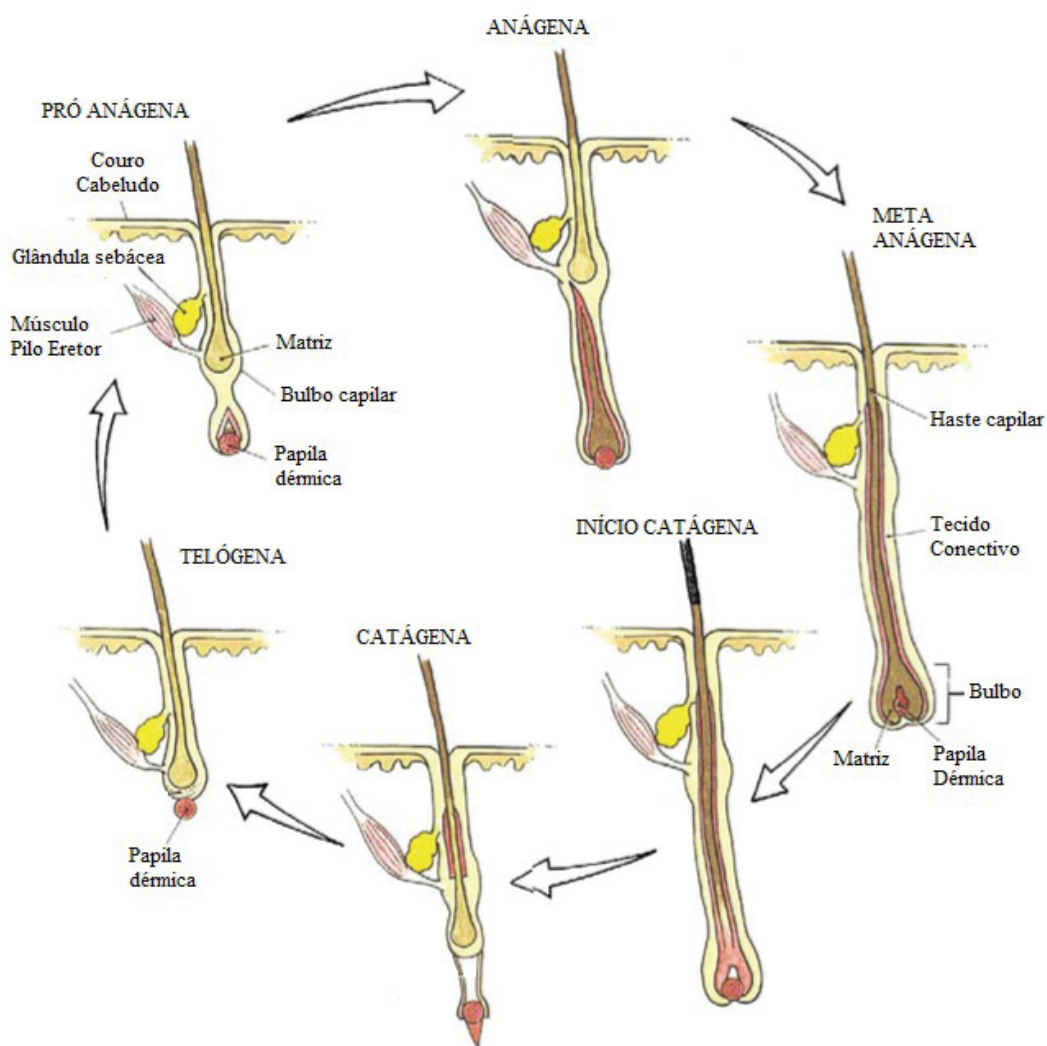


FONTE: Adaptado de Azulay e Azulai, 2008.

A fase catágena inicia logo após o término da fase anágena, e caracteriza-se pela redução significativa da diferenciação e proliferação da matriz capilar em queratinócitos e pelo término da produção do pigmento melanócito. Essa fase dura apenas algumas semanas. O folículo capilar diminui em torno de 1/6 do tamanho

original. A haste capilar se solta do folículo e sobe para o couro cabeludo (Krause e Foitzik, 2006; Buffoli *et al.*, 2014; Panteleyev, 2016).

FIGURA 4 – FASES DO CRESCIMENTO CAPILAR.



FONTE: Adaptado de Johnstone e Albert, 2002.

A fase telógena começa quando a fase catágena termina e pode durar de três a oito meses. Nesta fase não há crescimento capilar, a papila dérmica entra em repouso e o cabelo cai por si só ou é empurrado para fora pelo cabelo que começa a nascer. Os folículos em fase telógena são caracterizados por uma falta de produção de pigmento melanócito e bainha radicular interna. A papila dérmica está intimamente ligada a uma pequena cápsula de queratinócitos secundários contendo células tronco do

folículo capilar. Aproximadamente 15% dos folículos capilares estão em fase telógena a qualquer momento (Krause e Foitzik, 2006; Randall e Botchkareva, 2009; Buffoli *et al.*, 2014; Langan *et al.*, 2015; Panteleyev, 2016). Um pequeno aumento na porcentagem dos folículos telógenos já é o necessário para que surjam as falhas de cabelo (Oh *et al.*, 2016).

O conhecimento do mecanismo do ciclo capilar é essencial ao entendimento das desordens capilares.

2.1.1 Queda capilar

2.1.1.1 Impacto psicossocial e sócio cultural

A vida estressada e depressiva em que vivemos afeta nosso corpo de diversas maneiras, e a mais comum delas é pela queda capilar. A cada ano que passa o número de pessoas calvas cresce exponencialmente, principalmente mulheres com menos de 40 anos de idade, que sofrem de queda capilar devido a uma rotina de vida cada vez mais estressante.

Em um mundo onde a aparência é supervalorizada, a queda capilar é mais significativa social e psicologicamente do que biologicamente importante, levando à quadros sérios de depressão e até ao suicídio (Harfmann e Bechtel, 2015). É socialmente aceito que homens fiquem calvos, porém não as mulheres. Apenas uma pequena parcela da população não se incomoda com a calvície, afirmando que faz parte do envelhecimento. A grande maioria chega até a mudar seus hábitos evitando a socialização (Buffoli *et al.*, 2014). Alguns pacientes recusam tratamentos quimioterápicos por medo de perder os cabelos (Oh *et al.*, 2014).

Segundo a Sociedade Brasileira de Dermatologia estima-se que cerca de cinco milhões de pessoas tenham alopecia, e que 5% delas perdem todos os pelos do corpo. Estima-se que cerca de 1,7% da população apresente pelo menos um episódio de alopecia durante a vida (Rivitti, 2005).

A incidência da alopecia em homens é de cerca de 50% dos afetados com mais de 50 anos (Avram *et al.*, 2008), porém 60% dos doentes apresentam o primeiro episódio da doença antes dos 20 anos (Rivitti, 2005). A maioria das mulheres começam a ter queda de cabelo depois dos 50 anos, porém pode ocorrer a qualquer

momento depois da menarca. Por volta dos 70 anos de idade, mais da metade das mulheres tem sinais de alopecia (Mesinkovska e Bergfeld, 2015).

2.1.2 Principais tipos e causas de alopecia

Os tipos de alopecia podem ser divididos em dois: não cicatriciais e cicatriciais.

2.1.2.1 Alopecia cicatricial

A perda de cabelo cicatricial é causada por agentes físicos ou químicos, como traumas ou queimaduras; infecções fungicas, bacterianas, treponêmicas (sífilis tardia), tripanossomica (leishmaniose) ou viróticas (herpes simples, varicela, zoster); neoplasias (carcinoma, linfoma, metástase); ou dermatoses (pseudopelada, lúpus eritematoso, foliculites, entre outros). Caracteriza-se pela destruição dos folículos capilares (Radwanski *et al.*, 2009).

2.1.2.2 Alopecia não cicatricial

As causas de alopecia não cicatricial são várias e envolvem fatores como: doenças, deficiências nutricionais, idade, estresse, efeitos hormonais, entre outros (Choi *et al.*, 2014).

2.1.2.2.1 Alopecia androgenética

Com exceção dos cílios e das sobrancelhas, o cabelo humano é dependente de regulação hormonal. O principal hormônio com ação direta sobre a regulação dos cabelos é a diidrotestosterona (DHT). O DHT é formada a partir da conversão intracelular enzimática da testosterona pela enzima 5- α -redutase. Esse hormônio aumenta o risco de queda por provocar a diminuição da fase anágena e a miniaturização dos folículos capilares resultando em uma aceleração do afinamento e encurtamento dos fios (Randall e Botchkareva, 2009; Harfmann e Bechtel, 2015; Patel *et al.*, 2015).

Depois da sua conversão, o DHT se liga ao receptor andrógeno e age no fator de transcrição para genes andrógeno dependentes. No couro cabeludo calvo, a concentração de 5- α -redutase é aumentada, aumentando também a produção de DHT. A concentração de receptor andrógeno também aumenta, o que leva à abundância de genes andrógeno dependentes. Tudo isso ocorre na papila dérmica, que é onde ocorre a formação do folículo piloso. A relação entre moléculas indutoras/repressoras do folículo, enviadas pela papila dérmica e as células epiteliais, determina o tamanho da papila dérmica. Alterações no tamanho do cabelo podem causar diminuição do volume da papila dérmica e na quantidade de células do folículo, mas a relação entre cabelo e tamanho da papila dérmica continua constante. Isso sugere que alterações dentro da própria papila dérmica são o alvo para modificações andrógenas no ciclo do cabelo e na miniaturização do folículo (Schweiger, Boychenko e Bernstein, 2010).

A enzima que converte a testosterona em DHT, a 5- α -redutase, apresenta duas isoformas em humanos: tipo 1 e tipo 2. A isoenzima tipo 1 é encontrada no fígado, glândula sebácea e possivelmente na região infraindibular dos folículos capilares presentes no couro cabeludo. O tipo 2 da enzima 5- α -redutase é encontrada na próstata, na genitália masculina, nas bainhas radiculares dos folículos pilosos, e no fígado. Homens que nascem com deficiência genética no tipo 2 dessa enzima não desenvolvem alopecia androgenética. Associada a essa observação, constatou-se que a pele do couro cabeludo calvo apresenta aumento na isoenzima tipo 2 e elevados níveis de DHT. Concluiu-se então que a isoenzima tipo 2 deve ser o alvo no tratamento de alopecia androgenética (Price *et al.*, 2000).

A questão genética influencia na dependência andrógena do crescimento capilar. Caucasianos apresentam uma taxa de crescimento maior que a de japoneses, apesar dos níveis de testosterona serem similares, e homens africanos apresentam muito menos alopecia. Muitos genes tem sido estudados comparando pessoas calvas e não calvas, onde diferenças entre alelos e sequencias gênicas tem justificado a sensibilidade dos receptores a esses hormônios (Randall e Botchkareva, 2009).

Os hormônios estrógenos são capazes de modificar o metabolismo andrógeno dentro de subunidades distintas do folículo capilar (ex: na papila dérmica), diminuindo a quantidade de DHT formado. Esse fenômeno que ocorre em humanos é chamado de aromatização, pela qual a testosterona presente, ao invés de ser

convertida em DHT, tem sua rota metabólica desviada para a conversão de estradiol, pela enzima aromatase (Ohnemus *et al.*, 2006).

A ampla distribuição de receptores estrógenos nas unidades pilosebáceas de humanos sugerem que os estrógenos desenvolvam um papel importante também na manutenção e na regulação do folículo capilar. Em um estudo de imunoreatividade dos receptores estrógenos foi constatado que, na etapa IV da fase anágena, há uma notável diferença entre homens e mulheres na distribuição desses receptores em folículos da pele frontotemporal. Para os homens, a quantidade predominante foi encontrada na matriz de queratinócitos, enquanto para mulheres, foi predominante na papila dérmica. Esse resultado mostra a importância do órgão alvo de ação do estradiol e sua localização no efeito paradoxal aos hormônios andrógenos (Schweiger, Boychenko e Bernstein, 2010). Nessa mesma região da pele, em mulheres, há um alto nível da enzima aromatase, aumentando a conversão de testosterona em estradiol nessa região, explicando a preservação de cabelo na linha frontal que é mais acentuada nas mulheres ao contrário dos homens (Harfmann e Bechtel, 2015).

Outra constatação importante do papel do estradiol na manutenção capilar é o papel protetor dos mesmos nas mulheres: esse hormônio prolonga o ciclo na fase anágena, evidenciado por seus altos níveis em idade fértil e gravidez. Na fase de pós parto esse hormônio cai, a fase catágena e telógena são altamente induzidas e há uma maior queda capilar (Randall e Botchkareva, 2009; Harfmann e Bechtel, 2015).

Outra causa da alopecia é o estresse psicoemocional severo. Nessas condições, acredita-se que o hormônio adrenocorticotrófico, cujo produto final é o cortisol, possa ser o responsável. Ele é liberado e pode agir diretamente como um peptídeo pro inflamatório ou agir pela ativação de mastócitos (células do sistema imunológico), levando a destruição do folículo capilar (Kim *et al.*, 2006).

2.1.2.2.2 Eflúvio telógeno

O eflúvio telógeno é outro tipo de alopecia não cicatricial e mais comum em mulheres. Caracteriza-se por uma anormalidade no ciclo do cabelo durante a qual uma porcentagem muito grande dos cabelos encontram-se na fase telógena (Harfmann e Bechtel, 2015).

Essa condição pode ser passageira, como ocorre, por exemplo, na situação de pós parto, onde os níveis de estradiol caem abruptamente e os folículos capilares são induzidos à fase telógena. Após o período de recuperação dos folículos, o cabelo volta a crescer normalmente (Harfmann e Bechtel, 2015).

Quando a condição de eflúvio telógeno não tem um gatilho, ele é considerado crônico, e acontece apenas em mulheres. A maioria dessas pacientes apresentam evidências histológicas de miniaturização folicular (Harfmann e Bechtel, 2015), sendo comumente confundido com a alopecia androgenética. Nesses casos, compara-se áreas sensíveis aos andrógenos (frontotemporal) a áreas não sensíveis (região occipital). No eflúvio telógeno são encontrados folículos vazios e numerosos cabelos curtos nascendo com espessura normal (Tosti e Torres, 2009).

2.1.2.2.3 Alopecia areata

Alopecia areata são diagnosticadas por ausência de cabelo em locais bem delimitados, não difusos, como áreas circulares. É uma forma de alopecia rara e predominante em mulheres. Os achados dermatoscópicos são claros na diferenciação desse tipo de alopecia: pontos enegrecidos, pontos amarelados, cabelos velus curtos, cabelos facilmente dobráveis com efeito cotovelo, entre outros (Inui *et al.*, 2008; Tosti e Torres, 2009; Molina *et al.*, 2011).

2.1.3 Tratamentos disponíveis

O tratamento atual e mais corriqueiro é o uso tópico de minoxidil. Essa substância era usada inicialmente como um agente anti-hipertensivo, e o efeito promotor de crescimento capilar era considerado um efeito adverso. O minoxidil é convertido em sulfato de minoxidil após sua aplicação. O seu mecanismo de ação não está completamente elucidado, mas acredita-se que ele aja de mais de uma maneira: aumentando o fluxo sanguíneo ao redor do folículo capilar, o que estimula a proliferação celular; diminuindo a fase telógena e estimulando a fase anágena, prolongando-a e estimulando o crescimento do fio de cabelo e o aumento do seu diâmetro; e recentes estudos têm evidenciado que o minoxidil abre canais de potássio sensíveis à adenosina trifosfato (ATP) na papila dérmica, o que causa o relaxamento

do músculo liso vascular, aumentando o fluxo sanguíneo cutâneo (Randall e Botchkareva, 2009; Higgins e Christiano, 2014; Choe *et al.*, 2017).

A resposta clínica ao minoxidil varia dependendo da sua concentração, preconizada em 5% para homens e 2 a 5% para mulheres. Essa variação na faixa de dosagem pode indicar que há uma sensibilidade genética ou outros fatores ambientais que contribuam na eficácia do minoxidil (Mulinari-Brenner, Seidel e Hepp, 2011; Higgins e Christiano, 2014). O pico de ação ocorre por volta de 16 semanas de uso, e após seis meses de descontinuação do tratamento o quadro de alopecia volta ao seu estágio inicial (Mulinari-Brenner, Seidel e Hepp, 2011; Choe *et al.*, 2017). Os efeitos adversos observados são aumento de prurido, irritação local, hipertricose facial (principalmente em mulheres), dermatite de contato, caspa e ressecamento do cabelo (Mulinari-Brenner, Seidel e Hepp, 2011; Harfmann e Bechtel, 2015).

A finasterida, medicamento oral bastante utilizado no tratamento da alopecia, era inicialmente utilizada para tratamento de hiperplasia benigna da próstata (Higgins e Christiano, 2014). Esse medicamento inibe a enzima 5- α -redutase tipo II, responsável pela conversão de testosterona em DHT e consequente queda capilar (Higgins e Christiano, 2014; Harfmann e Bechtel, 2015).

Apesar de aprovado pela Food and Drug Administration (FDA) como um medicamento para queda capilar, há diversos relatos na literatura dos efeitos adversos graves da finasterida e de sua não eficácia, principalmente em mulheres (Harfmann e Bechtel, 2015). Price *et al.* (2000) analisaram o crescimento de cabelos em pacientes mulheres utilizando finasterida quando comparados a um grupo placebo, e não observaram diferença significativa. Os pacientes, em respostas a um questionário de auto avaliação, também não viram crescimento capilar após 12 meses de uso. A biopsia de couro cabeludo e as fotos analisadas por especialistas da área acabaram por confirmar a sua não eficácia.

Quanto aos efeitos adversos, eles são relatados mesmo quando a dosagem usual indicada (1 mg por dia) não é ultrapassada. Os mais comuns são perda de libido, disfunção erétil, dores de cabeça, náuseas, ondas de calor, quadros de ansiedade e depressão (Harfmann e Bechtel, 2015). Um estudo realizado em 2015 (Caruso *et al.*) mostrou que os efeitos adversos de ansiedade e depressão persistem mesmo após o término do tratamento com finasterida, pois está associada com alterações nos níveis de esteroides neuroativadores, tanto homens quanto mulheres. O efeito inibidor de

5- α -redutase foi observado juntamente com uma diminuição de metabólitos da testosterona, de progesterona, estradiol, entre outros hormônios no plasma sanguíneo dos pacientes. Nas mulheres, um dos maiores motivos do não uso de finasterida é seu efeito adverso considerado mais grave: a sua teratogenicidade e feminização de feto masculino. Um efeito adverso ligado apenas ao sexo masculino é o câncer de mama, porém, mais estudos em relação a isso são necessários para poder concluir sobre o tema (Harfmann e Bechtel, 2015).

Outro agente tópico utilizado tem sido os estrógenos, principalmente para mulheres (Harfmann e Bechtel, 2015). O estradiol, estrógeno utilizado, aumenta a taxa de proliferação celular, diminui a taxa de diferenciação e, assim, posterga a fase telógena (Ohnemus *et al.*, 2006). Acredita-se que a ação do estradiol é a supressão da enzima 5- α -redutase, e indução da atividade de aromatase nos folículos capilares, aumentando a conversão de testosterona em estradiol, ao invés de DHT (Choe *et al.*, 2017). Kim *et al.* (2012) mostraram que os fios de cabelo continuaram a diminuir seu diâmetro mesmo com o uso de estradiol tópico. Estradiol tópico não é recomendado para homens, pois pode causar ginecomastia devido as altas doses necessárias para a visualização de resultados positivos. Nesses casos, o esteroisomero 17- α -estradiol pode ser prescrito por um médico. Soluções contendo benzoato de estradiol, valerato de estradiol ou 17- β -estradiol estão disponíveis comercialmente tanto para homens quanto para mulheres, apesar de toda a controvérsia sobre seu uso (Ohnemus *et al.*, 2006).

A flutamida, inicialmente utilizada no tratamento de câncer de próstata, é um antiandrógeno (bloqueador competitivo de receptor andrógeno) não esteroideal que demonstra efeitos no crescimento do cabelo. Teve seu uso proibido para esse fim no Brasil em 2008, pela Agência Nacional da Vigilância Sanitária (ANVISA) devido seus graves efeitos colaterais hepáticos, quando administrado sistematicamente. Tem efeito teratogênico, diminuidor de libido, e pode causar graves alterações no sistema cardiovascular (Mulinari-Brenner, Seidel e Hepp, 2011; Harfmann e Bechtel, 2015).

A espironolactona é um inibidor da aldosterona, que age bloqueando o receptor androgênico e inibe a síntese de andrógenos. Apesar de não haver aprovação da FDA para uso dermatológico, e nenhum estudo de centro de pesquisa autorizado (apenas relatos de casos e ensaios não reconhecidos), seu uso está indicado apenas para mulheres, devido ao alto risco de feminização aos homens. A dosagem indicada

é de 50 a 300 mg por dia. Os efeitos adversos são passageiros e incluem hipotensão ortostática, irregularidades no ciclo menstrual, náuseas, dores de cabeça, perda de peso, ressecamento da pele, aumento da frequência urinária e fadiga. Esse medicamento não é recomendado para mulheres grávidas ou em fase de amamentação (Mulinari-Brenner, Seidel e Hepp, 2011; Harfmann e Bechtel, 2015).

O acetato de ciproterona é um esteroide sintético que compete com o DHT no sítio de ligação dos receptores andrógenos. Sua eficácia é controversa e seus efeitos adversos incluem aumento de peso, fadiga, diminuição da libido, hepatotoxicidade, depressão, náuseas, dores de cabeça, teratogenicidade e feminização do feto masculino (Mulinari-Brenner, Seidel e Hepp, 2011; Harfmann e Bechtel, 2015).

Polivitamínicos e suplementos são utilizados no tratamento de alopecia, mas não há nenhuma prova de que eles realmente funcionem (Harfmann e Bechtel, 2015). Em pacientes com deficiência de ferro observa-se, geralmente, a ocorrência de eflúvio telógeno, o que é resolvido pela reposição desse elemento (Mulinari-Brenner, Seidel e Hepp, 2011).

O tratamento a laser consiste em um mecanismo não bem definido, mas acredita-se que seja na ativação de folículos capilares adormecidos, aumentando o fluxo sanguíneo ou regulando positivamente a produção de ATP (Randall e Botchkareva, 2009; Harfmann e Bechtel, 2015).

A combinação de medicações com diferentes mecanismos de ação é amplamente utilizada para aumentar o sucesso do tratamento (Harfmann e Bechtel, 2015; Choe *et al.*, 2017).

Outra alternativa é o implante capilar. Folículos capilares andrógeno-independentes são retirados da base do couro cabeludo e recolocados nas áreas calvas (Randall e Botchkareva, 2009). Essa é uma solução ainda cara, agressiva e dolorosa, que envolve riscos e deixa cicatrizes, além do aspecto artificial que o cabelo novo pode ter, conhecido como “cabelo de boneca” (Harfmann e Bechtel, 2015).

2.1.4 Potencial econômico

Uma vez que um fio de cabelo fino e danificado emerge do couro cabeludo, não há maneira eficiente de tratá-lo. O couro cabeludo deve ser normalizado primeiro.

Os cosméticos são a forma de minimizar esses impactos recuperando os folículos capilares, sem maiores efeitos adversos ao paciente (Schwartz *et al.*, 2015).

Uma indústria multibilionária ao redor do mundo tenta encontrar métodos de resolver o problema de alopecia através de procedimentos e produtos estimulantes, como vitaminas, ervas exóticas, aminoácidos, que não foram submetidas a estudos para comprovação de eficácia (Ohnemus *et al.*, 2006; Hyde, Bahkali e Moslen, 2010).

Existem soluções temporárias, como perucas ou apliques, que disfarçam a alopecia e são procuradas por pessoas que não desejam algo tão invasivo como os tratamentos existentes, ou por pessoas frustradas após um tratamento de 6 a 12 meses sem os resultados esperados (Harfmann e Bechtel, 2015).

Diante desse cenário, o desenvolvimento de novos produtos no setor de cosméticos se faz cada vez mais necessário (Rivitti, 2005; Panteleyev, 2016). Nesse setor, os bioprodutos ganham cada vez mais espaço, por serem menos alergênicos e mais biocompatíveis, menos danosos ao meio ambiente, e, geralmente, mais viáveis economicamente.

O Brasil é o terceiro maior mercado consumidor de cosméticos do mundo, onde produtos capilares lideram esse ranking, sendo o único setor que cresce apesar da crise (Sociedade Brasileira de Dermatologia). De acordo com o veiculado pela revista da Associação Brasileira de Cosmetologia, grandes marcas, como Johnson e Johnson e L'oreal, estimam que o mercado cosmético tende a crescer cerca de 17% até 2020.

2.2 MACROMICETOS

2.2.1 *Ganoderma lucidum*

Os fungos são historicamente utilizados como ervas medicamentosas e suplementos na China e em outros países da Ásia (Murata *et al.*, 2016). Fujita e colaboradores (2005) compararam a atividade de 19 diferentes macromicetos e observaram que o *Ganoderma lucidum* apresentava uma atividade anti-androgênica bastante significativa.

Ganoderma lucidum também é conhecido como *Lingzhi* na China e *Reishi* no Japão, e consta na Farmacopeia Americana, no compendium Americano de Plantas Medicinais, bem como na Farmacopeia Chinesa (Wu *et al.*, 2013).

Esse fungo tem chamado a atenção por seus metabólitos de estrutura altamente diversificada com propriedades químicas e biológicas, principalmente sob o sistema autoimune (Bao *et al.*, 2002; Guo *et al.*, 2009; Habijanac *et al.*, 2015), sendo utilizado no tratamento de alergias, artrite, bronquite, inflamações, entre outros (Sliva, 2003).

As duas substâncias ativas de *Ganoderma lucidum* mais reportadas como tendo atividades benéficas à saúde são os polissacarídeos e os triterpenóides (Chen *et al.*, 2012). Estudos foram feitos utilizando seus polissacarídeos e efeitos citotóxicos em células tumorais foram comprovados (Min *et al.*, 2001), como nos cânceres de mama e próstata (Sliva *et al.*, 2003), além de atividade antioxidante (Smina *et al.*, 2011), atividade inibitória da protease HIV-1 (Min *et al.*, 1998), supressão de resposta inflamatória (Dudhgaonkar *et al.*, 2009), efeitos neuroprotetores (Zhou *et al.*, 2012), entre outros.

Outra propriedade interessante dos bioativos de *G. lucidum*, evidenciada na busca à uma alternativa de cura do câncer de próstata, é a inibição da enzima 5- α -redutase, responsável pela conversão de testosterona em DHT (Liu *et al.*, 2006a; Boh, 2012; Wu *et al.*, 2013; Zhang *et al.*, 2016). A pele é um dos tecidos responsivos a andrógeno onde se dá essa conversão. Aliada a todas as outras propriedades dos ativos desse fungo, ele pode ser cogitado como preventivo da queda capilar e no tratamento de outras doenças androgenéticas.

A inibição enzima 5- α -redutase com o uso de moléculas orgânicas tem sido estudada. Vários compostos esteroidais e não esteroidais foram desenhados e sintetizados como inibidores competitivos ou não competitivos dessa enzima. Entre eles podemos citar, como exemplo a finasterida, e, como já citado, todos os seus efeitos adversos. Para uma minimização desses efeitos, é que as moléculas orgânicas são tão desejáveis. Liu *et al.* (2006b) revelaram que a fração do extrato de *G. lucidum* significativa para a inibição da enzima 5- α -redutase, é basicamente composta por triterpenóides. Mais de 150 triterpenóides tem sido isolados e identificados do corpo de frutificação, dos micélios e dos esporos de *G. lucidum* (Liu *et al.*, 2015), sendo ao menos 50 triterpenóides únicos desse fungo e a maioria são ácidos ganodéricos (Boh, 2013; Wu *et al.*, 2013). O ácido ganodérico DM, cuja estrutura é análoga à do DHT,

apresenta função como inibidor da enzima 5- α -redutase (Wu *et al.*, 2013). Os esporos possuem cerca de 5 a 20 vezes mais triterpenoides que o corpo de frutificação, e após o rompimento celular o conteúdo de triterpenoides aumenta em 85% (Russel e Paterson, 2006; Liu *et al.*, 2012).

A qualidade e a quantidade do conteúdo de substâncias ativas presentes no fungo são de difícil controle, e variam de cepa para cepa, local e condições de cultivo, procedimento de processamento e formulação, e preparação (Boh, 2013).

Devido aos benefícios de *G. lucidum* na proteção da saúde humana e tratamento de muitas doenças, muitos produtos naturais contendo o fungo tem aparecido no mercado. Chás, pós, suplementos alimentares são consumidos ao redor do mundo todo. Essas formulações são preparadas de corpo de frutificação, micélio e esporos, sem danos à saúde humana (Russel e Paterson, 2006; Wu *et al.*, 2013).

As características do fungo citadas acima, aliadas ao crescimento do mercado cosmético, faz com que formulações cosmeceúticas contendo *G. lucidum* sejam desenvolvidas, principalmente a partir de seus esporos, pois apresentam maior quantidade de triterpenoides e potencial antioxidante.

3. METODOLOGIA

Uma vez estabelecidos os objetivos necessita-se buscar metodologias para realizar o trabalho proposto. Neste tópico abordaremos quias metodologias usadas e os critérios de escolha das mesmas.

3.1 ROMPIMENTO DOS ESPOROS

O método de rompimento de esporos escolhido foi baseado em estudos anteriores de Novak (2012). Novak (2012) testou os solventes descritos na literatura utilizados para esse fim (metanol, etanol, clorofórmio e éter) e demonstrou que o solvente água permite extrair a porção triterpênica dos esporos do fungo. Nos produtos medicinais em comércio na Ásia o extrato bruto é utilizado, sem qualquer tipo de intolerância ou toxicidade (Boh, 2012; Wu *et al.*, 2013). Assim, no presente trabalho optamos por utilizar água como solvente para extrair os biocompostos do esporo de *G. lucidum*.

3.2 LOÇÃO CAPILAR

Cosméticos são produtos aplicados topicamente e por isso, são melhor aceitos pelos consumidores (Hyde, Bahkali e Moslen, 2010). A loção capilar é uma alternativa cosmética para tratamentos capilares, tendo em vista que princípios ativos veiculados em xampus apresentam baixa absorção, pois permanecem por tempo insuficiente para ação no couro cabeludo (Mulinari-Brenner, Seidel e Hepp, 2011). A forma farmacêutica escolhida para veicular os ativos extraídos de *G. lucidum* foi a loção capilar sem enxágue, pela facilidade de uso e menor rejeição do consumidor.

3.3 MODELO ANIMAL

A avaliação de um composto indutor de crescimento capilar em cultura pode não ser condizente ao que ocorre no organismo, já que para esse processo o microambiente tem papel fundamental (Higgins e Christiano, 2014).

Os roedores como modelos experimentais são úteis para esse tipo de estudo. A fase anágena do couro cabeludo humano pode demorar muitos anos, enquanto a fase anágena da pele dorsal dos roedores dura apenas 2 a 3 semanas. O ciclo capilar é sincronizado nos roedores, diferente dos folículos capilares humanos, que não apresentam sincronia alguma entre si (Oh *et al.*, 2016). Os roedores mais utilizados são os camundongos da linhagem C57BL/06, por apresentarem pelagem negra, o que facilita a visualização do crescimento de pelos (Choi *et al.*, 2014). Por essas razões, foi escolhido este modelo animal para testes iniciais.

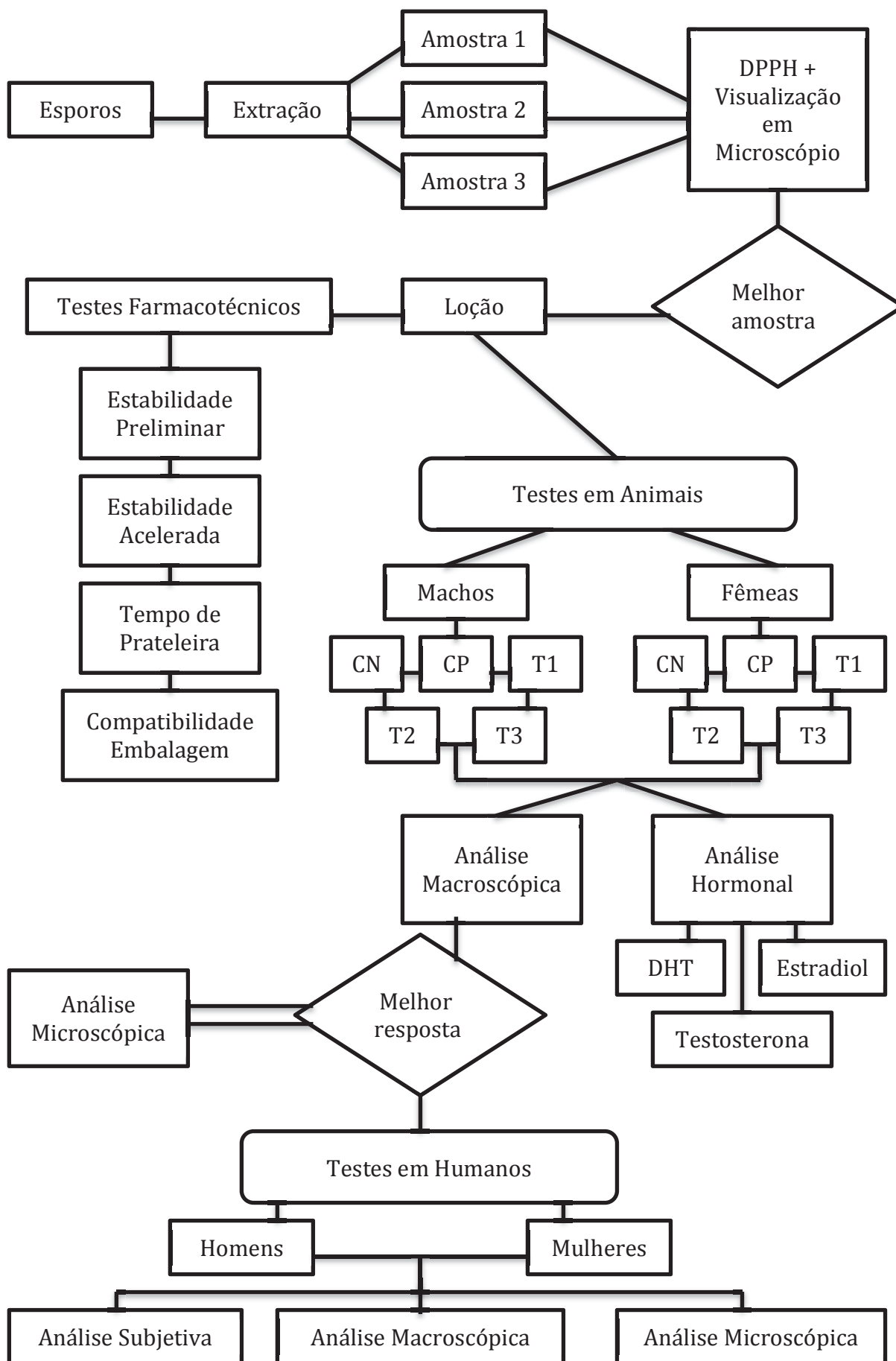
Para dosagem da resposta hormonal do tratamento em animais, foi eleito o método comumente utilizado para esse fim, o ensaio imunoenzimático (ELISA). Este teste permite a dosagem de anticorpos específicos pela interação antígeno-anticorpo, detectáveis por meio de reações enzimáticas.

3.4 TESTES EM HUMANO

Para cumprir com nossos objetivos e finalizar a última etapa deste trabalho, os testes foram realizados em 70 humanos, 35 homens e 35 mulheres. Análises subjetivas foram feitas através de questionário de auto-avaliação. O acompanhamento dos pacientes e a obtenção das imagens para análises posteriores foi feito por uma médica, de acordo com as recomendações do Comitê de Ética. As análises hormonais foram realizadas por testes de laboratório previamente autorizado (RioLab).

Todas as etapas necessárias para a realização da metodologia foram resumidas em fluxograma (Figura 5).

FIGURA 5 – FLUXOGRAMA DAS ETAPAS REALIZADAS NO ESTUDO.



4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 OBTENÇÃO DE EXTRATO DE ESPOROS DE *Ganoderma lucidum*

4.1.1 Método de extração de compostos bioativos

O método para obtenção do extrato de esporos de *Ganoderma lucidum* visando a extração de compostos bioativos, foi realizado por meio de método físico (maceração, contato com solvente e filtração). O protocolo utilizado foi adaptado com base nos estudos de Novak, 2013.

Os esporos mantidos a temperatura de -80°C, foram climatizados à temperatura ambiente em fluxo laminar esterilizado por luz UV. A extração de seus polissacarídeos foi feita em meio aquoso, respeitando a proporção de massa de esporos/solvente previamente definida de 1:32 (Novak, 2013).

O material foi macerado em cadinho com pistilo (amostra a); em cadinho com pistilo e adição de pérolas de vidro (amostra b); e em cadinho com pistilo, adição de pérolas de vidro e agitação em vórtex (amostra c), para avaliação do melhor método de ruptura celular. O solvente, água, foi acrescentado ao material. Essa solução aquosa do material a ser extraído foi incubado em shaker, sob uma agitação de 120 rpm e temperatura de 30°C, por 24 horas. Esse material foi incubado em estufa, por 24 horas, à temperatura de 60°C. Os compostos bioativos foram extraídos na porção aquosa e a massa celular foi separada do sobrenadante por filtração em papel filtro Whatman nº 01, por três vezes, para remoção completa dos debrís dos esporos. O sobrenadante separado foi denominado a partir daqui como extrato (Novak, 2013).

4.1.2 Avaliação do potencial antioxidante dos extratos

A análise da atividade antioxidante dos extratos foi feita por meio da metodologia de DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl), adaptado a partir de Rufino *et al*, 2007. Esse método baseia-se na redução de DPPH em difenil-picril-hidrazina por meio de um agente antioxidante. Essa reação é evidenciada pela modificação da cor púrpura do DPPH em amarela do difenil-picril-hidrazina, e consequente decréscimo de absorbância.

Uma alíquota de 0,5 mL de extrato foi adicionada à 4,95 mL do reagente de DPPH (DPPH em pó, P.A., diluído em metanol puro à 0,004%). A leitura foi feita em espectrofotômetro, a 517 nm, e comparado a um branco (apenas metanol).

O potencial antioxidante do extrato foi calculado utilizando a equação abaixo:

$$\text{Atividade Antioxidante (\%)} = \frac{(\text{Abs}_{(\text{branco})} - \text{Abs}_{(\text{amostra})}) \times 100}{\text{Abs}_{(\text{branco})}}$$

4.1.3 Avaliação da eficácia de rompimento celular por microscopia eletrônica de varredura

As amostras foram observadas antes e depois do rompimento celular em microscópio eletrônico de varredura (JEOL JSM 6360-LV).

O material foi fixado e desidratado com acetona e transferido para câmara de secagem ao ponto crítico de CO₂. Injetou-se CO₂ líquido até completa remoção da acetona, à 0°C. Logo o ponto crítico foi excedido, a câmara foi despressurizada até pressão atmosférica e as amostras foram removidas da câmara. As amostras foram montadas em suporte metálico e metalizadas com partículas de ouro para visualização em microscópio eletrônico.

4.2 PREPARO DA LOÇÃO

As loções capilares testadas foram 3 denominadas de tratamento 1 (T1), tratamento 2 (T2) e tratamento 3 (T3). Elas foram comparadas às loções controle positivo (CP) e controle negativo (CN).

A loção utilizada como CP foi feita à base de minoxidil 5%, fármaco amplamente utilizado nos tratamentos de calvície (Matos, 2014). A loção CN foi composta apenas do veículo utilizado em todas as outras loções, para que se exclua a hipótese de algum dos componentes veiculares exercerem a função esperada do extrato (ANVISA, 2012; Choi *et al.*, 2014). O veículo foi composto por 20% de tintura de *Passiflora*, 5% de óleos essenciais de bergamota e de laranja e solução hidro alcoólica qsp.

As loções T1, T2 e T3 foram preparadas incluindo ao veículo, o extrato de esporos de *G. lucidum*, com 1, 5 e 10% do extrato, respectivamente. Essas

concentrações foram preestabelecidas de acordo com estudos anteriores de Soccol, 2014.

4.2.1 Testes farmacotécnicos da loção capilar formulada

O Guia de Estabilidade de Produtos Cosméticos, da Agencia Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA (2004) recomenda que as formulações cosméticas sejam submetidas a um teste de centrifugação previamente aos testes de estabilidade. Uma amostra de cada uma das loções foram então centrifugadas a 2000 g durante 30 minutos.

Após estabilidade em teste de centrifugação, as amostras foram acondicionadas em frascos de vidro âmbar, com cânula de vidro e tampa de plástico, devidamente vedados. O *head space* utilizado em cada frasco foi o de aproximadamente um terço da capacidade total da embalagem, de acordo com o recomendado pela ANVISA (2004).

A escolha da embalagem de vidro e cânula com tampa foi feita para antecipar a avaliação da compatibilidade entre a formulação e a embalagem final escolhida (ANVISA, 2004).

4.2.1.1 Teste de estabilidade preliminar da loção capilar

A duração desse teste foi de quatro semanas, nos quais as formulações foram submetidas a condições de estresse visando acelerar o surgimento de possíveis sinais de instabilidade. Os ciclos aos quais as amostras foram submetidas foram: 24 horas a $40 \pm 2^\circ\text{C}$, e 24 horas a $4 \pm 2^\circ\text{C}$ (ANVISA, 2004).

As avaliações organolépticas (odor, sensação ao tato, aspecto e cor) e físico-químicas (pH e centrifugação) foram feitas no tempo zero e a cada 24 horas. A amostra dita referência foi mantida em temperatura ambiente, ao abrigo da luz (ANVISA, 2004).

4.2.1.2 Teste de estabilidade acelerada da loção capilar

A duração desse teste foi de 90 dias, nos quais as formulações foram

mantidas em condições adversas para verificação da estabilidade em cada um dos casos. Amostras foram mantidas em estufa, a $40 \pm 2^\circ\text{C}$, em temperatura ambiente controlada de $25 \pm 2^\circ\text{C}$ e em geladeira a $4 \pm 2^\circ\text{C}$ (ANVISA, 2004).

As avaliações organolépticas (odor, sensação ao tato, aspecto e cor) e físico-químicas (pH e centrifugação) foram feitas no tempo zero e a cada 7 dias. A amostra dita referência foi mantida em temperatura ambiente, ao abrigo da luz (ANVISA, 2004).

4.2.1.3 Tempo de prateleira do produto

A duração desse teste foi de oito meses, nos quais as formulações foram mantidas em temperatura ambiente controlada de $25 \pm 2^\circ\text{C}$ e ao abrigo de luz (ANVISA, 2004). As avaliações organolépticas (odor, sensação ao tato, aspecto e cor) e físico-químicas (pH e centrifugação) foram feitas no tempo zero e a cada 15 dias (ANVISA, 2004).

4.2.1.4 Teste de compatibilidade entre formulação e material de acondicionamento

As amostras foram avaliadas quanto às alterações na formulação (aspecto, cor, odor, sensação ao tato e pH) e quanto ao aspecto e funcionalidade da embalagem (resistência mecânica) (ANVISA, 2004).

4.3 MODELO DE AVALIAÇÃO *IN VIVO* – ANIMAIS

O projeto foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná (CEUA/BIO - UFPR), instituída pela Resolução N° 86/11 do Conselho de Ensino Pesquisa e Extensão (CEPE), de 22 de dezembro de 2011, processo 23075.078191/2015-31 (Anexo A).

A quantidade de animais utilizada foi determinada respeitando-se a regra dos 3R's (reduzir, refinar e substituir). Quarenta camundongos foram utilizados, sendo 20 machos e 20 fêmeas. Os animais eram da linhagem C57BL/06, comumente empregados nesse tipo de experimento (Choi *et al*, 2014). Os camundongos estavam todos na faixa de cinco semanas de idade, tempo necessário para que todos os folículos pilosos sincronizassem seus ciclos de crescimento (Oh *et al.*, 2016).

Os animais foram acondicionados em caixas de policarbonato em sala com temperatura (18 a 20°C), umidade (45 a 55%) e taxa de ventilação (10 a 15 trocas de ar/hora) controladas. A luminosidade da sala foi alternada entre ciclos de claro e escuro de 12 horas cada. A cama das caixas foi feita utilizando maravalha esterilizada, com troca a cada dois dias e limpeza de bebedouros a cada semana. Os animais foram alimentados com ração específica e hidratados com água *ad libitum*.

Os grupos foram definidos com oito animais cada, quatro machos e quatro fêmeas, sendo mantidos em caixas separadas e identificadas de acordo com o teste aos quais os animais foram submetidos (CN, CP, T1, T2 e T3 – Tabela 1).

TABELA 1 – QUANTIDADE DE ANIMAIS POR GRUPO E COMPOSIÇÃO DA LOÇÃO CAPILAR AO QUAL CADA ANIMAL FOI SUBMETIDO.

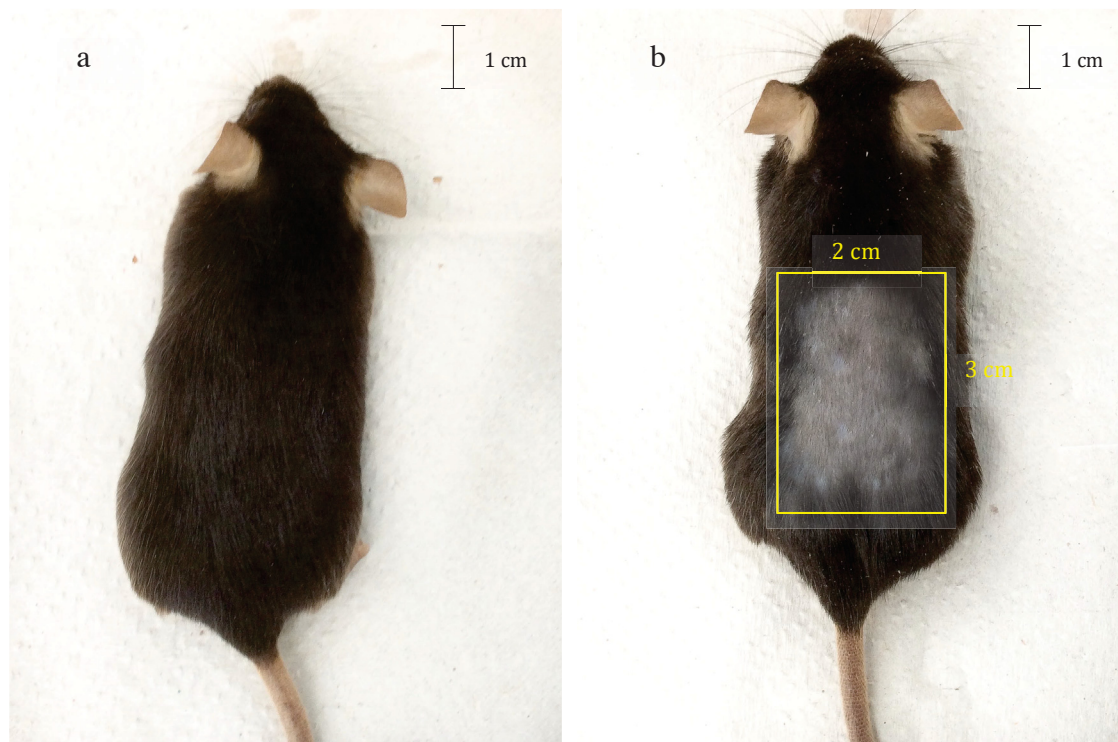
GRUPOS	QUANTIDADE ANIMAIS MACHOS	QUANTIDADE ANIMAIS FÊMEAS	COMPOSIÇÃO DA LOÇÃO TESTADA
CN	4	4	Solução hidro alcoólica
CP	4	4	Minoxidil 5% + solução hidro alcoólica qsp.
T1	4	4	Extrato de esporo de <i>G. lucidum</i> 1% + tintura de <i>Passiflora</i> 20% + óleos essenciais de bergamota e laranja 5% + solução hidro alcoólica qsp.
T2	4	4	Extrato de esporo de <i>G. lucidum</i> 5% + tintura de <i>Passiflora</i> 20% + óleos essenciais de bergamota e laranja 5% + solução hidro alcoólica qsp.
T3	4	4	Extrato de esporo de <i>G. lucidum</i> 10% + tintura de <i>Passiflora</i> 20% + óleos essenciais de bergamota e laranja 5% + solução hidro alcoólica qsp.

Para aplicação do produto, os pelos dos animais foram removidos com auxílio de um tosador de pelos, elétrico, específico para animais, de uma área dorsal equivalente a 2 x 3 cm (Figura 6) (Choi *et al*, 2014).

As loções foram aplicadas topicamente na área sem pelos. A quantidade aplicada foi de 100 μ L do material teste, uma vez ao dia, por quatro semanas consecutivas (Choi *et al*, 2014).

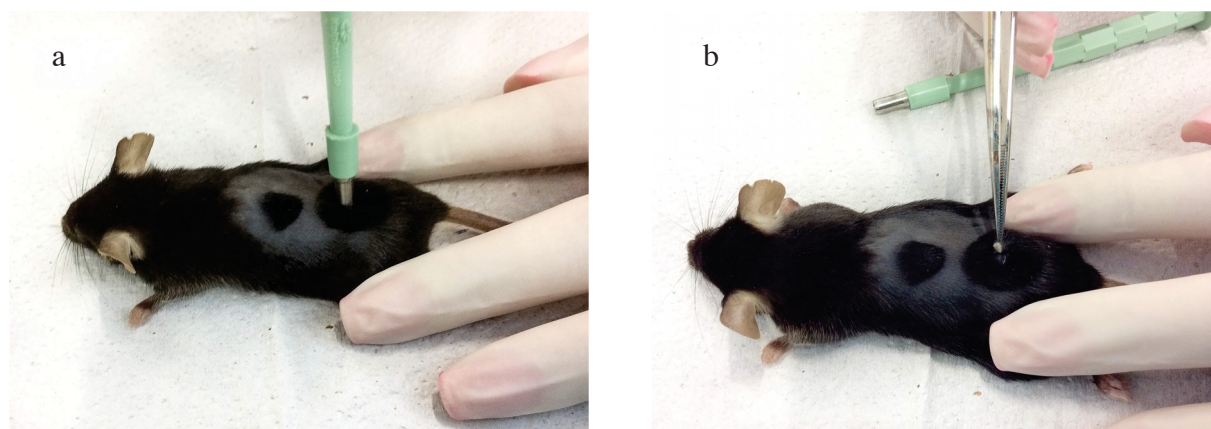
Após o término do experimento, os animais foram submetidos à coleta de sangue, por punção cardíaca, sob anestesia geral por inalação de isoflurano em câmpnula de vidro. Logo após, foi feita a eutanásia de todos os animais para a coleta do órgão em estudo, a pele. O método de eutanásia utilizado foi por anestésico inalatório em dosagem 2 a 3 vezes superior a utilizada para anestesia e colheita de sangue, aceito pela legislação vigente, por promover morte humanitária aos animais.

FIGURA 6 – CAMUNDONGO C57BL/06 ANTES (a) E DEPOIS (b) DA REMOÇÃO DE PELOS DE ÁREA DORSAL DE 2 x 3 CM.



As amostras de pele foram retiradas com auxílio de *punch* descartável, de 4 mm de diâmetro (Figura 7). Três amostras foram retiradas de cada animal e fixadas em ALFAC (álcool 85%, formaldeído 10% e ácido acético glacial 5%) por 16 horas. A conservação das amostras foi feita em álcool 70°, em geladeira, até o processamento para análise microscópica.

FIGURA 7 – PROCESSO DE RETIRADA DE AMOSTRA DE PELE DE CAMUNDONGOS UTILIZANDO *PUNCH* DESCARTÁVEL (a) COM AUXÍLIO DE PINÇA (b).



As carcaças dos animais foram congeladas até o descarte em lixo hospitalar do Biotério da UFPR, onde foram encaminhadas para incineração.

4.3.1 Análise macroscópica da área com aplicação do produto

Para a avaliação macroscópica foram tomados dados do crescimento visível dos pelos. À cada animal, uma nota foi atribuída: 0 para não crescimento de pelos em área de aplicação do produto (0%), 1 para pouco crescimento de pelos em área de aplicação do produto (1 a 20%), 2 para crescimento médio de pelos em área de aplicação do produto (21 a 50%), 3 para muito crescimento de pelos em área de aplicação do produto (51 a 80%) e 4 para crescimento total de pelos em área de aplicação do produto (81 a 100%) (Choi *et al*, 2014).

Com os resultados obtidos, a partir dessa análise, foi possível realizar a triagem das amostras para a seleção e confecção das lâminas histológicas para análise microscópica.

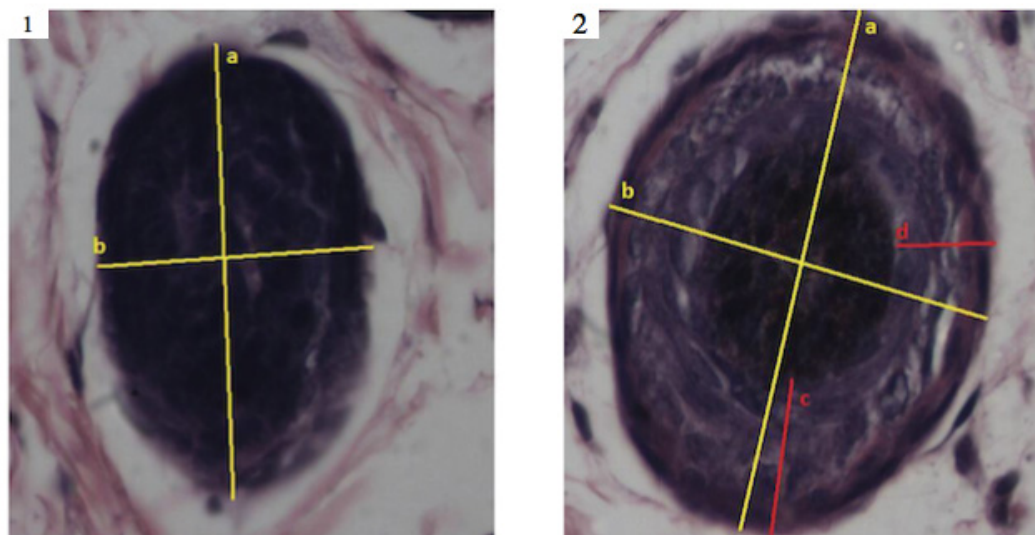
4.3.2 Estudos histológicos de pele de animais utilizados no estudo

Os fragmentos histológicos retirados dos animais, após a conservação, foram fixados em parafina. Os blocos de parafina, endurecidos e esfriados com gelo, foram seccionados em micrótomo com cortes a cada 4 μm . Os cortes foram colocados em banho-maria (40 °C) e em seguida distendidos em lâminas de vidro apropriadas para microscopia. Em seguida, foi feita a desparafinização com xilol e banhos de álcool absoluto até a solução de álcool 70%. A coloração foi feita mergulhando as lâminas em cubetas com corantes hematoxilina e eosina (HE) e em água, para remoção do excesso de corante. Por fim, as lâminas foram recobertas com lamínula para seguir à leitura.

As leituras foram realizadas em microscópio óptico, em objetiva de 100x e ocular de 10x, em óleo de imersão. Seis cortes de cada lâmina foram lidos: o primeiro corte para análise do tecido, o segundo e terceiro cortes para análise de folículos em fase anágena, o quarto e quinto cortes para análise de folículos em fase catágena e telógena e o sexto corte para visualização de estruturas mais profundas (Mulinari-Brenner, 2006).

Os folículos foram contados, classificados e seus diâmetros foram medidos de acordo com o exemplo da Figura 8.

FIGURA 8 – FOLÍCULOS CAPILARES EM FASE DE CRESCIMENTO ANÁGENA (1) E CATÁGENA/TELÓGENA (2) E MEDIDAS UTILIZADAS COMO PARÂMETROS.



a: maior diâmetro do folículo; b: menor diâmetro do folículo; c: maior medida da bainha epitelial; d: menor medida da bainha epitelial. FONTE: Zanchet e Lunelli, 2010.

4.3.3 Testes hormonais realizados em animais utilizados no estudo

Para a avaliação hormonal dos animais, antes e durante os testes foi primeiramente padronizado a metodologia de dosagem hormonal. O teste de eleição para essa análise foi ensaio imunoenzimático (ELISA). Para sua padronização foram primeiramente determinadas as concentrações de antígenos para cada hormônio, diluições de soros a serem usadas e a diluição do conjugado.

4.3.3.1 Padronização do teste imunoenzimático (ELISA) para a determinação dos hormônios estradiol, testosterona e DHT em modelo animal

Amostras de sangue de todos os animais foram coletadas para a avaliação dos hormônios estradiol, testosterona e DHT. O teste de eleição para essa análise foi ensaio imunoenzimático (ELISA).

Para a padronização de cada hormônio foram analisadas diferentes concentrações do hormônio, diluição de soro e do conjugado (Tabela 2). O teste foi realizado com adsorção de hormônio diluído em coating buffer (pH 9,6) e adicionado 100 μ L por cavidade da placa de polietileno com alta afinidade e em seguida incubada overnight (4°C). Foi realizada uma lavagem da placa com 200 μ L/cavidade de solução de lavagem (NaCl + Tween 20) e distribuído 200 μ L/cavidade de tampão de bloqueio (caseína a 1%, PBS pH 7,4) e incubado a 37°C por uma hora. Em seguida foram realizadas três lavagens da placa e adicionou-se 100 μ L/cavidade de soro diluído em tampão de incubação (caseína, Tween-20 e PBS, pH 7,4) e incubado a 37°C por uma hora. Após, foram realizadas três lavagens da placa e adicionado 100 μ L/cavidade de anticorpo de cabra anti camundongo IgG H&L (HRP) (Abcam - 6789) incubado a 37°C por uma hora. Na última etapa foram realizadas três lavagens da placa, adicionando-se 100 μ L/cavidade de solução de substrato (tampão citrato com pH 5,0 + 2 mg de ortofenilenodiamina – OPD + peróxido de hidrogênio) e incubado por 15 min à temperatura ambiente e ao abrigo da luz. Em seguida, foi adicionado 20 μ L de solução de ácido sulfúrico 2 N para parada da reação. Enfim, foi realizada a leitura em espectrofotômetro PowerWave SX (BioTek), em comprimento de onda de 492 nm.

TABELA 2 – CONCENTRAÇÕES E DILUIÇÕES FEITAS DE CADA REAGENTE PARA A PADRONIZAÇÃO DO TESTE IMUNOENZIMÁTICO (ELISA) PARA A DETERMINAÇÃO DOS HORMÔNIOS ESTRADIOL, TESTOSTERONA E DIIDROTESTOSTERONA, EM ANIMAIS.

HORMÔNIOS	CONCENTRAÇÃO DE ANTÍGENO (ng/ μ L)	SOROS	DILUIÇÃO DE CONJUGADO
Estradiol	1.000; 500; 250; 125; 62,5; 31,25;	1:100	1:6.250; 1:12.500;
	15,62	1:200	1:25.000; 1:50.000
Testosterona	1.000; 500; 250; 125; 62,5; 31,25;	1:100	1:6.250; 1:12.500;
	15,62	1:200	1:25.000; 1:50.000
Diidrotestosterona(DHT)	1.000; 500; 250; 125; 62,5; 31,25;	1:100	1:5.000; 1:10.000;
	15,62	1:200	1:12.000

Foram utilizadas amostras de soros de animais machos do grupo controle negativo (CN) e grupo controle positivo (CP) para padronização da dosagem de estradiol, testosterona e DTH. Após a padronização, foram submetidas as amostras CN, CP e tratamentos (T1, T2 e T3) para comparação, entre grupos, de níveis hormonais dos animais ao término do estudo (4 semanas).

4.3.3.2 Determinação de estradiol pelo método ELISA

O teste ELISA para dosagem de estradiol foi realizado com adsorção de antígeno estradiol para camundongos (Abcam - 116648) diluído em coating buffer (pH 9,6), adicionado 100 μ L por cavidade da placa de polietileno com alta afinidade e em seguida incubada overnight (4°C). Foi realizada uma lavagem da placa com 200 μ L/cavidade de solução de lavagem (NaCl + Tween 20) e distribuído 200 μ L/cavidade de tampão de bloqueio (caseína a 1%, PBS pH 7,4) e incubado a 37°C por uma hora. Em seguida foram realizadas três lavagens da placa e adicionado 100 μ L/cavidade de soro dos animais em tampão de incubação (caseína, Tween-20 e PBS, pH 7,4), incubado a 37°C por uma hora. Após a lavagem da placa (3x), foi adicionado 100 μ L/cavidade de anticorpo de cabra anti camundongo IgG H&L (HRP) (Abcam – 6789), incubado a 37°C por uma hora. Depois foram realizadas três lavagens da placa e adicionado 100 μ L/cavidade de solução de substrato (tampão citrato com pH 5,0 + 2 mg de ortofenilenodiamina – OPD + peróxido de hidrogênio), incubado por 15 min à temperatura ambiente e ao abrigo da luz. Em seguida, foi adicionado 20 μ L de solução de ácido sulfúrico 2 N para parada da reação e realizada a leitura em comprimento de onda 492 nm utilizando espectrofotômetro PowerWave SX (BioTek).

4.3.3.3 Determinação de testosterona pelo método ELISA

O teste ELISA para dosagem de testosterona foi realizado com adsorção de antígeno testosterona para camundongos (Life Sciences – L16101407) diluído em coating buffer (pH 9,6) e adicionado 100 μ L por cavidade da placa de polietileno com alta afinidade e em seguida incubada overnight (4°C). Foi realizada uma lavagem da placa com 200 μ L/cavidade de solução de lavagem (NaCl + Tween 20) e distribuído 200 μ L/cavidade de tampão de bloqueio (caseína a 1%, PBS pH 7,4) e incubado a 37°C por uma hora. Em seguida foram realizadas três lavagens da placa e adicionado 100 μ L/cavidade de soro em tampão de incubação (caseína, Tween-20 e PBS, pH 7,4), incubado a 37°C por uma hora. Após, foram realizadas três lavagens da placa e adicionado 100 μ L/cavidade de anticorpo de cabra anti camundongo IgG H&L (HRP) (Abcam - 6789), incubado a 37°C por uma hora. Após três lavagens da placa,

adicionou-se 100 μL /cavidade de solução de substrato (tampão citrato com pH 5,0 + 2 mg de ortofenilenodiamina – OPD + peróxido de hidrogênio), incubado por 15 min à temperatura ambiente e ao abrigo da luz. Em seguida, foi adicionado 20 μL de solução de ácido sulfúrico 2 N para parada da reação e feito a leitura em comprimento de onda 492 nm utilizando espectrofotômetro PowerWave SX (BioTek).

4.3.3.4 Determinação de DHT pelo método ELISA

O teste ELISA para dosagem de DTH foi realizado com adsorção de antígeno DHT para camundongos (Cloud-Clone Corp. – PAA443Ge01) diluído em coating buffer (pH 9,6) e adicionado 100 μL por cavidade da placa de polietileno com alta afinidade e em seguida incubada overnight (4°C). Foi realizada uma lavagem da placa com 200 μL /cavidade de solução de lavagem (NaCl + Tween 20) e distribuído 200 μL /cavidade de tampão de bloqueio (caseína a 1%, PBS pH 7,4) e incubado a 37°C por uma hora. Em seguida foram realizadas três lavagens da placa e adicionado 100 μL /cavidade de soro em tampão de incubação (caseína, Tween-20 e PBS, pH 7,4), incubado a 37°C por uma hora. Depois foram realizadas três lavagens da placa e adicionado 100 μL /cavidade de anticorpo de cabra anti camundongo IgG H&L (HRP) (Abcam - 6789) e incubado a 37°C por uma hora. Foram realizadas três lavagens da placa e adicionado 100 μL /cavidade de solução de substrato (tampão citrato com pH 5,0 + 2 mg de ortofenilenodiamina – OPD + peróxido de hidrogênio), incubado por 15 min à temperatura ambiente e ao abrigo da luz. Em seguida, foi adicionado 20 μL de solução de ácido sulfúrico 2 N para parada da reação e a leitura foi realizada no comprimento de onda de 492 nm utilizando espectrofotômetro PowerWave SX (BioTek).

De acordo com as médias das absorbâncias dos grupos, pode-se verificar a alteração dos hormônios entre grupos controles e grupos tratamentos.

4.4 AVALIAÇÃO DA LOÇÃO CAPILAR EM HUMANOS

O projeto foi submetido ao Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da Universidade Federal do Paraná – Setor de Ciências da Saúde (SCS), criado em 2003, pela Resolução CNS 196/96, regulamentada pelo Conselho Nacional de Saúde (CNS),

de acordo com a Resolução 466/2012, por meio da Plataforma Brasil. O projeto foi aprovado com o número do parecer 1.817.016 (Anexo B).

Foram selecionados 70 pacientes, 35 homens e 35 mulheres, maiores de 18 anos, que apresentavam queixas relacionadas à queda e falha de cabelo.

Os pacientes assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) previamente aprovado pelo CEP (Anexo C).

O estudo realizado foi duplo-cego, no qual cada participante recebeu um frasco contendo a loção controle (CN) ou a loção teste (T2 para mulheres e T3 para homens) identificado apenas por um código desconhecido aos participantes e à médica responsável pelo acompanhamento do estudo. Na figura 9 é dado um exemplo de como os frascos foram embalados e entregues aos pacientes. Os códigos foram anotados juntamente ao nome do paciente em uma planilha, para posterior análise de resultados.

FIGURA 9 – IMAGEM DOS FRASCOS ENTREGUES AOS PACIENTES. A FLECHA SINALIZA O CÓDIGO CONTIDO EM CADA RÓTULO DA LOÇÃO DO ESTUDO DUPLO-CEGO.



Os pacientes receberam as orientações de uso da loção, que deveria ser usada em couro cabeludo na quantidade de 20 gotas ou 1 mL, sem enxágue, 2 vezes ao dia, por aproximadamente 90 dias.

4.4.1 Fichas de auto-avaliação e análise subjetiva dos pacientes do estudo

Ao início do estudo os participantes foram submetidos a um questionário para levantamento de dados clínicos (uso de medicamentos anticoncepcionais, anti-hipertensivos, antidepressivos, hipoglicemiantes), histórico capilar (presença ou ausência de alopecia areata, falha capilar, uso prévio de algum medicamento para queda de cabelo, como minoxidil, finasterida e suplementos vitamínicos orais), auto avaliação capilar (presença ou ausência de quebra e queda dos fios de cabelo, e espessura) e demais anotações que o paciente ou a médica responsável achassem pertinentes (Anexo D).

Ao completar 30 dias de experimento, os pacientes foram convidados a comparecerem novamente ao consultório de pesquisa, para uma avaliação de 30 dias de uso da loção. Um novo questionário de auto avaliação foi entregue aos pacientes e respondidos por eles. Esse questionário tratava de uma avaliação da melhora capilar, caso o paciente a tivesse notado, especificando qual melhora havia ocorrido (melhora em queda, melhora em quebra, brilho, nascimento de novos fios de cabelo, ou outros). Nesse questionário o paciente também teve de relatar a presença ou ausência de efeitos adversos e demais observações que considerasse pertinente (Anexo E).

Esse procedimento repetiu-se aos 60 e 90 dias de uso da loção.

4.4.2 Análises macroscópicas das imagens obtidas dos pacientes participantes do estudo

Subsequente ao questionário inicial, foram feitas fotos macroscópicas de cada paciente utilizando câmera fotográfica de 12 megapixels.

Novas imagens foram obtidas com 30, 60 e 90 dias de uso da loção para comparar a evolução ou não da melhora na quantidade e qualidade dos fios de cabelo em couro cabeludo.

4.4.3 Análises microscópicas obtidas de couro cabeludo de pacientes participantes do estudo

A captura de imagem microscópica do couro cabeludo de cada paciente foi realizada por meio de dermatoscópio (Castells). As imagens foram obtidas no início do tratamento e a cada 30 dias, até completar os 90 dias de estudo, para comparar a evolução ou não da melhora na quantidade dos fios de cabelo e possíveis alterações em couro cabeludo.

4.4.4 Análises Hormonais em Humanos

Antes de dar início ao uso da loção, foi solicitado aos participantes que fizessem coleta de sangue para dosagem de níveis hormonais (DHT, testosterona e estradiol). Esses exames foram realizados em rotina no laboratório RioLab Laboratório de Análises Clínicas, previamente autorizado pelo Comitê de Ética.

4.5 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Os efeitos dos tratamentos capilares sobre o crescimento de pelos nos animais foram avaliados por uma análise estatística de variância (ANOVA) com nível de significância de 95% ($p \geq 0,05$). Um pós Teste de Tukey foi realizado para comparar a diferença significativa entre as amostras. Os cálculos foram realizados utilizando o software Statistics V. 7.0 (Statsoft).

Para humanos, foram utilizados os testes de ANOVA, pós testes Tukey, Kruskal-Wallis e Dunn, todos com nível de significância de 95%. Os cálculos foram realizados utilizando o software Graphpad 6.0.

5 RESULTADOS

5.1 RUPTURA DOS ESPOROS

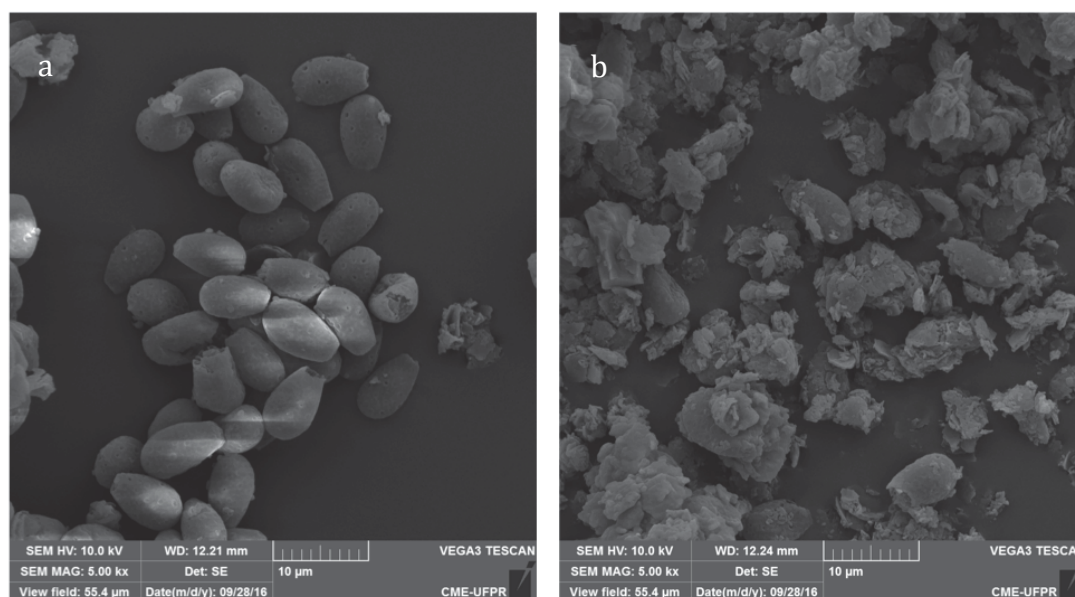
5.1.1 Eficácia dos processos de ruptura celular

Para os três processos de ruptura dos esporos houve diferença, sendo que no processo 1 (amostra 1) 90% dos esporos foram rompidos. No segundo e terceiro processos de ruptura o percentual foi o mesmo, 98% de ruptura. O processo 2 apesar de ter apresentado a mesma taxa de ruptura se mostrou com maior viabilidade por ter menor número de passos, sendo então o escolhido para a avaliação microscópica eletrônica.

5.1.2 Avaliação microscópica do rompimento dos esporos

Na avaliação dos esporos antes e depois do processo de rompimento, verificou-se que, em comparação aos esporos sem rompimento (Figura 10A), os esporos rompidos (Figura 10B) apresentaram a parede celular total ou parcialmente destruídas, o que permitiu a liberação do conteúdo intracelular onde estão presentes os biocompostos.

FIGURA 10 – MICROSCOPIA ELETRÔNICA DOS ESPOROS DE *G. lucidum* ANTES DO ROMPIMENTO (a) E APÓS O ROMPIMENTO CELULAR (b) PELO MÉTODO DE MACERAÇÃO COM PÉROLAS DE VIDRO.



5.2 PRODUÇÃO DO EXTRATO A PARTIR DE ESPOROS DE *Ganoderma lucidum*

5.2.1 Avaliação do potencial antioxidante dos extratos de *G. lucidum* para posterior utilização em loção capilar

Os três produtos oriundos dos diferentes processos de ruptura celular se mostraram eficientes pois seus extratos apresentaram potencial antioxidante (Figura 11). Os três extratos obtidos por maceração, maceração com pérolas de vidro, e maceração com pérolas de vidro e agitação em vórtex, apresentaram, respectivamente, atividades antioxidantes de 33,2 $\mu\text{g/mL}$, 15,8 $\mu\text{g/mL}$ e 16,3 $\mu\text{g/mL}$ (Tabela 3).

FIGURA 11 – ASPECTO DOS EXTRATOS OBTIDOS A PARTIR DOS ESPOROS DO FUNGO *G. lucidum*. a: EXTRAÇÃO COM MACERAÇÃO EM CADINHO E PISTILO; b: EXTRAÇÃO COM MACERAÇÃO EM CADINHO E PISTILO + PÉROLAS DE VIDRO; c: EXTRAÇÃO POR MACERAÇÃO EM CADINHO E PISTILO + PÉROLAS DE VIDRO + AGITAÇÃO EM VÓRTEX.

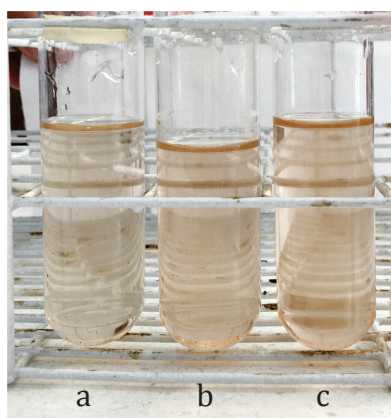


TABELA 3 – POTENCIAL ANTIOXIDANTE (EXPRESSO EM IC_{50} – $\mu\text{G/ML}$) OBTIDOS NOS TRÊS DIFERENTES MÉTODOS DE EXTRAÇÃO DE ESPOROS DE *G. lucidum*, AVALIADOS PELO MÉTODO DE DPPH.

MÉTODOS DE EXTRAÇÃO	ATIVIDADE ANTIOXIDANTE IC_{50} – $\mu\text{g/mL}$	p VALOR	
		1*	2**
Maceração (1)	33,2		
Maceração + Pérolas (2)	15,8	<0,01	
Maceração + Pérolas + Vórtex (3)	16,3	<0,01	0,94

p Valor: probabilidade de significância

*1 – Método Maceração

**2 – Método Maceração + Pérolas

A medida de IC_{50} expressa a quantidade de antioxidante necessária para reduzir em 50% a concentração inicial de DPPH. O extrato obtido a partir da maceração dos esporos de *G. lucidum* apresentou um valor de IC_{50} de $33,2 \mu\text{g/mL}$, o que indica que é necessário $33,2 \mu\text{g/mL}$ desse extrato para reduzir 50% da quantidade de DPPH. Os extratos obtidos a partir da maceração com pérolas de vidro e o extrato obtido adicionando a etapa de agitação em vórtex foram estatisticamente iguais ($p 0,94$) e superiores ao extrato obtido somente com maceração em cadinho e pistilo, sendo necessária a metade de extrato para a mesma redução do radical DPPH ($15,8$ e $16,3 \mu\text{g/mL}$). Portanto, o método escolhido para extração dos compostos bioativos dos esporos do fungo *G. lucidum* foi de maceração em cadinho e pistilo com pérolas de vidro, eliminando a etapa de agitação em vórtex, que agrega um maior custo à produção.

5.3 PREPARO DA LOÇÃO CAPILAR

O extrato contendo os compostos bioativos de esporos de *G. lucidum* foi centrifugado e filtrado, como descrito em Material e métodos, para remoção dos debris celulares dos esporos. O extrato resultante desse processamento foi utilizado para preparo da loção capilar.

5.3.1 Características da loção capilar

A loção capilar formulada (Figura 12) possui aspecto líquido límpido, coloração levemente amarelada, de odor cítrico, toque suave e seco e pH 5,5.

FIGURA 12 – FOTOGRAFIA DA LOÇÃO CAPILAR FORMULADA A PARTIR DE BIOCÓMPOSTOS ATIVOS EXTRATO DE ESPOROS DO FUNGO *G. lucidum*.



5.3.2 Testes farmacotécnicos da loção capilar

Os testes farmacotécnicos foram realizados na loção capilar contendo o extrato de esporos de *G. lucidum*. As análises realizadas foram: estabilidade preliminar, estabilidade acelerada, tempo de prateleira e compatibilidade entre produto e embalagem. Os parâmetros analisados foram organolépticos (aspecto da loção, cor, odor e sensação ao tato) e físico-químicos (pH e estabilidade da formulação frente a centrifugação).

A amostra referência foi mantida a 25°C e utilizada para a comparação das loções submetidas aos testes de estabilidade preliminar e acelerada, tempo de prateleira e compatibilidade com embalagem.

As amostras avaliadas nos testes de estabilidade preliminar foram submetidas a ciclos de 40°C ± 2°C e 4°C ± 2°C a cada 24 horas, por 4 semanas. Nos testes de estabilidade acelerada, as amostras foram submetidas à estufa a 40°C ± 2°C e à geladeira a 4°C ± 2°C por 90 dias. O aspecto das loções não apresentou alteração quando comparadas à amostra referência. A cor das formulações, quando submetidas ao aquecimento a 40°C ± 2°C, apresentou uma intensificação da coloração amarela, o que é aceitável de acordo com a regulamentação técnica (ANVISA, 2004), onde pequenas alterações são aceitáveis em temperaturas elevadas. O odor e a sensação ao tato permaneceram inalteradas em todas as amostras submetidas a todas as condições (aquecimento e resfriamento). Os parâmetros físico-químicos avaliados foram pH e centrifugação, no qual apenas o pH teve alteração, variando entre 5,3 a 5,7, dentro dos parâmetros aceitáveis (ANVISA, 2004) (Tabela 4).

O teste de determinação de tempo de prateleira foi conduzido por 8 meses e não houve alteração nas amostras em nenhum dos parâmetros, quando comparadas à amostra referência (Tabela 4).

O teste de compatibilidade da loção capilar com o material da embalagem não apresentou alteração na formulação, e a embalagem mostrou-se íntegra durante todo o período, mantendo a vedação e a sua funcionalidade (Tabela 4).

TABELA 4 – RESULTADOS DOS TESTES FARMACOTÉCNICOS (ESTABILIDADE PRELIMINAR, ESTABILIDADE ACELERADA, TEMPO DE PRATELEIRA E COMPATIBILIDADE ENTRE PRODUTO E EMBALAGEM) E SEUS PARÂMETROS ANALISADOS (ORGANOLÉPTICOS: ASPECTO, COR, ODOR E SENSAÇÃO AO TATO; E FÍSICO-QUÍMICOS: PH E CENTRIFUGAÇÃO) EM COMPARAÇÃO COM AMOSTRA REFERÊNCIA, DE ACORDO COM REGULAMENTAÇÃO TÉCNICA DA ANVISA.

TESTES	CONDIÇÕES	PARÂMETROS					
		ORGANOLÉPTICOS			FÍSICO-QUÍMICOS		
		ASPECTO	COR	ODOR	SENSAÇÃO AO TATO	PH	CENTRIFUGAÇÃO
Amostra Referencia	25°C	Líquido límpido	Levemente amarelada	Cítrico	Suave e seco	5,5	Sem alteração
Estabilidade Preliminar (Ciclos de 24h cada, durante 4 semanas)	Ciclos de 24h 40°C ± 2°C	Sem alteração	Amarelo intensificado	Sem alteração	Sem alteração	5,7	Sem alteração
	Ciclos de 24h 4°C ± 2°C	Sem alteração	Sem alteração	Sem alteração	Sem alteração	5,4	Sem alteração
	Estufa (40°C ± 2°C)	Sem alteração	Amarelo intensificado	Sem alteração	Sem alteração	5,6	Sem alteração
Estabilidade Acelerada (90 dias)	Geladeira (4°C ± 2°C)	Sem alteração	Sem alteração	Sem alteração	Sem alteração	5,3	Sem alteração
	25°C	Sem alteração	Sem alteração	Sem alteração	Sem alteração	5,5	Sem alteração
Tempo de Prateleira (8 meses)		Sem alteração	Sem alteração	Sem alteração	Sem alteração	5,5	Sem alteração
Compatibilidade Embalagem		Sem alteração	Sem alteração	Sem alteração	Sem alteração	5,5	Sem alteração

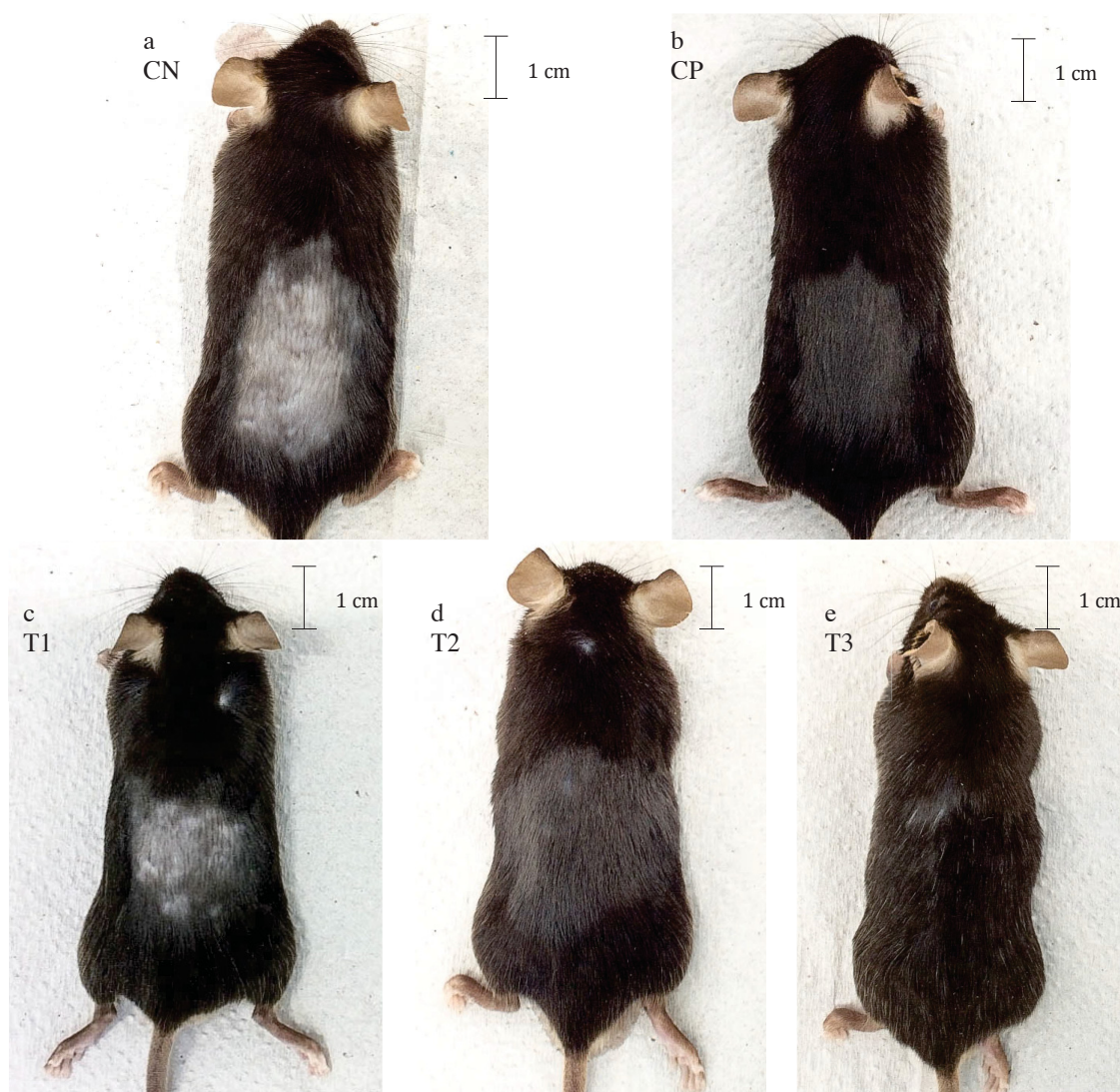
5.4 AVALIAÇÃO DA LOÇÃO CAPILAR EM MODELO ANIMAL

5.4.1 Avaliação da loção capilar em modelo animal: Machos

5.4.1.1 Análise macroscópica de animais machos utilizados no estudo

A análise macroscópica mostrou diferença entre as respostas dos animais machos frente aos produtos em experimentação e aos controles positivos e negativos (Figura 13). O grupo que teve o maior crescimento visível de pelos, a olho nu, foi o grupo T3 (Figura 13-e).

FIGURA 13 – FOTOGRAFIAS EXEMPLIFICANDO OS ANIMAIS MACHOS DOS GRUPOS (a) CONTROLE NEGATIVO (CN) E (b) CONTROLE POSITIVO (CP) COM OS GRUPOS DE TRATAMENTOS T1 (c), T2 (d), T3 (e).



A classificação foi utilizada para análise estatística (teste de Tukey) entre os grupos CN, CP, T1, T2 e T3 (Tabela 5). Ao se comparar os grupos controles (CN e CP), observa-se que não houve diferença significativa entre eles. Os tratamentos 1 e 2 também não diferiram dos controles e nem entre si.

O tratamento que difere significativamente é o T3. Nos camundongos machos observa-se um melhor resultado no crescimento de pelos quando se faz o uso dessa dosagem.

Com esses resultados, deu-se continuidade às análises histológicas dos grupos CN, CP e T3 dos animais machos utilizados no estudo.

TABELA 5 – VALORES DAS MÉDIAS OBTIDAS A PARTIR DA CLASSIFICAÇÃO VISUAL DE CRESCIMENTO DE PELOS DE ANIMAIS MACHOS DOS GRUPOS CN, CP, T1, T2 E T3 E ANÁLISE ESTATÍSTICA.

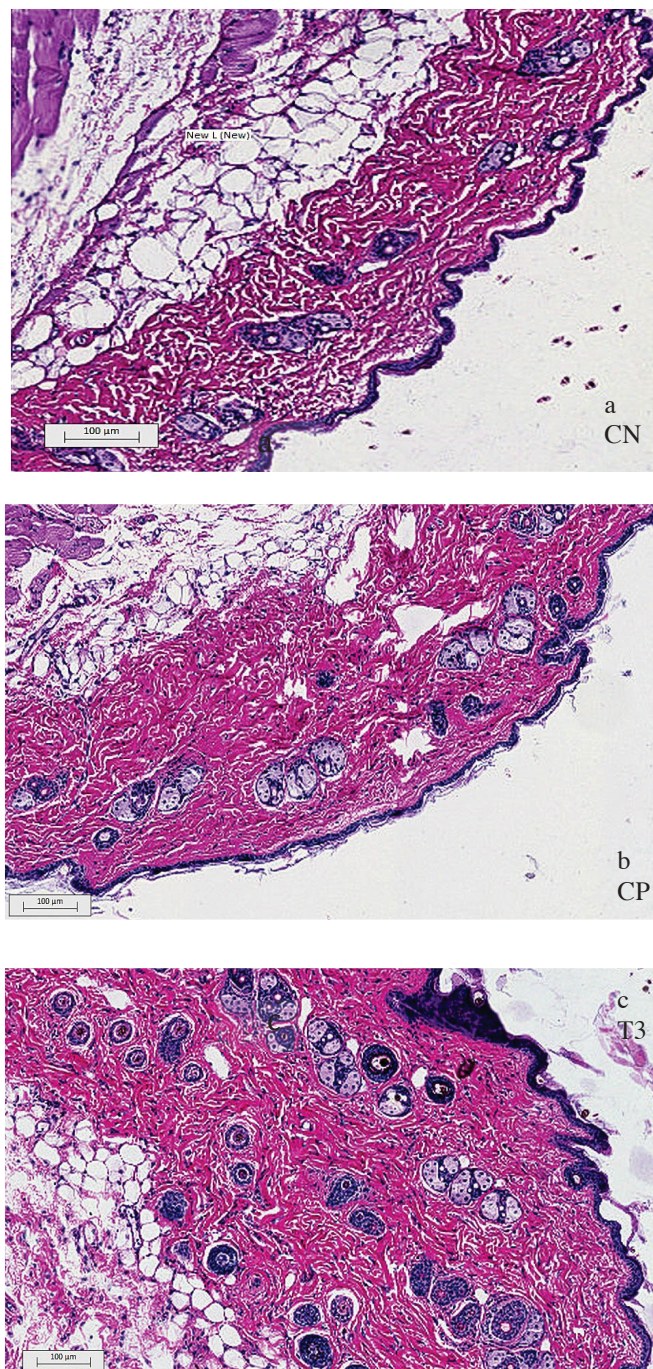
GRUPOS	MEDIA	p VALOR (TESTE DE TUKEY – 95%)			
		CN	CP	T1	T2
CN	0				
CP	0,500 ± 0,577	0,59			
T1	0,500 ± 0,577	0,59	>0,99		
T2	0,250 ± 0,500	0,94	0,94	0,94	
T3	1,750 ± 0,500	<0,01	0,01	0,01	<0,01

p Valor: probabilidade de significância

5.4.1.2 Análise microscópica da pele dos machos utilizados no estudo

Os folículos foram contados e classificados de acordo com sua fase de crescimento em anágenos ou catágenos/telógenos, e seus diâmetros medidos. As lâminas histológicas dos animais machos do grupo T3 apresentaram uma quantidade 50% superior de folículos capilares quando comparado aos grupos CN e CP (Tabela 6). Todos os folículos do grupo T3 analisados, anágenos ou catágenos/telógenos, aumentaram em até 10 vezes seu diâmetro em relação aos grupos CN e CP (Figura 14).

FIGURA 14 – EXEMPLO DE CORTES HISTOLÓGICOS EM ANIMAIS MACHOS DOS GRUPOS (a) CONTROLE NEGATIVO (CN), (b) CONTROLE POSITIVO (CP) E (c) TRATAMENTO 3 (T3).



A quantidade de folículos anágenos contados nos grupos controles (CN e CP) e no grupo tratamento (T3) não apresentaram diferença estatística significativa quando comparados entre si. Os folículos catágenos/telógenos apresentaram diferença significativa apenas para o grupo T3. A quantidade de folículos totais, contados nos grupos CN e CP, não diferem estatisticamente entre si, mas diferem do grupo de

animais submetidos ao T3, confirmando a eficácia dessa loção para o nascimento de novos folículos capilares de animais machos (Tabela 6).

TABELA 6 – MÉDIA DA QUANTIDADE E CLASSIFICAÇÃO DE FOLÍCULOS (ANÁGENOS OU CATÁGENOS/TELÓGENOS) CONTADOS EM LAMINAS HISTOLÓGICAS DE ANIMAIS MACHOS, DOS GRUPOS CN, CP E T3 E SUA ANÁLISE ESTATÍSTICA.

GRUPOS	FOLÍCULOS ANÁGENOS			FOLÍCULOS CATÁGENOS/TELÓGENOS			FOLÍCULOS TOTAIS		
	MÉDIA	p VALOR CN CP		MÉDIA	p VALOR CN CP		MÉDIA	p VALOR CN CP	
CN	4,694 ± 0,984			18,000 ± 1,737			22,649 ± 0,792		
CP	3,514 ± 1,194	0,63		18,500 ± 2,071	0,99		22,014 ± 2,175	0,98	
T3	6,236 ± 0,992	0,47	0,13	38,958 ± 3,137	<0,01	<0,01	45,194 ± 2,470	<0,01	<0,01

p Valor: probabilidade de significância

Os diâmetros dos folículos em fase anágena (a_1 e b_1) diminuíram no grupo CP e aumentaram no grupo T3 quando comparado às medidas obtidas do grupo CN. Porém, a única diferença significativa é quando se compara o grupo T3 ao grupo CP (Tabela 7).

TABELA 7 – MÉDIA E ANÁLISE ESTATÍSTICA DO TAMANHO DE FOLÍCULOS ANÁGENOS CONTADOS EM LAMINAS HISTOLÓGICAS DE ANIMAIS MACHOS, DOS GRUPOS CN, CP E T3.

GRUPOS	FOLÍCULOS ANÁGENOS						
	DIÂMETROS	a_1	p VALOR CN CP		b_1	p VALOR CN CP	
CN		29,658 ± 4,092			28,944 ± 3,931		
CP		23,436 ± 4,562	0,23		24,224 ± 5,598	0,26	
T3		36,392 ± 2,566	0,19	0,01	36,568 ± 1,572	0,10	<0,01

p Valor: probabilidade de significância

Os folículos em fase catágena/telógena apresentam quatro diâmetros diferentes, nomeados: a_2 , b_2 , c_2 e d_2 . Para todos a diferença estatística encontra-se na comparação entre os grupos CN e T3 (Tabela 8).

A loção capilar formulada contendo 10% de extrato esporo de *G. lucidum* (T3), mostrou um aumento na quantidade e nos diâmetros dos folículos capilares de animais machos quando comparada aos grupos CN e CP. As análises das medidas dos folículos indicam um aumento do diâmetro dos fios, tornando-os mais resistentes a quebra e mais volumosos, quando se utiliza a loção do grupo T3 para animais machos.

TABELA 8 – MÉDIA E ANÁLISE ESTATÍSTICA DO TAMANHO DE FOLÍCULOS CATÁGENOS/TELÓGENOS CONTADOS EM LAMINAS HISTOLÓGICAS DE ANIMAIS MACHOS, DOS GRUPOS CN, CP E T3.

GRUPOS	FOLÍCULOS CATÁGENOS/TELÓGENOS												
	DIÂM	a ₂	p VALOR		b ₂	p VALOR		c ₂	p VALOR		d ₂	p VALOR	
			CN	CP		CN	CP		CN	CP		CN	CP
CN		26,543			26,583			7,359 ±			7,578 ±		
		± 2,822			± 2,089			1,353			0,966		
CP		28,928	0,75		32,137	0,16		8,255 ±	0,66		8,841 ±	0,39	
		± 2,825			± 4,542			0,753			1,457		
T3		37,419	0,02	0,06	36,194	0,01	0,34	10,760	0,02	0,08	10,270	0,04	0,31
		± 0,783			± 1,174			± 0,539			± 0,449		

p Valor: probabilidade de significância

5.4.1.3 Análises das respostas hormonais de animais machos utilizados no estudo

5.4.1.3.1 Resultado da padronização do teste imunoenzimático (ELISA) para a determinação dos hormônios estradiol, testosterona e DHT em modelo animal

A padronização do teste ELISA foi feita separadamente para cada hormônio desejado (estradiol, testosterona e DHT). A partir dos resultados que determinaram a dosagem hormonal, cada teste seguiu de acordo com suas concentrações de antígeno, soro e conjugado (Tabela 9).

TABELA 9 – CONCENTRAÇÕES DE ANTÍGENO, SORO E CONJUGADO, UTILIZADOS NA PADRONIZAÇÃO DO TESTE ELISA PARA DETERMINAÇÃO DE ESTRADIOL, TESTOSTERONA E DHT, EM MODELO ANIMAL.

	ESTRADIOL	TESTOSTERONA	DHT
ANTÍGENO (ng/uL)	250	125	250
SORO (diluição)	1:100	1:100	1:100
CONJUGADO (diluição)	1:12.500	1:12.500	1:5.000

5.4.1.3.2 Resultado da determinação de testosterona pelo método ELISA em animais machos

Houve aumento do nível de testosterona em animais machos apenas dos grupos CP, T2 e T3 (Gráfico 1), porém, esse aumento, não foi significativo

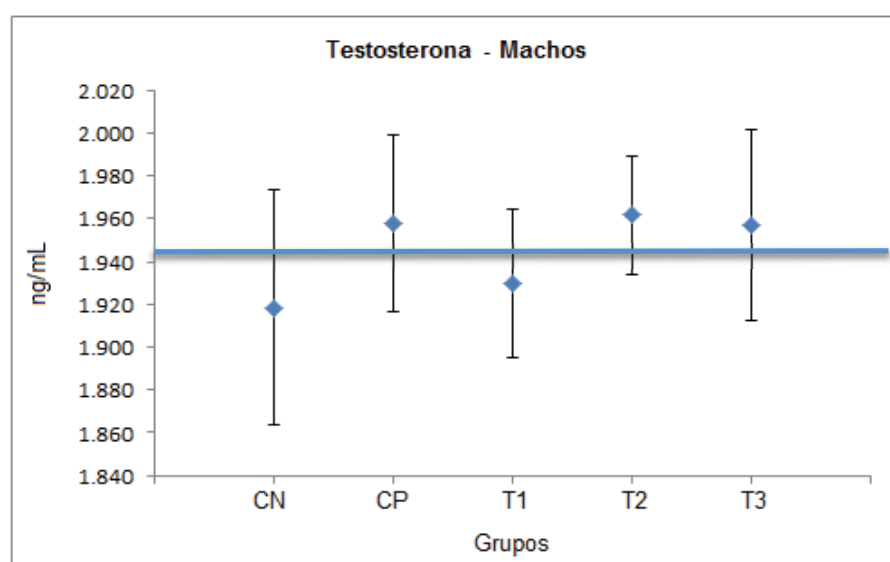
estatisticamente (Tabela 10). A testosterona é o hormônio precursor de DHT e estradiol.

TABELA 10 – RESPOSTA HORMONAL DE TESTOSTERONA DOS ANIMAIS MACHOS DOS GRUPOS CN, CP, T1, T2 E T3.

GRUPOS	MEDIA	TESTOSTERONA (NG/ML)			
		CN	CP	T1	T2
CN	1,919 ± 0,055				
CP	1,958 ± 0,042	0,33			
T1	1,930 ± 0,035	0,98	0,64		
T2	1,962 ± 0,028	0,25	0,99	0,54	
T3	1,957 ± 0,045	0,35	>0,99	0,67	0,99

p Valor: probabilidade de significância

GRÁFICO 1 – MÉDIA DA VARIAÇÃO HORMÔNAL DE TESTOSTERONA EM ANIMAIS MACHOS SEPARADOS EM GRUPOS (CN, CP, T1, T2 E T3). O CUT OFF DETERMINADO FOI >1,943.



5.4.1.3.3 Resultado da determinação de DHT pelo método ELISA em animais machos

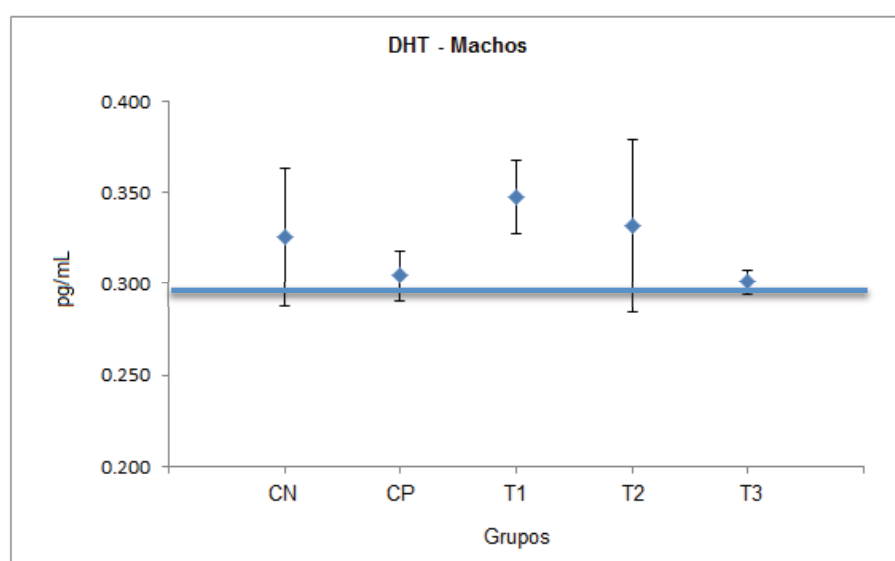
A análise hormonal de DHT apresentou diferença estatística para os grupos tratados T1 e T3, sendo esse último o que demonstrou o menor nível de DHT em animais machos submetidos ao tratamento (Gráfico 2; Tabela 11). Quando se comparou os outros grupos, eles não diferem estatisticamente entre si. O DHT é considerado o principal hormônio responsável pela queda capilar.

TABELA 11 – RESPOSTA HORMONAL DE DHT DOS ANIMAIS MACHOS DOS GRUPOS CN, CP, T1, T2 E T3.

GRUPOS	MEDIA	DHT (PG/ML)			
		CN	CP	T1	T2
CN	0,326 ± 0,037				
CP	0,305 ± 0,014	>0,99			
T1	0,348 ± 0,020	0,72	>0,99		
T2	0,332 ± 0,047	>0,99	>0,99	0,02	
T3	0,301 ± 0,006	>0,99	0,77	<0,01	>0,99

p Valor: probabilidade de significância

GRÁFICO 2 – MÉDIA DA VARIAÇÃO HORMÔNAL DE DHT EM ANIMAIS MACHOS SEPARADOS EM GRUPOS (CN, CP, T1, T2 E T3). O CUT OFF DETERMINADO FOI >0,297.



5.4.1.3.4 Resultado da determinação de estradiol pelo método ELISA em animais machos

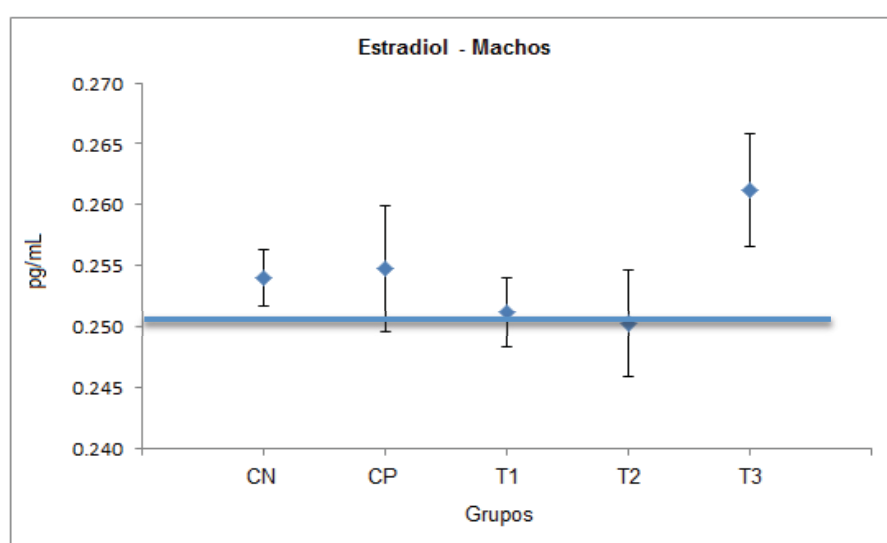
A dosagem do hormônio estradiol, em animais machos utilizados no estudo, mostrou alteração significativa para animais do grupo tratado com a loção capilar contendo a maior dosagem de extrato de esporos do fungo *G. lucidum* (T3). Para os animais dos grupos controle (CN e CP) e outros tratamentos (T1 e T2) a variação não foi significativa (Gráfico 3; Tabela 12). O aumento de estradiol sugere uma diminuição na rota metabólica de conversão de testosterona em DHT.

TABELA 12 – RESPOSTA HORMONAL DE ESTRADIOL DOS ANIMAIS MACHOS DOS GRUPOS CN, CP, T1, T2 E T3.

GRUPOS	MEDIA	ESTRADIOL (PG/ML)			
		CN	CP	T1	T2
CN	0,254 ± 0,002				
CP	0,255 ± 0,005	0,99			
T1	0,251 ± 0,003	0,64	0,42		
T2	0,250 ± 0,004	0,39	0,22	0,99	
T3	0,261 ± 0,005	0,01	0,02	<0,01	<0,01

p Valor: probabilidade de significância

GRÁFICO 3 – MÉDIA DA VARIAÇÃO HORMÔNAL DE ESTRADIOL EM ANIMAIS MACHOS SEPARADOS EM GRUPOS (CN, CP, T1, T2 E T3). O CUT OFF DETERMINADO FOI >0,251.



5.4.2 Avaliação da loção capilar em modelo animal – animais fêmeas

5.4.2.1 Análise macroscópica de animais fêmeas utilizadas no estudo

A análise macroscópica, dos animais fêmeas, mostrou diferença entre as respostas de grupos testes e controles positivos e negativos (Figura 14). O grupo que teve o crescimento mais expressivo de pelos, visível a olho nu, foi o grupo T2, onde evidencia-se o aparecimento de tufo de pelos na região de aplicação do produto teste (Figura 14-e). Crescimento semelhante, porém de menor evidência, ocorreu em dois animais fêmeas do grupo CP (Figura 14-b).

Os animais foram classificados de acordo com o crescimento visível dos pelos. A classificação variou de 0 a 4, sendo 0 para nenhum crescimento e 4 para

crescimento total. Essa classificação foi utilizada para comparação estatística entre os grupos CN, CP, T1, T2 e T3 (Tabela 13).

TABELA 13 – VALORES DAS MÉDIAS OBTIDAS A PARTIR DA CLASSIFICAÇÃO VISUAL DE CRESCIMENTO DE PELOS DE ANIMAIS FÊMEAS DOS GRUPOS CN, CP, T1, T2 E T3 E ANÁLISE ESTATÍSTICA.

GRUPOS	MÉDIA	p VALOR (TESTE DE TUKEY – 95%)			
		CN	CP	T1	T2
CN	0				
CP	1,000 ± 0,816	0,09			
T1	1,500 ± 0,577	<0,01	0,65		
T2	3,000 ± 0,000	<0,01	<0,01	<0,01	
T3	0,500 ± 0,577	0,65	0,65	0,09	<0,01

p Valor: probabilidade de significância

Os grupos controles, quando comparados entre si, são estatisticamente iguais. O grupo experimental que apresenta diferença entre os controles e os demais tratamentos é o grupo T2. Por esse motivo, essa foi a dosagem escolhida para dar seguimento aos testes da loção capilar formulada a partir de extrato de esporos de *G. lucidum*. Deu-se, portanto, continuidade às análises histológicas dos grupos CN, CP e T2.

5.4.2.2 Análise microscópica da pele dos animais fêmeas utilizados no estudo

Os folículos foram contados e classificados de acordo com sua fase de crescimento (anágenos ou catágenos/telógenos), e seus diâmetros foram medidos. As lâminas histológicas dos animais fêmeas submetidas ao tratamento 2 apresentaram uma quantidade 55% superior de folículos capilares quando comparado aos grupos CN e CP (Figura 15). Os folículos analisados do grupo T2, anágenos ou catágenos/telógenos, aumentaram em até 10 vezes seu diâmetro em relação aos grupos CN e CP (Figura 16).

Ao compararmos a quantidade de folículos anágenos contados nos grupos controles (CN e CP) e no grupo tratamento (T2), apenas o grupo tratado com a loção capilar teste apresentou diferença estatística. Os folículos catágenos/telógenos apresentaram um aumento progressivo nos grupos CN, CP e T2, sendo nesse último grupo a maior quantidade encontrada de folículos. Todos os grupos apresentaram diferença estatística entre si. O número total de folículos contados foi maior para o

grupo T2, ultrapassando, inclusive, a quantidade contada nos animais do grupo CP (Tabela 15).

FIGURA 15 – FOTOGRAFIAS EXEMPLIFICANDO OS ANIMAIS FÊMEAS DOS GRUPOS (a) CONTROLE NEGATIVO (CN) E (b) CONTROLE POSITIVO (CP) COM OS GRUPOS DE TRATAMENTOS T1 (c), T2 (d), T3 (e).

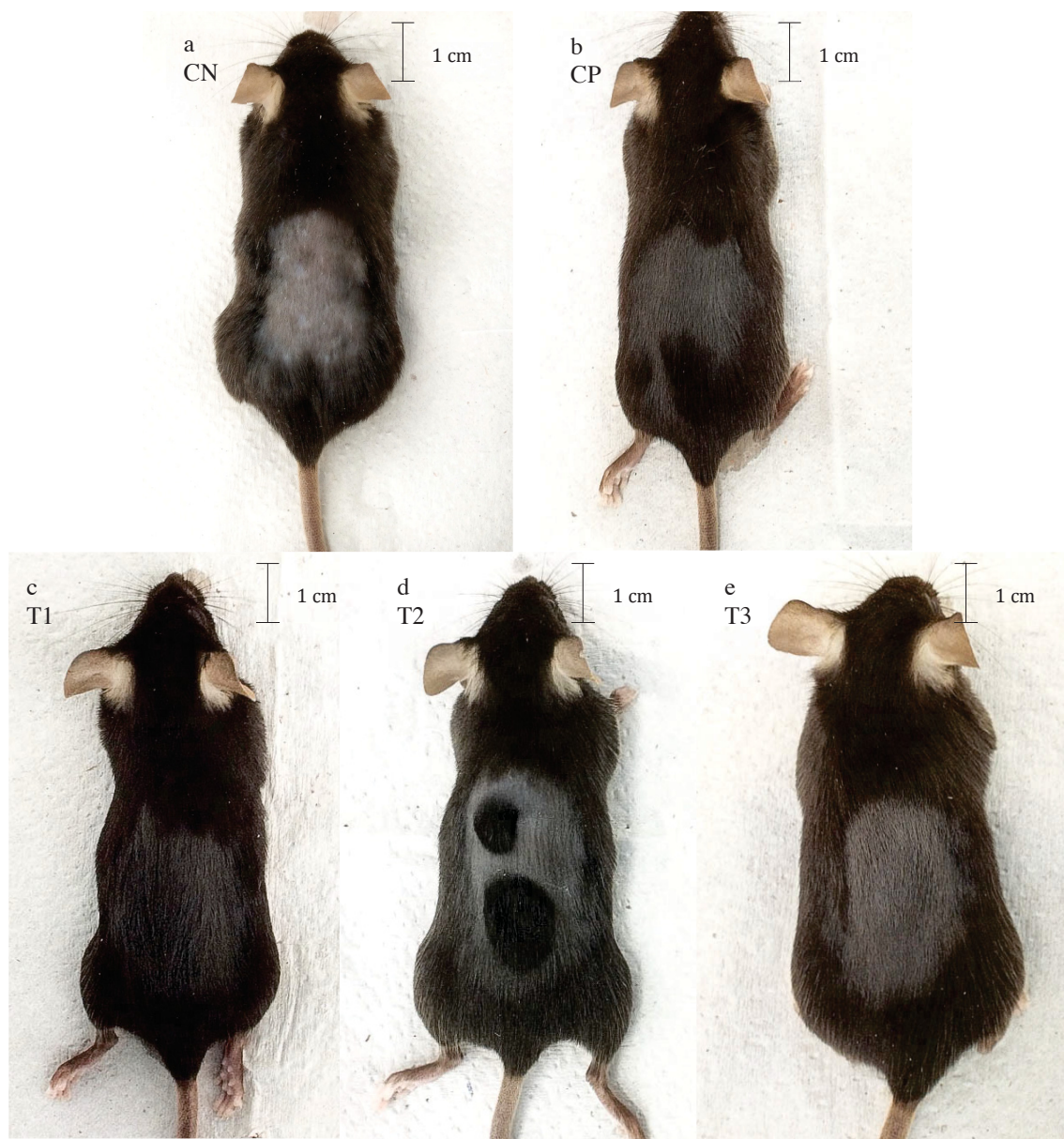


FIGURA 16 – EXEMPLO DE CORTES HISTOLÓGICOS EM ANIMAIS FÊMEAS DOS GRUPOS (a) CONTROLE NEGATIVO (CN), (b) CONTROLE POSITIVO (CP) E (c) TRATAMENTO 2 (T2).

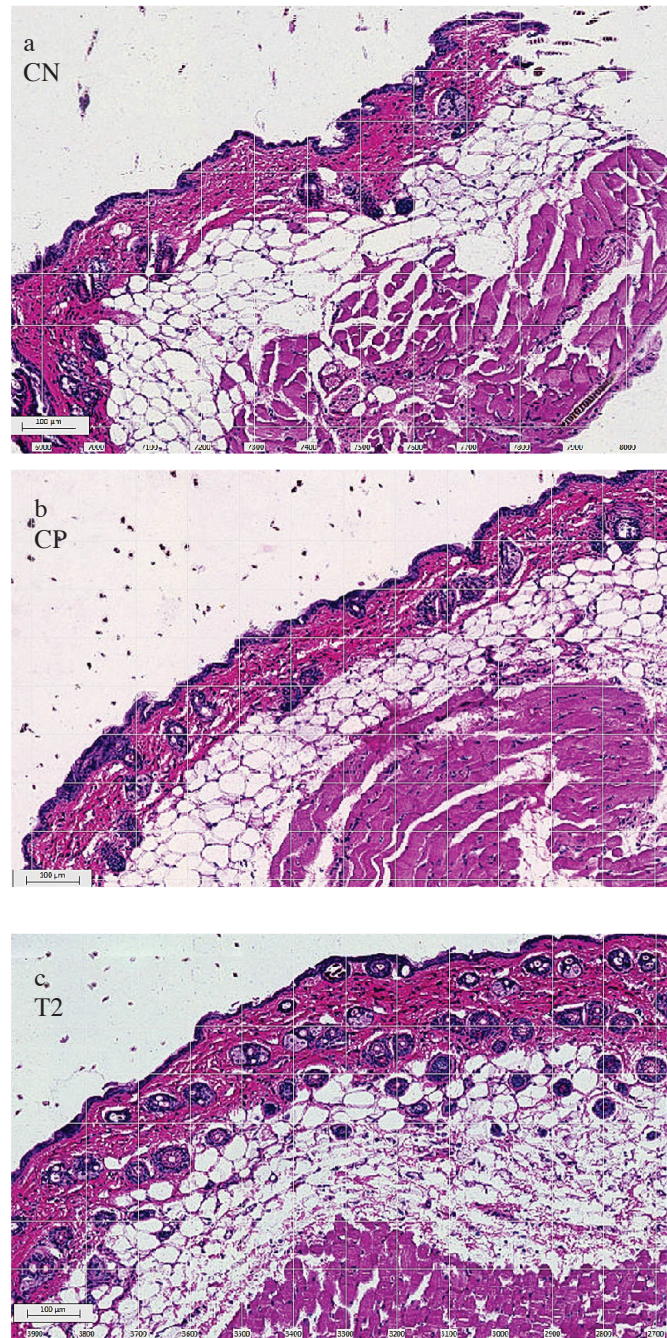


TABELA 14 – MÉDIA DA QUANTIDADE E CLASSIFICAÇÃO DE FOLÍCULOS (ANÁGENOS OU CATÁGENOS/TELÓGENOS) CONTADOS EM LAMINAS HISTOLÓGICAS DE ANIMAIS FÊMEAS, DOS GRUPOS CN, CP E T3 E SUA ANÁLISE ESTATÍSTICA.

GRUPOS	FOLÍCULOS ANÁGENOS		FOLÍCULOS CATÁGENOS/TELÓGENOS		FOLÍCULOS TOTAIS	
	MÉDIA	p VALOR CN CP	MÉDIA	p VALOR CN CP	MÉDIA	p VALOR CN CP
CN	1,944 ± 0,686		16,056 ± 2,012		18,000 ± 2,222	
CP	3,667 ± 0,926	0,72	32,063 ± 2,600	<0,01	35,729 ± 2,613	0,01
T2	11,306 ± 1,361	<0,01 0,01	55,333 ± 4,022	<0,01 <0,01	65,264 ± 3,770	<0,01 <0,01

p Valor: probabilidade de significância

Os diâmetros dos folículos em fase anágena (a_1 e b_1) dos grupos CP e T2 aumentaram em relação ao grupo CN. O maior aumento foi observado no grupo de tratamento 2, porém essa diferença não foi estatisticamente significativa (Tabela 15).

TABELA 15 – MÉDIA E ANÁLISE ESTATÍSTICA DO TAMANHO DE FOLÍCULOS ANÁGENOS CONTADOS EM LAMINAS HISTOLÓGICAS DE ANIMAIS FÊMEAS, DOS GRUPOS CN, CP E T3.

GRUPOS DIÂMETROS	FOLÍCULOS ANÁGENOS					
	a_1	p VALOR CN CP		b_1	p VALOR CN CP	
CN	24,683 ± 3,514			28,783 ± 3,968		
CP	25,092 ± 2,449	0,99		29,362 ± 2,533	0,98	
T2	34,473 ± 1,029	0,13	0,15	37,302 ± 2,465	0,14	0,17

p Valor: probabilidade de significância

Os folículos em fase catágena/telógena apresentam 4 diâmetros diferentes, nomeados: a_2 , b_2 , c_2 e d_2 . Não houve diferença entre os grupos controle (CN e CP) e tratamento (T2) estatisticamente significativa (Tabela 16).

A loção capilar formulada contendo 5% de extrato esporo de *G. lucidum* (T2), mostrou um aumento na quantidade dos folículos capilares de animais fêmeas quando comparada aos grupos CN e CP. As análises das medidas dos folículos indicam que não houve aumento significativo do diâmetro dos fios.

TABELA 16 – MÉDIA E ANÁLISE ESTATÍSTICA DO TAMANHO DE FOLÍCULOS CATÁGENOS/TELÓGENOS CONTADOS EM LAMINAS HISTOLÓGICAS DE ANIMAIS FÊMEAS, DOS GRUPOS CN, CP E T3.

GRUPOS	FOLÍCULOS CATÁGENOS/TELÓGENOS												
	DIÂM	a ₂	p VALOR		b ₂	p VALOR		c ₂	p VALOR		d ₂	p VALOR	
			CN	CP		CN	CP		CN	CP		CN	CP
CN		29,360			28,583			7,219 ±			7,163 ±		
		± 2,182			± 2,173			0,549			0,466		
CP		35,896	0,46		37,140	0,23		10,124	0,16		10,316	0,14	
		± 1,056			± 1,191			± 0,430			± 0,457		
T2		35,723	0,48	0,99	33,976	0,53	0,79	10,938	0,06	0,84	10,687	0,09	0,96
		± 1,768			± 1,221			± 0,549			± 0,616		

p Valor: probabilidade de significância

5.4.2.3 Análises das respostas hormonais de animais fêmeas utilizadas no estudo

As dosagens dos hormônios de animais fêmeas seguiu de acordo com a padronização do teste ELISA para este estudo (Tabela 9).

5.4.2.3.1 Resultado da determinação de testosterona pelo método ELISA em animais fêmeas

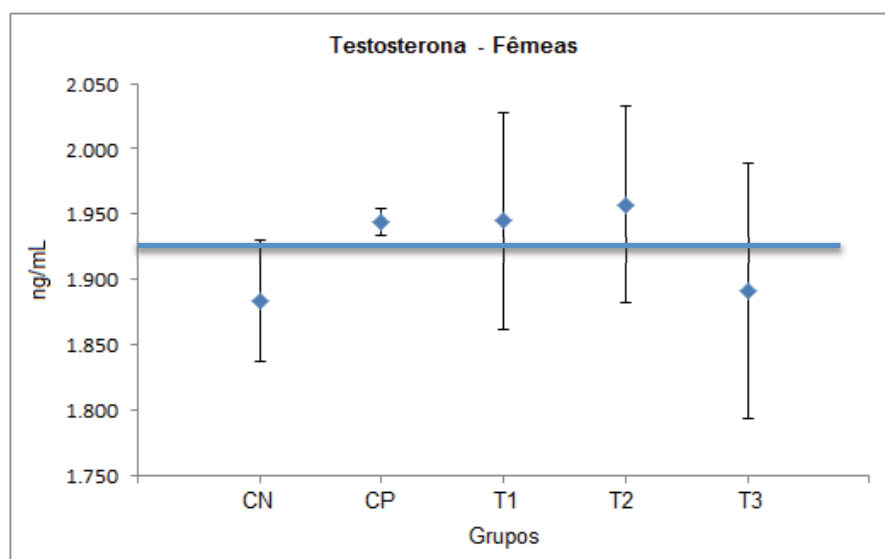
A dosagem do hormônio testosterona em animais fêmeas utilizadas no estudo, apresentou alteração significativa quando compara-se o grupo CN e o grupo T2 (Gráfico 4; Tabela 17). Para os outros grupos, não houve diferença estatística nos valores. A dosagem de 5% de extrato de esporos de *G. lucidum* (T2) apresentou um aumento na quantidade de testosterona nos animais desse grupo. Isso indica uma possível redução na atividade da enzima 5- α -redutase, responsável pela conversão de testosterona em DHT.

TABELA 17 – RESPOSTA HORMONAL DE TESTOSTERONA DOS ANIMAIS FÊMEAS DOS GRUPOS CN, CP, T1, T2 E T3.

GRUPOS	MÉDIA	TESTOSTERONA (NG/ML)			
		CN	CP	T1	T2
CN	1,883 ± 0,046				
CP	1,944 ± 0,011	0,32			
T1	1,945 ± 0,083	0,10	>0,99		
T2	1,957 ± 0,076	0,02	>0,99	>0,99	
T3	1,891 ± 0,098	>0,99	>0,99	>0,99	0,52

p Valor: probabilidade de significância

GRÁFICO 4 – MÉDIA DA VARIAÇÃO HORMÔNAL DE TESTOSTERONA EM ANIMAIS FÊMEAS SEPARADAS EM GRUPOS (CN, CP, T1, T2 E T3). O CUT OFF DETERMINADO FOI >1,925.



5.4.2.3.2 Resultado da determinação de DHT pelo método ELISA em animais fêmeas

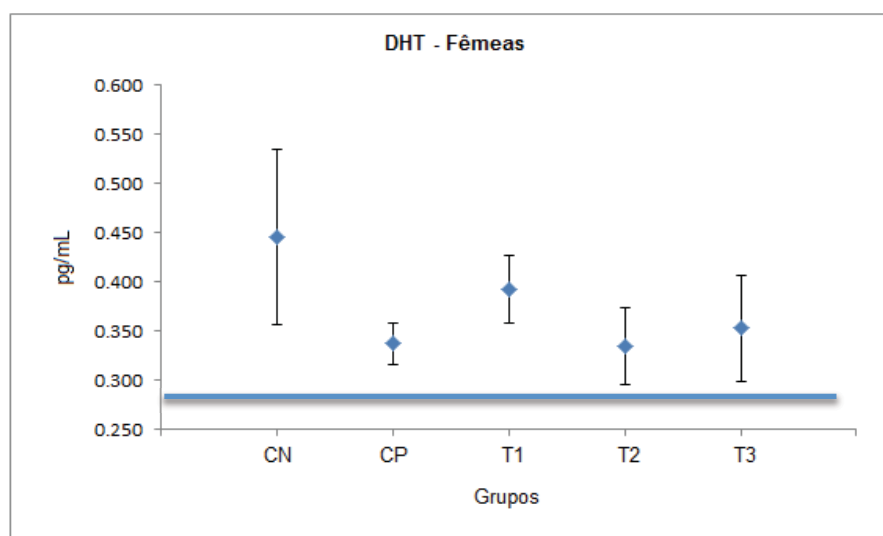
O hormônio DHT apresentou diminuição estatisticamente significativa para os grupos CP e T2 quando comparados ao grupo CN, e se comparados entre si. O grupo T2 foi o único grupo experimental que apresentou diferença estatística quando comparado aos demais (T1 e T2) (Gráfico 5; Tabela 18). O DHT é considerado o principal hormônio responsável pela queda capilar, e provém da conversão enzimática de testosterona pela enzima 5- α -redutase.

TABELA 18 – RESPOSTA HORMONAL DE DHT DOS ANIMAIS FÊMEAS DOS GRUPOS CN, CP, T1, T2 E T3.

GRUPOS	MEDIA	DHT (PG/ML)			
		CN	CP	T1	T2
CN	0,445 \pm 0,089				
CP	0,337 \pm 0,021	<0,01			
T1	0,392 \pm 0,034	>0,99	0,17		
T2	0,334 \pm 0,039	<0,01	<0,01	0,02	
T3	0,352 \pm 0,054	0,10	>0,99	0,12	<0,01

p Valor: probabilidade de significância

GRÁFICO 5 – MÉDIA DA VARIAÇÃO HORMÔNAL DE DHT EM ANIMAIS FÊMEAS SEPARADAS EM GRUPOS (CN, CP, T1, T2 E T3). O CUT OFF DETERMINADO FOI >0,293.



5.4.2.3.3 Resultado da determinação de estradiol pelo método ELISA em animais fêmeas

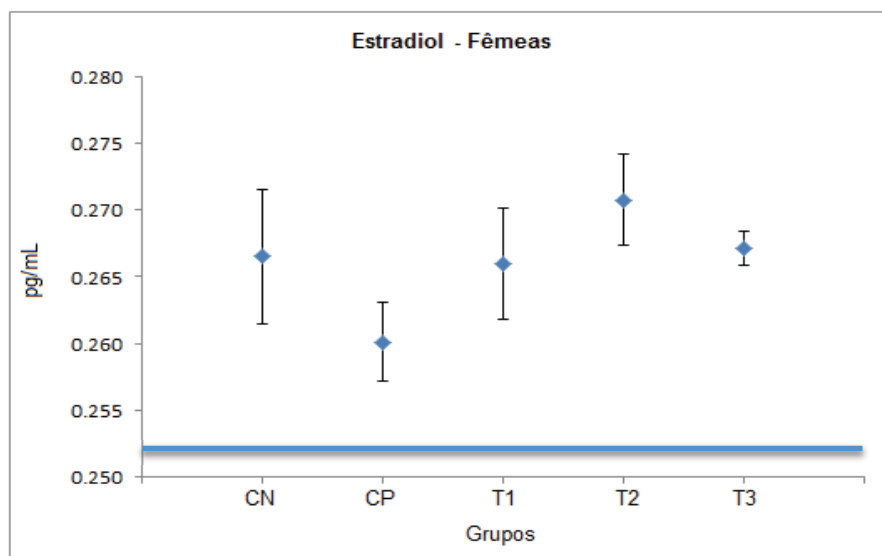
A dosagem hormonal de estradiol apresentou alteração significativa estatisticamente entre os grupos. Quando comparados, os grupos CN, T1 e T3 diferem dos grupos CP e T2. O grupo CP foi estatisticamente igual ao grupo T2 (Gráfico 6; Tabela 19). Acredita-se que o hormônio estradiol seja um dos responsáveis pela manutenção dos fios capilares sem que ocorra queda. O produto teste foi tão eficaz quanto o grupo CP, constituído por uma formulação já utilizada no mercado, no quesito hormonal para estradiol.

TABELA 19 – RESPOSTA HORMONAL DE ESTRADIOL DOS ANIMAIS FÊMEAS DOS GRUPOS CN, CP, T1, T2 E T3.

GRUPOS	MEDIA	ESTRADIOL (PG/ML)			
		CN	CP	T1	T2
CN	0,267 ± 0,005				
CP	0,260 ± 0,003	0,04			
T1	0,266 ± 0,004	0,31	<0,01		
T2	0,271 ± 0,003	0,04	>0,99	<0,01	
T3	0,267 ± 0,001	0,99	0,02	0,47	0,02

p Valor: probabilidade de significância

GRÁFICO 6 – MÉDIA DA VARIAÇÃO HORMÔNAL DE ESTRADIOL EM ANIMAIS FÊMEAS SEPARADAS EM GRUPOS (CN, CP, T1, T2 E T3). O CUT OFF DETERMINADO FOI $>0,252$.



5.5 AVALIAÇÃO DA LOÇÃO CAPILAR EM SERES HUMANOS

Setenta pacientes foram convidados a participar do estudo. Destes, 35 eram homens e 35 mulheres. Dois pacientes homens desistiram da continuidade da pesquisa. Um homem relatou o uso incorreto da loção e foi excluído da pesquisa. Uma paciente mulher desistiu do estudo. O direito a desistência prevista no TCLE assinado pelos pacientes foi assegurado a todos.

Os dados foram calculados com um n de 32 homens e 34 mulheres, totalizando 66 pacientes dos 70 recrutados.

5.5.1 Avaliação dos efeitos da loção capilar em seres humanos – homens

Para os homens, a resposta positiva com 30 dias de tratamento foi de 52,38%, com 60 e 90 dias foi de 23,81% respectivamente. Além dos pacientes do grupo controle negativo, um paciente não apresentou resposta ao tratamento.

5.5.1.1 Análise subjetiva – avaliação dos pacientes homens ao tratamento

A partir do questionário entregue aos pacientes, foi possível a avaliação subjetiva dos efeitos da loção capilar em teste. Os efeitos mais relatados pelos homens

foram: a melhora na queda capilar, o nascimento de novos fios e melhora na qualidade do fio de cabelo, como hidratação, diminuição de oleosidade do couro cabeludo e o escurecimento dos novos fios de cabelos. Nenhum paciente relatou efeito adverso, como coceiras, vermelhidão, irritabilidade ou piora do quadro clínico de alopecia. A aceitação do produto foi de 95,5% para homens (Tabela 20).

TABELA 20 – PORCENTAGEM DE CADA RELATO DE MELHORIA OU EFEITO ADVERSO FEITO POR PACIENTES HOMENS EM TRATAMENTO ATRAVÉS DE FICHA DE AUTO AVALIAÇÃO.

ALTERAÇÕES CAPILARES	HOMENS
Melhora da queda capilar	86,34%
Melhora na resistência dos fios	54,54%
Aumento de diâmetro dos fios	36,36%
Nascimento de novos fios	82,08%
Aumento do brilho do fio	63,64%
Outros	18,2% *
Efeitos adversos	Não houve relatos
Nota ao produto (0 a 10)	9,2
Possibilidade de compra da loção	95,5%

5.5.1.2 Análise macroscópica de couro cabeludo realizada em pacientes homens

O paciente H1, antes do tratamento (Figura 17a), apresentava falhas por todo o couro cabeludo. Após a utilização da loção teste por 30 dias (Figura 17b) foi possível perceber o surgimento de novos fios de cabelo e com 90 dias de tratamento (Figura 17c) observou-se grande diminuição da região de falhas.

O paciente H2, antes do tratamento (Figura 18a) apresentava uma extensa região calva, e após 60 dias de uso da loção capilar teste (Figura 18b) foi possível observar o nascimento e crescimento de novos fios de cabelo, e a pigmentação dos mesmos.

O paciente H3 antes do tratamento (Figura 19a) apresentava uma extensa região calva e, onde haviam fios de cabelo, os mesmos eram despigmentados. Após 90 dias de tratamento (Figura 19b) observou-se o nascimento e crescimento de novos fios de cabelo, inclusive pigmentados.

No couro cabeludo do paciente H4, antes do tratamento (Figura 20a), observava-se uma região amplamente calva, e a região ainda recoberta, possuíam fios finos de cabelo. Após 30 dias de uso da loção capilar teste (Figura 20b) pode-se observar o nascimento e crescimento de fios de cabelo em região anteriormente calva, recobrando a área com fios mais densos.

FIGURA 17 – FOTOGRAFIA CAPILAR DO PACIENTE H1 NO TEMPO 0 (a), APÓS 30 DIAS DE TRATAMENTO (b) E APÓS 90 DIAS DE TRATAMENTO (c).

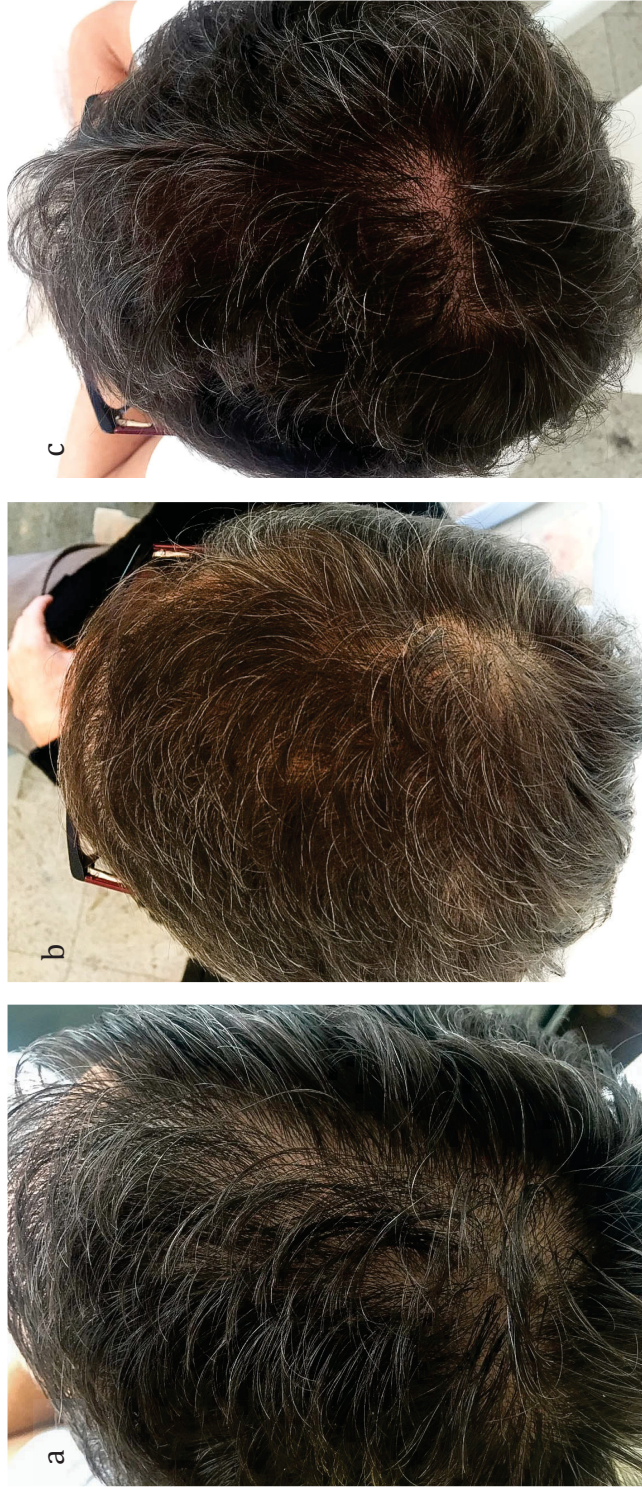


FIGURA 18 – FOTOGRAFIA CAPILAR DO PACIENTE H2 NO TEMPO 0 (a) E COM 60 DIAS DE TRATAMENTO (b).



FIGURA 19 – FOTOGRAFIA CAPILAR DO PACIENTE H3 NO TEMPO 0 (a) E COM 90 DIAS DE TRATAMENTO (b).



FIGURA 20 – FOTOGRAFIA CAPILAR DO PACIENTE H4 NO TEMPO 0 (a) E COM 30 DIAS DE TRATAMENTO (b)



O paciente H5 mostrou resposta positiva ao tratamento após 60 dias de uso (Figura 21b). Pode-se observar o nascimento e crescimento de fios de cabelo em áreas previamente calvas (Figura 21a).

O paciente H6 também apresentou resultado positivo ao tratamento com a loção em teste após 30 dias de uso (Figura 22b). Observou-se o nascimento e crescimento de fios de cabelo diminuindo a região de falhas (Figura 22a).

5.5.1.3 Análise microscópica de couro cabeludo de pacientes homens

As fotos microscópicas obtidas com dermatoscópio foram analisadas e confirmaram o visualizado nas análises macroscópicas. As regiões calvas de pacientes homens (Figura 23a) foram recobertas por novos fios de cabelo (Figura 23b). Nenhuma alteração em couro cabeludo indicativa de alergia ou outra agressão à pele foi encontrada (fissuras, vermelhidão, edema).

FIGURA 21 – FOTOGRAFIA CAPILAR DO PACIENTE H5 TEMPO 0 (a) E COM 60 DIAS DE TRATAMENTO (b).

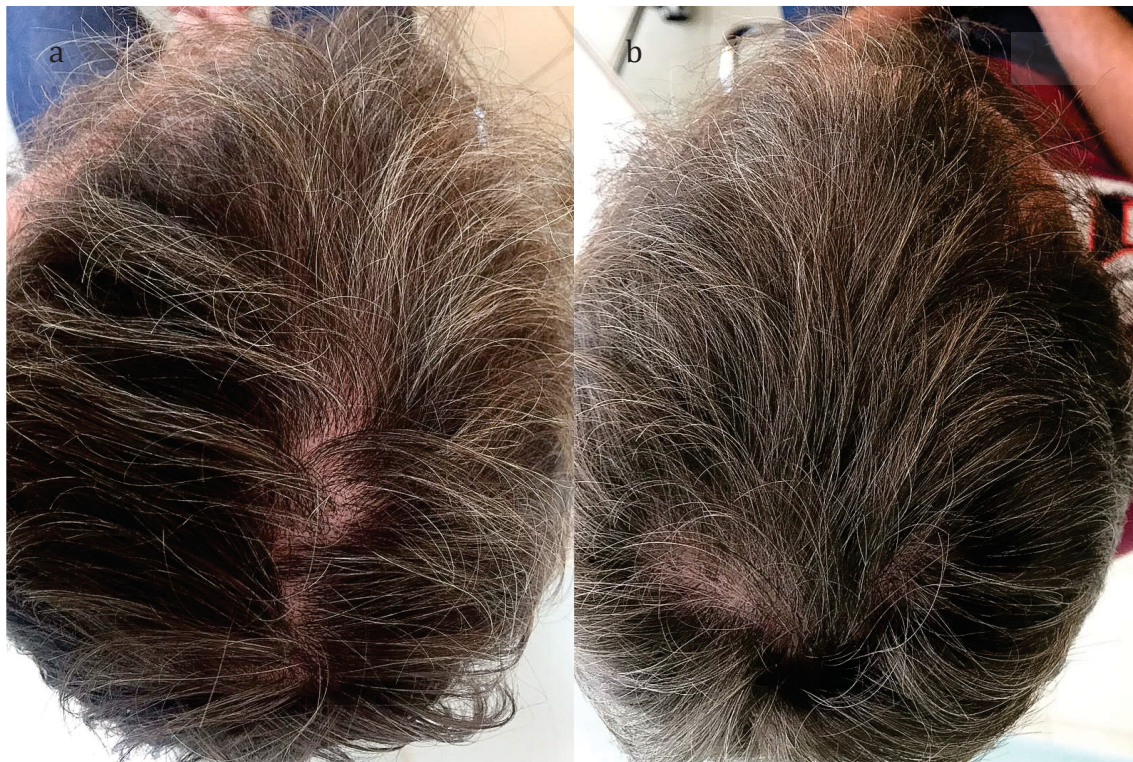


FIGURA 22 – FOTOGRAFIA CAPILAR DO PACIENTE H6 NO TEMPO 0 (a) E COM 30 DIAS DE TRATAMENTO (b).

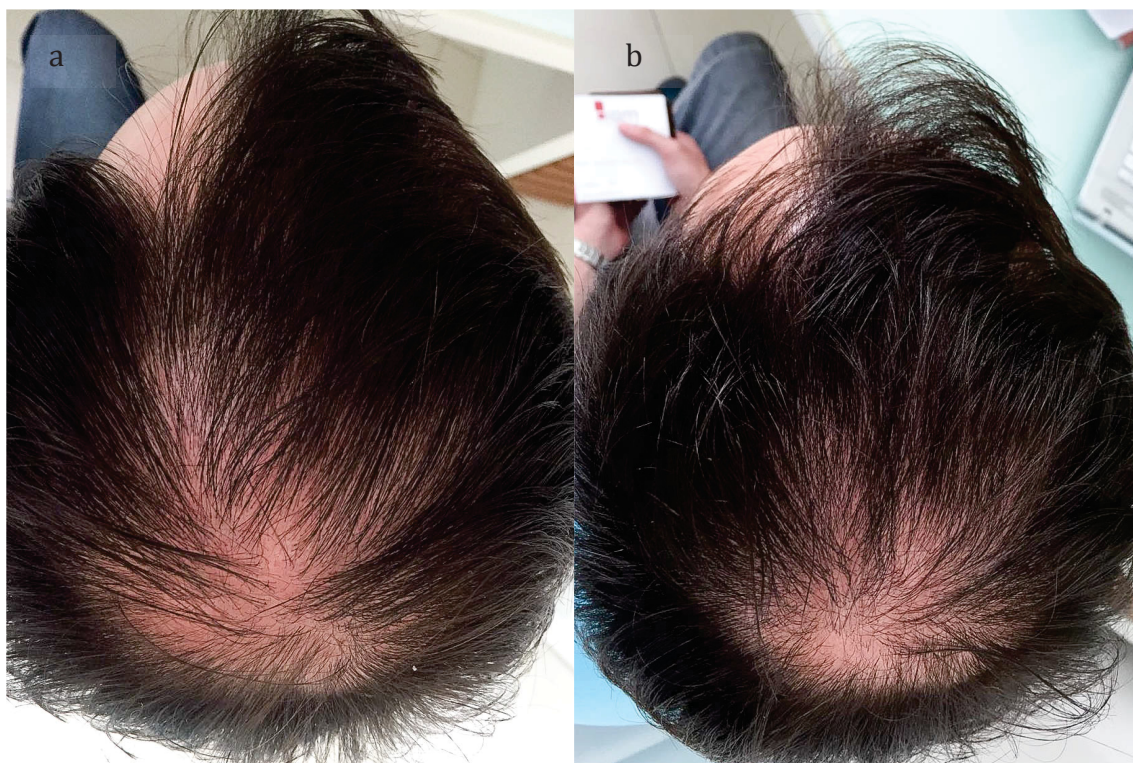
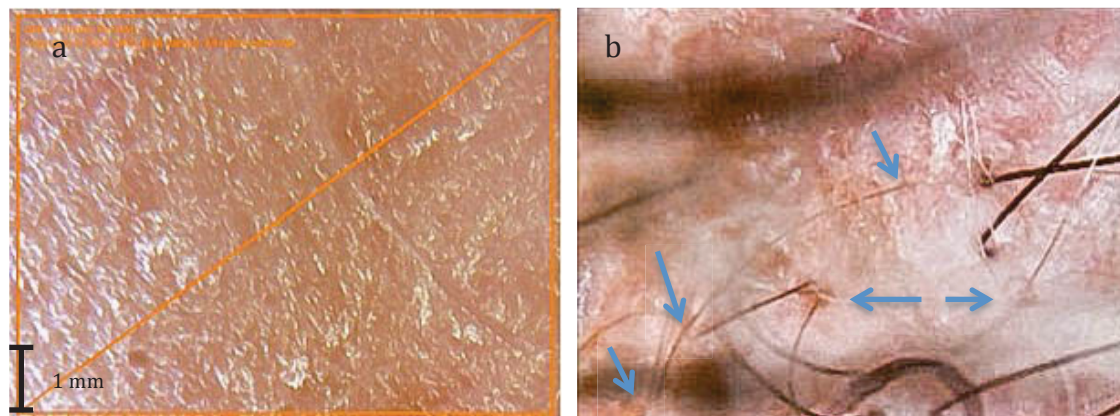


FIGURA 23 – FOTOS MICROSCÓPICAS DE COURO CABELUDO DE PACIENTE HOMEM NO TEMPO 0 (a) E COM 30 DIAS DE TRATAMENTO (b). AS SETAS INDICAM NOVOS FIOS DE CABELO QUE NASCERAM E CRESCERAM APÓS TRATAMENTO COM A LOÇÃO TESTE.



Todas as fotos apresentam a mesma escala da letra a.

5.5.1.4 Análise de variáveis endógenas e correlação com o tratamento com loção teste em homens

A idade e a dosagem hormonal inicial foram levadas em consideração na análise da resposta do tratamento com a loção teste.

5.5.1.4.1 Alteração de resultados perante a idade de homens

A variável idade foi comparada entre os pacientes do grupo T3 em homens. Os pacientes foram separados em 3 grupos de acordo com a idade (18 a 30 anos, 30 a 60 anos e mais de 60 anos) e verificou-se o tempo de resposta ao tratamento em cada um deles. Não houve alteração estatística em relação a esse parâmetro, indicando que a idade é uma variável independente para homens (Tabela 21).

TABELA 21 – ANÁLISE ESTATÍSTICA DO TEMPO DE RESPOSTA DA LOÇÃO TESTE EM PACIENTES HOMENS DE ACORDO COM A IDADE.

	χ^2	30 dias p Valor	df	χ^2	60 dias p Valor	df	χ^2	90 dias p Valor	df
18 a 30 anos									
30 a 60 anos	0,80	0,66	2	0,54	0,76	2	2,63	0,26	2
>60 anos									

χ^2 : chi quadrado; p Valor: probabilidade de significância; df: graus de liberdade.

5.5.1.4.2 Alteração de resultados perante a dosagem hormonal inicial de homens

A dosagem inicial de hormônios DHT e Testosterona mostrou-se uma variável dependente em homens para o início da resposta ao tratamento com a loção teste. Quanto maior o nível de testosterona e menor o de DHT, mais rápida foi a resposta dos pacientes ao tratamento. O hormônio estradiol não mostrou alteração significativa, sendo, portanto, uma variável independente para o tempo de resposta em homens.

TABELA 22 – MÉDIAS INICIAIS DOS HORMÔNIOS TESTOSTERONA, DHT E ESTRADIOL, DOS PACIENTES HOMENS SUBMETIDOS A TESTES COM LOÇÃO CAPILAR FORMULADA COM EXTRATO DE ESPORO DE *G. LUCIDUM*. ANÁLISE ESTATÍSTICA DESSES VALORES DE ACORDO COM O TEMPO DE RESPOSTA POSITIVA.

	Testosterona (ng/dL)		DHT (pg/mL)		Estradiol (pg/mL)	
	Média (pacientes)	p Valor	Média (pacientes)	p Valor	Média (pacientes)	p Valor
30 dias	515		378		31,9	
60 dias	491,04	0,02	442,28	0,04	29	0,78
90 dias	325,88		552,75		23,38	

p Valor: probabilidade de significância

5.5.1.5 Análise de variáveis exógenas e correlação com tratamento em homens

As variáveis exógenas consideradas nesse estudo foram possíveis interações entre o uso da loção capilar teste e medicamentos utilizados pelos pacientes ou tratamentos capilares anteriores.

5.5.1.5.1 Alteração de resultados perante tratamento x medicamentos em homens

Os medicamentos avaliados como possíveis interferentes ao tratamento com a loção capilar em teste foram: anti-hipertensivos, antidepressivos e hipoglicemiantes. Nenhum desses medicamentos apresentaram alteração significativa no tratamento masculino, mesmo quando pacientes relataram o uso de mais de uma dessas classes simultaneamente (Tabela 23).

TABELA 23 – CLASSE DE MEDICAMENTOS UTILIZADOS PELOS PACIENTES HOMENS (%) E ANÁLISE ESTATÍSTICA DE POSSÍVEL INTERAÇÃO EM TEMPO DE RESPOSTA AO TRATAMENTO DA LOÇÃO TESTE.

	% pacientes	30 dias			60 dias			90 dias		
		x ²	p	df	x ²	p	df	x ²	p	df
Anti-hipertensivo	13,63									
Antidepressivo	4,54									
Anti-hipertensivo + Hipoglicemiante	4,54									
Anti-hipertensivo + Antidepressivo + Hipoglicemiante	4,54	3,33	0,50	4	3,51	0,47	4	6,63	0,20	4
Nenhum medicamento	72,72									

x²: chi quadrado; p Valor: probabilidade de significância; df: graus de liberdade.

5.5.1.5.2 Alteração de resultados perante tratamentos capilares anteriores para homens

Os pacientes masculinos que já haviam feito algum tratamento capilar, oral, tópico ou ambos, corresponderam a 22,72%, todos sem sucesso. Esse fator não mostrou ser significativo estatisticamente para alterar o resultado do tratamento da loção em teste (Tabela 24).

TABELA 24 – ANÁLISE DE POSSÍVEL INTERFERÊNCIA EM RESPOSTA AO TRATAMENTO COM LOÇÃO TESTE, EM PACIENTES HOMENS QUE HAVIAM FEITO TRATAMENTOS CAPILARES ANTERIORES.

	% pacientes	x ²	p	df
Tópico	4,54			
Oral	13,63			
Tópico + Oral	4,54	0,30	0,95	3
Nenhum	77,27			

x²: chi quadrado; p Valor: probabilidade de significância; df: graus de liberdade.

5.5.2 Avaliação dos efeitos da loção capilar em seres humanos – mulheres

Para as mulheres, a resposta positiva com 30 dias de tratamento foi de 58,64%, com 60 e 90 dias foi de 20,68% respectivamente. Exceto as pacientes que fizeram parte do grupo controle negativo, todas apresentaram resposta positiva ao tratamento com a loção teste.

5.5.2.1 Análise subjetiva – avaliação dos pacientes mulheres ao tratamento

A partir das respostas obtidas por questionário entregue aos pacientes, foi possível a avaliação subjetiva dos efeitos da loção capilar formulada a partir de extrato de esporos de *G. lucidum*. Os efeitos mais relatados pelas mulheres foram: a melhora na queda capilar, nascimento de novos fios e melhora na qualidade do fio de cabelo, como hidratação, diminuição de oleosidade do couro cabeludo, crescimento acelerado dos fios de cabelo e uma paciente relatou o fortalecimento das unhas (devido ao fato de a aplicação ser feita manualmente). Nenhum paciente relatou efeito adverso, como coceiras, vermelhidão, irritabilidade ou piora do quadro clínico de alopecia. A aceitação do produto foi de 100% para mulheres (Tabela 25).

TABELA 25 – PORCENTAGEM DE CADA RELATO DE MELHORIA OU EFEITO ADVERSO FEITO POR PACIENTES MULHERES EM TRATAMENTO ATRAVÉS DE FICHA DE AUTO AVALIAÇÃO.

ALTERAÇÕES CAPILARES	MULHERES
Melhora da queda capilar	96,55%
Melhora na resistência dos fios	65,52%
Aumento de diâmetro dos fios	17,24%
Nascimento de novos fios	93,11%
Aumento do brilho do fio	62,07%
Outros	90,02%
Efeitos adversos	Não houve relatos
Nota ao produto (0 a 10)	9,4
Possibilidade de compra da loção	100%

5.5.2.2 Análise macroscópica de couro cabeludo realizada em pacientes mulheres

A paciente M1, antes do tratamento (Figura 24a), apresentava áreas de falhas capilar na região lateral. Após o tratamento com a loção teste (Figura 24b) por 30 dias, já foi possível observar o crescimento capilar e diminuindo as falhas.

A paciente M2 apresentou, após 30 dias de tratamento, o nascimento e crescimento de fios de cabelos na região frontotemporal (Figura 25b), onde antes (Figura 25a) eram inexistentes.

As pacientes M3 (Figura 26a) e M4 (Figura 26b), ambas após 60 dias de tratamento com a loção teste, apresentaram crescimento capilar na região frontotemporal.

FIGURA 24 – FOTOGRAFIA CAPILAR DA PACIENTE M1 NO TEMPO 0 (a) E APÓS 30 DIAS DE USO DA LOÇÃO (b).



FIGURA 25 – FOTOGRAFIA CAPILAR DA PACIENTE M2 NO TEMPO 0 (a) E APÓS 30 DIAS DE USO DA LOÇÃO (b).

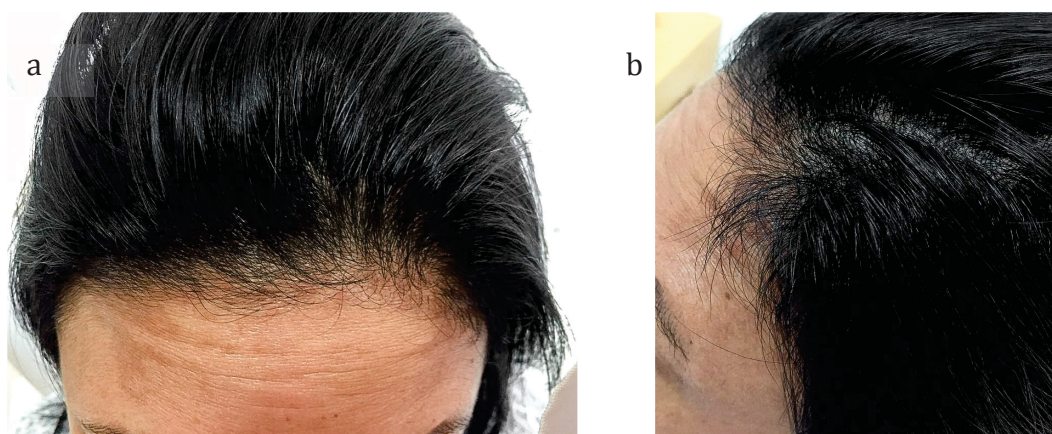
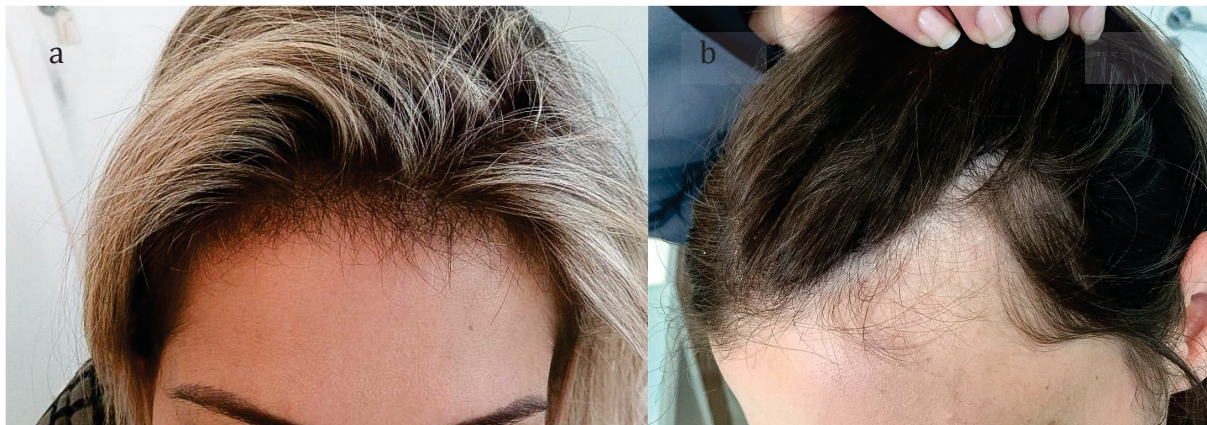


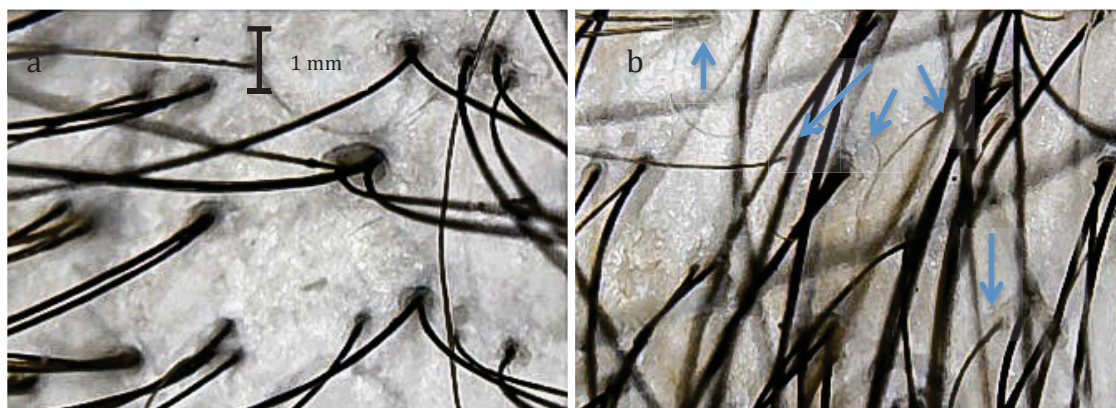
FIGURA 26 – FOTOGRAFIA CAPILAR DA PACIENTE M3 (a) E M2 (b) APÓS 60 DIAS DE USO DA LOÇÃO.



5.5.2.3 Análise Microscópica de Couro Cabeludo de Pacientes Mulheres

As fotos microscópicas obtidas com dermatoscópio foram analisadas e confirmaram o visualizado nas análises macroscópicas. As regiões de falhas capilares de pacientes femininas (Figura 27a) foram recobertas por novos fios de cabelo (Figura 27b). Nenhuma alteração em couro cabeludo indicativa de alergia ou outra agressão à pele foi encontrada (fissuras, vermelhidão, edema).

FIGURA 27 – FOTOS MICROSCÓPICAS DE COURO CABELUDO DE PACIENTE FEMININA NO TEMPO 0 (a) E COM 30 DIAS DE TRATAMENTO (b). AS SETAS INDICAM NOVOS FIOS DE CABELO QUE NASCERAM E CRESCERAM APÓS TRATAMENTO COM A LOÇÃO TESTE.



5.5.2.4 Análise de variáveis endógenas e correlação com o tratamento com loção teste em mulheres

A idade e a dosagem hormonal inicial foram levadas em consideração na análise da resposta do tratamento com a loção teste.

5.5.2.4.1 Alteração de resultados perante a idade de mulheres

A variável idade foi comparada entre as pacientes do grupo T2 em mulheres. As pacientes foram separadas em 3 grupos de acordo com a idade (18 a 30 anos, 30 a 60 anos e mais de 60 anos) e, verificou-se o tempo de resposta ao tratamento em cada um deles. Não houve alteração estatística em relação a esse parâmetro, indicando que a idade é uma variável independente para mulheres (Tabela 26).

TABELA 26 – ANÁLISE ESTATÍSTICA DO TEMPO DE RESPOSTA DA LOÇÃO TESTE EM PACIENTES MULHERES DE ACORDO COM A IDADE.

	30 dias			60 dias			90 dias		
	x ²	p Valor	df	x ²	p Valor	df	x ²	p Valor	df
18 a 30 anos									
30 a 60 anos	1,69	0,42	2	1,56	0,45	2	1,64	0,43	2
>60 anos									

x²: chi quadrado; p Valor: probabilidade de significância; df: graus de liberdade.

5.5.2.4.2 Alteração de resultados perante a dosagem hormonal inicial de mulheres

A dosagem inicial de hormônios DHT, testosterona e estradiol, de pacientes mulheres, não apresentou diferença estatística significativa que pudesse torná-los uma variável dependente ao tempo de resposta positiva (Tabela 27).

TABELA 27 – MÉDIAS INICIAIS DOS HORMÔNIOS TESTOSTERONA, DHT E ESTRADIOL, DE PACIENTES MULHERES SUBMETIDAS A TESTES COM LOÇÃO CAPILAR FORMULADA COM EXTRATO DE ESPORO DE *G. LUCIDUM*. ANÁLISE ESTATÍSTICA DESSES VALORES DE ACORDO COM O TEMPO DE RESPOSTA POSITIVA.

	Testosterona (ng/dL)		DHT (pg/mL)		Estradiol (pg/mL)	
	Média (pacientes)	p Valor	Média (pacientes)	p Valor	Média (pacientes)	p Valor
30 dias	38,65		269,90		116,49	
60 dias	29,54	0,18	212,41	0,55	53,75	0,13
90 dias	19,05		143,83		20	

p Valor: probabilidade de significância

5.5.2.5 Análise de variáveis exógenas e correlação com tratamento em mulheres

As variáveis exógenas consideradas nesse estudo foram possíveis interações entre o uso da loção capilar teste e medicamentos de uso contínuo utilizados pelos pacientes, ou tratamentos capilares anteriores.

5.5.2.5.1 Alteração de resultados perante tratamento x medicamentos em mulheres

Os medicamentos avaliados como possíveis interferentes ao tratamento com a loção capilar em teste foram: anti-hipertensivos, antidepressivos, anticoncepcionais, hipoglicemiantes e medicamentos para tratamento de distúrbios da tireoide. Nenhum desses medicamentos apresentaram alteração significativa no tratamento feminino, mesmo quando pacientes relataram o uso de mais de uma dessas classes simultaneamente (Tabela 28).

TABELA 28 – CLASSE DE MEDICAMENTOS UTILIZADOS PELAS PACIENTES MULHERES (%) E ANÁLISE ESTATÍSTICA DE POSSÍVEL INTERAÇÃO EM TEMPO DE RESPOSTA AO TRATAMENTO DA LOÇÃO TESTE.

	% pacientes	30 dias			60 dias			90 dias		
		x ²	p	df	x ²	p	df	x ²	p	df
Anticoncepcional	24,14									
Anti-hipertensivo	3,45									
Antidepressivo	3,45									
Tratamento para tireoide	6,90									
Anticoncepcional + Hipoglicemiante	3,45									
Anti-hipertensivo + Hipoglicemiante	6,90									
Anticoncepcional + Tratamento tireoide	6,90									
Anti-hipertensivo + Antidepressivo + Hipoglicemiante	3,45	10,74	0,46	11	14,53	0,20	11	5,10	0,92	11
Anticoncepcional + Anti-hipertensivo	3,45									
Anti-hipertensivo + Tratamento tireoide	6,90									
Todos os medicamentos	3,45									
Nenhum medicamento	27,59									

x²: chi quadrado; p Valor: probabilidade de significância; df: graus de liberdade.

5.5.2.5.2 Alteração de resultados perante tratamentos capilares anteriores para mulheres

As pacientes mulheres que já haviam feito algum tratamento capilar, tópico, oral ou ambos, corresponderam a 51,72%, todos sem sucesso. Esse fator não mostrou ser significativo estatisticamente para alterar o resultado do tratamento da loção em teste (Tabela 29).

TABELA 29 – ANÁLISE DE POSSÍVEL INTERFERÊNCIA EM RESPOSTA AO TRATAMENTO COM LOÇÃO TESTE, EM PACIENTES QUE HAVIAM FEITO TRATAMENTOS CAPILARES ANTERIORES.

	% pacientes	χ^2	p	df
Tópico	6,90			
Oral	20,69	1,20	0,75	3
Tópico + Oral	24,13			
Nenhum	48,27			

χ^2 : chi quadrado; p Valor: probabilidade de significância; df: graus de liberdade.

6 DISCUSSÃO

Para a obtenção dos compostos bioativos dos esporos de *G. lucidum* foram testados três processos de ruptura celular: 1) maceração em cadinho e pistilo; 2) maceração em cadinho e pistilo com pérolas de vidro; e 3) maceração em cadinho e pistilo com pérolas de vidro + agitação em vórtex. Os métodos 2 e 3 apresentaram 98% de esporos rompidos, e os extratos obtidos a partir da extração com água mostraram uma atividade antioxidante (DPPH) (IC_{50}) de 15,8 e 16,3 $\mu\text{g/mL}$ respectivamente. Novak (2012) testou o método de ruptura celular apenas com maceração em cadinho e pistilo e diversos solventes (clorofórmio, éter, etanol, água), sendo o mais eficaz a água, com atividade antioxidante (IC_{50}) de 26,7 $\mu\text{g/mL}$, mostrando que os resultados obtidos com o método 2 de ruptura e extração é mais eficiente, uma vez que utiliza menos material para atividade antioxidante.

A obtenção do extrato aquoso de esporos de *G. lucidum* possibilitou a formulação de uma loção capilar de aspecto líquido límpido, coloração levemente amarelada, de odor cítrico, toque suave e seco e pH 5,5. De acordo com parâmetros exigidos pela ANVISA, a loção mostrou-se estável durante os 8 meses de estudo, e alterando o pH (5,3 a 5,7) apenas nos testes farmacotécnicos de estabilidade preliminar e acelerada, quando aquecidos, o que é previsto na legislação (ANVISA, 2004).

Para cumprir nossa proposta de formular uma loção capilar que pudesse ser utilizada em tratamento de alopecia em humanos, seguiu-se à próxima etapa: testes em animais. Quarenta roedores C57BL/6 foram utilizados, 20 machos e 20 fêmeas, para determinar a dosagem de extrato de esporos de *G. lucidum* eficaz para cada sexo. Após depilação dos animais e aplicação dos produtos testes em cada grupo (controle negativo, CN; controle positivo, CP; tratamento 1, T1; tratamento 2, T2; e tratamento 3, T3), por 30 dias consecutivos, uma análise macroscópica foi realizada. A análise macroscópica mostrou diferença entre as respostas dos animais frente aos produtos em experimentação e aos controles positivos e negativos. O grupo que teve o maior crescimento de pelos, visível a olho nu, para machos foi o grupo T3. Para as fêmeas, foi o grupo T2. Esse resultado sugere que o gênero é uma variável dependente na dosagem de extrato de esporos utilizados. Zang e colaboradores (2016) realizaram um teste *in vitro* demonstrando a atividade inibitória de 5- α -redutase de finasterida e

extratos vegetais e de fungos, onde observaram que a eficácia dessa atividade inibitória era dose dependente. Para confirmação dos resultados, esse grupo deu seguimento ao trabalho utilizando apenas roedores machos, já que o alvo da pesquisa era o tratamento de câncer de próstata. As substâncias que são utilizadas para tratamento de alopecia de homens e mulheres, como o minoxidil, mostram uma diferenciação de resposta clínica gênero dependente (Mulinari-Brenner, Seidel e Hepp, 2011; Higgins e Christiano, 2014).

As análises microscópicas corroboraram com os achados macroscópicos. A partir da confecção de lâminas histológicas, os folículos capilares foram contados e classificados de acordo com sua fase de crescimento (anágenos ou catágenos/telógenos), e tiveram seus diâmetros medidos. Os animais machos do grupo T3 apresentaram um aumento quantitativo superior a 50% de folículos capilares quando comparado aos grupos CN e CP. A fase de crescimento na qual os folículos capilares de machos tiveram aumento significativo foi de catágenos/telógenos. Quanto aos diâmetros dos folículos, tanto em fase anágena quanto catágena/telógena, houve um aumento de até 10 vezes em relação aos grupos controles. Em animais machos, em comparação aos grupos controles, a loção capilar formulada contendo 10% de extrato esporo de *G. lucidum* (T3), mostrou um aumento na quantidade e nos diâmetros dos folículos capilares. Entre animais fêmeas, o grupo tratado com a formulação T2 apresentou um aumento de 55% na quantidade de folículos e em até 10 vezes seu diâmetro, quando comparado aos grupos controles (CN e CP). O aumento da quantidade de folículos se deu em todas as fases de crescimento avaliadas (anágena e catágena/telógena). O aumento dos diâmetros não foram significativos estatisticamente. A fase anágena, quando induzida, indica que houve um aumento da taxa de divisão celular. Já na fase catágena/telógena indica que o produto induziu proliferação e diferenciação dos folículos capilares, o que indica que a substância em teste teve ação nas camadas mais profundas do folículo (bainhas radiculares internas e externas) (Choi *et al.*, 2014). Esses resultados sugerem que há a possibilidade dessa loção poder ser empregada no tratamento de alopecia em humanos. O aumento do diâmetro dos fios indica um aumento de resistência à quebra dos fios e mais volume.

Para análise hormonal dos animais, foi feita a padronização do teste ELISA para os hormônios considerados importantes nesse estudo: testosterona, por ser a precursora de hormônios DHT e estradiol; DHT, principal hormônio responsável pela

redução de diâmetro do fio de cabelo e consequente queda; e estradiol, responsável pela manutenção dos fios de cabelo.

Em animais, houve um decréscimo no nível hormonal de DHT e aumento do hormônio estradiol, o que explica a eficácia da loção capilar a base de extrato de esporos de *G. lucidum*. O que diferencia entre machos e fêmeas é a dosagem de testosterona, onde esta se manteve igual para machos e diminuiu em fêmeas. Esse resultado da testosterona indica uma provável diferença no mecanismo de ação dos bioativos de *G. lucidum*. A principal hipótese de mecanismo de ação dos compostos extraídos dos esporos do fungo *G. lucidum* como agente de tratamento para queda capilar, é a sua ação anti andrógena, de inibição da enzima 5- α -redutase ou de competição pelo sitio de ligação com o DHT (Liu *et al.*, 2006a; Liu *et al.*, 2007a; Liu *et al.*, 2007b; Liu *et al.*, 2012; Wu *et al.*, 2013). Acredita-se ainda, que, em machos, possa haver uma possível indução de conversão da testosterona em estradiol pela enzima aromatase (Choe *et al.*, 2017; Ohnemus *et al.*, 2016; Harfmann e Bechtel, 2015), já que o nível de testosterona se manteve igual mesmo com a inibição enzimática de conversão em DHT.

Após a etapa de experimentação animal, deu-se seguimento a última etapa deste estudo, a experimentação em humanos. Setenta pacientes, 35 homens e 35 mulheres, foram recrutados a utilizar a loção durante 90 dias. Cinco pacientes de cada grupo (homens, mulheres) receberam a loção controle negativo para posterior análise de resultados.

Na análise subjetiva, avaliação feita pelos próprios pacientes, os homens tratados perceberam resposta positiva com 30 dias de tratamento (52,38%), 60 dias (23,81%) e 90 dias (23,81%) de uso da loção. Para as mulheres, a resposta positiva após 30 dias de tratamento foi reportada por 58,64% das mulheres, com 60 e 90 dias foi de 20,68% respectivamente. Além de melhora da queda capilar, visualizada em 86,34% dos homens, e em 96,55% das mulheres, houve melhora na resistência dos fios de cabelo de 54,54% de homens, e de 65,52% de mulheres. As melhorias na qualidade do cabelo citadas foram hidratação, diminuição de oleosidade do couro cabeludo e o escurecimento dos novos fios de cabelos, em 18,20% dos homens e em 90,02% das mulheres. Os pacientes que visualizaram o nascimento e crescimento de novos fios de cabelo foram de 82,08% para homens, e 93,11% para mulheres. A maioria dos estudos de formulação cosmética é feita por pessoas voluntárias que

avaliam não apenas a eficácia, mas as características sensoriais. Essas características podem influenciar a adesão do paciente ao estudo (Santos e Dias-Souza, 2017). A aceitação do produto foi de 95,5% para homens e 100% para mulheres. Nenhum paciente relatou efeito adverso (coceiras, vermelhidão, irritabilidade ou piora do quadro clínico de alopecia).

As análises macroscópicas, realizadas a partir de fotografias dos pacientes, confirmam os dados coletados na análise subjetiva. Todos os pacientes que apresentavam falhas capilares tiveram as áreas recobertas de fios de cabelo, diminuindo-as ou até mesmo cobrindo-as por completo. Em mulheres houve o nascimento e crescimento de fios de cabelo principalmente na região frontotemporal. Nessa região da pele de mulheres há um alto nível de enzima aromatase, aumentando a conversão de testosterona em estradiol (Harfmann e Bechtel, 2015; Schweiger, Boychenko e Bernstein, 2010). O surgimento e a manutenção de cabelo nessa linha frontal e confirma a hipótese de possível mecanismo de ação dos esporos de *G. lucidum* de estimular a aromatização.

Análises microscópicas obtidas com dermatoscópio foram analisadas e confirmaram os resultados obtidos a partir das análises subjetivas e microscópicas: regiões anteriormente calvas foram recobertas, parcial ou totalmente, por novos fios de cabelo.

Variáveis que pudessem interferir na resposta ao tratamento com a loção capilar a base de extrato de esporo de *G. lucidum* foram avaliadas. Nos humanos não há sincronia de fases nos folículos capilares, então a idade foi avaliada como uma possível variável. Os pacientes não demonstraram alteração significativa em relação à idade e resposta, ou tempo de resposta, ao tratamento.

Uma variável dependente para o tempo de resposta masculino foi a dosagem inicial dos hormônios DHT e testosterona. Quanto maior o nível de testosterona e menor o de DHT, mais rápida foi a resposta dos pacientes ao tratamento. Isso pode ser explicado pelo fato de o hormônio DHT ser o principal responsável pela queda capilar. A quantidade de testosterona influencia possivelmente por ser o precursor de DHT, então quanto menos precursor, menos DHT. O hormônio estradiol não mostrou alteração significativa, sendo, portanto, uma variável independente para o tempo de resposta em homens. Em mulheres, nenhum dos hormônios alterou o tempo de resposta. Nas mulheres essa não foi uma variável dependente e acredita-se que seja

por seus níveis de DHT serem fisiologicamente mais baixos ou ainda pela alopecia ser de causa multifatorial nas mulheres, estando mais relacionada aos níveis de estresse (Harfmann e Bechtel, 2015).

Algumas doenças e alguns medicamentos de uso contínuo, principalmente as classes de anti-hipertensivos, antidepressivos, e hipoglicemiantes podem alterar o quadro de alopecia em humanos. A hipertensão e a alopecia andrógena estão associadas e duas causas foram propostas: os andrógenos que se ligam aos receptores mineralocorticoides (presentes também na pele) podem ser responsáveis pela diferença na pressão sanguínea e podem participar no aumento da susceptibilidade à alopecia em homens, quando comparado à mulheres; ou hiperaldosteronismo que é considerado o responsável primário pela maioria das hipertensões pode participar diretamente no desenvolvimento da alopecia (Ahouansou *et al.*, 2007). A alopecia causada por uso de antidepressivos é um efeito adverso desses medicamentos, mas o mesmo cessa quando o uso do medicamento é interrompido (Chen *et al.*, 2015). Os medicamentos utilizados para tratamento da diabetes, como os hipoglicemiantes, também podem causar uma interrupção no ciclo de crescimento do cabelo. Há uma diminuição do fluxo sanguíneo e a depleção de minerais essenciais (Zubair e Mujtaba, 2009). Nenhum desses medicamentos interferiram na resposta ao tratamento de humanos com a loção capilar teste, mesmo para os pacientes que relataram o uso de mais de uma dessas classes medicamentosas. Para mulheres, foi considerado outro possível variável: o uso de anticoncepcionais. Devido ao fato de anticoncepcionais aumentarem os níveis de globulina ligante a hormônios sexuais, isso faz com que sinais de uma retroalimentação negativa sejam enviados, diminuindo a produção de andrógenos (responsáveis pela queda capilar) (Brough e Torgerson, 2017). Porém, a loção capilar neste estudo não sofreu interferência ao uso de anticoncepcionais.

Os tratamentos para alopecia existentes no mercado podem ser de uso tópico, oral ou combinados. Os pacientes masculinos que já haviam feito algum tratamento capilar, oral, tópico ou ambos, corresponderam a 22,72%, todos sem sucesso. As pacientes mulheres que já haviam feito algum tratamento capilar, tópico, oral ou ambos, corresponderam a 51,72%, todos, também, sem sucesso. Esse fator não mostrou ser significativo estatisticamente para alterar o resultado do tratamento da loção em teste.

A alta aceitação do produto teste por parte dos pacientes (99%) deu-se pelas características da formulação e, principalmente, pela eficácia inédita a um produto capilar de origem natural, um bioproduto proveniente do fungo medicinal *G. lucidum*. Os bioprodutos são aceitos cada vez mais no mercado por serem menos alergênicos, mais biocompatíveis e menos danosos ao meio ambiente.

7 CONCLUSÃO

Os esporos do fungo *Ganoderma lucidum* foram rompidos com a eficácia de 98% de rompimento.

Os compostos bioativos do fungo foram extraídos em solução aquosa, apresentando atividade antioxidante de 15,8 $\mu\text{g/mL}$ (expressa em IC_{50}) e aplicados em uma formulação capilar.

A loção capilar formulada se manteve estável durante os 240 dias (8 meses) do tempo preconizado nos testes de estabilidade.

Com aplicação da loção teste por 30 dias consecutivos em animais, foi possível determinar a dosagem eficaz para machos e fêmeas. Houve um aumento na quantidade e no diâmetro de folículos capilares dos machos quando utilizada a loção capilar a base de 10% de extrato de esporos de *G. lucidum*, e o mesmo ocorreu para fêmeas com a loção a base de 5% de extrato de esporos de *G. lucidum*. Alterações hormonais foram observadas sugerindo dois mecanismos de ação dos esporos: a ação anti-andrógena de inibição da enzima 5- α -redutase, conversora de testosterona em DHT, ou por competição nesta enzima pelo sítio de ligação do DHT; e a indução ao processo de aromatização, onde a testosterona é convertida em estradiol pela enzima aromatase.

Em humanos, a loção capilar apresentou eficácia tanto para homens quanto para mulheres, seguindo as mesmas dosagens dos animais machos e fêmeas, respectivamente. Os resultados obtidos macroscopicamente, microscopicamente e por dosagem hormonal, indicam o mesmo mecanismo de ação ocorrido em animais.

Alterações hormonais, medicamentosas e de faixa etária não interferiram no tratamento dos pacientes com a loção capilar em teste.

Os benefícios da loção não foram apenas nos folículos, mas na haste capilar também. Houve melhora no brilho, na resistência e na hidratação dos fios de cabelo.

A loção capilar formulada a partir de extrato de esporos de *G. lucidum* teve 99% de aceitação por parte dos pacientes que fizeram parte do estudo, confirmando o grande potencial tecnológico e industrial do produto cosmético desenvolvido.

REFERENCIAS

AGENCIA NACIONAL DE VIGILANCIA SANITARIA (ANVISA). **Guia para Avaliação de Segurança de Produtos Cosméticos**. 2a edição. Brasília, 2012.

AGENCIA NACIONAL DE VIGILANCIA SANITARIA (ANVISA). **Guia de Estabilidade de Produtos Cosméticos**. Séries Temáticas – Série Qualidade em Cosméticos. 1a edição, volume 1. Brasília, 2004.

AHOUANSON, S.; LETOUMELIN, P.; CRICKX, B.; DESCAMPS, V. Association of androgenetic alopecia and hypertension. **European Journal of Dermatology**, v. 17, n. 3, p. 220-222. 2007.

ATANASKOVA, M. N.; BERGFELD, W. F. Hair: what is new in diagnosis and management? Female pattern hair loss update: diagnosis and treatment. **Dermatologic Clinics**, v. 31, n. 1, p. 119-127. 2013.

AVRAM, M. R.; TSAO, S.; TANNOUS, Z.; AVRAM, M. M. **Atlas colorido de dermatologia estética**. Rio de Janeiro: Editora McGraw-Hill Interamericana do Brasil, 2008.

AZULAY, R. D.; AZULAY D. R. **Dermatologia**. 5ª edição. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan. 2008.

BAO, X.; LIU, C.; FANG, J.; LI, X. Structural and immunological studies of a major polysaccharide from spores of *Ganoderma lucidum* (Fr.) Karst. **Carbohydrate Research**, v. 332, p. 67-74. 2002.

BOH, B. *Ganoderma lucidum*: A Potential for Biotechnological Production of Anti-Cancer and Immunomodulatory Drugs. **Recent Patents on Anti-Cancer Drug Discovery**, p. 255-287. 2013.

BROUGH, K. R.; TORGERSON, R. R. Hormonal therapy in female pattern hair loss. **International Journal of Women's Dermatology**, v. 3, p. 53-57. 2017.

BUFFOLI, B.; RINALDI, F.; LABANCA, M.; SORBELLINI, E.; TRINK, A.; GUANZIROLI, E.; REZZANI, R.; RODELLA, L. F. The human hair: from anatomy to physiology. **International Journal of Dermatology**, v. 53, p. 331-341. 2014.

CARUSO, D.; ABBIATI, F.; GIATTI, S.; ROMANO, S.; FUSCO, L.; CAVALETTI, G.; MELCANGI, R. C. Patients treated for male pattern hair with finasteride show, after discontinuation of the drug, altered levels of neuroactive steroids in cerebrospinal fluid and plasma. **Journal of Steroid Biochemistry & Molecular Biology**, v. 146, p. 74-79. 2015.

CHEN, C. R.; LI, Y. F.; XU, P. P.; FENG, R. H.; YANG, M.; GUAN, S. H.; GUO, D. A. Preparative isolation of triterpenoids from *Ganoderma lucidum* by counter-current chromatography combined with pH-zone-refining. **Food Chemistry**, v. 130, p. 1010-1016. 2012.

CHEN, B.; CHOI, H.; HIRSCH, L. J.; MOELLER, J.; JAVED, A.; KATO, K.; LEGGE, A.; BUCHSBAUM, R.; DETYNIECKI, K. Cosmetic side effects of antiepileptic drugs in adults with epilepsy. **Epilepsy and Behavior**. v. 42, p. 129-137. 2015.

CHOE, S. J.; LEE, S.; CHOI, J.; WON-SOO, L. Therapeutic Efficacy of a Combination Therapy of Topical 17 α -Estradiol and Topical Minoxidil on Female Pattern Hair Loss: A Noncomparative, Retrospective Evaluation. **Annals of Dermatology**. v. 29, n. 3, p. 276-282. 2017.

CHOI, J. S.; JEON, M. H.; MOON, W. S.; MOON, J. N.; CHEON, E. J.; KIM, J. W.; JUNG, S. K.; JI, Y. H.; SON, S. W.; KIM, M. R. *In vivo* Hair Growth-Promoting Effect of Rice Bran Extract Prepared by Supercritical Carbon Dioxide Fluid. **Biological Pharmaceutical Bulletin**, v. 37, n. 1, p. 44-53. 2014.

DUDHGAONKAR, S.; THYAGARAJAN, A.; SLIVA, D. Suppression of the inflammatory response by triterpenes isolated from the mushroom *Ganoderma lucidum*. **International Immunopharmacology**, v. 9, p. 1272-1280. 2009.

EROSCHENKO, V. P. **Atlas of Histology with Functional Correlations**. 11^a edição. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins. 2008.

FUJITA, R.; LIU, J.; SHIMIZU, K.; KONISHI, F.; NODA, K.; KUMAMOTO, S.; UEDA, C.; TAJIRI, H.; KANEKO, S.; SUIMI, Y.; KONDO, R. Anti-androgenic activities of *Ganoderma lucidum*. **Journal of Ethnopharmacology**. v. 102, p. 107-112. 2005.

GUO, L.; XIE, J.; RUAN, Y.; ZHOU, L.; ZHU, H.; YUN, X.; JIANG, Y.; LU, L.; CHEN, K.; MIN, Z.; WEN, Y.; GU, J. Characterization and immunostimulatory activity of a polysaccharide from the spores of *Ganoderma lucidum*. **International Immunopharmacology**, v. 9, p. 1175-1182. 2009.

HABIJANIC, J.; BEROVIC, M.; BOH, B.; PLANKL, M.; WRABER, B. Submerged cultivation of *Ganoderma lucidum* and the effects of its polysaccharides on the production of human cytokines TNF- α , IL-12, IFN- γ , IL-2, IL-4, IL-10 and IL-17. **New Biotechnology**, v. 32, n. 1, p. 85-95. 2015.

HARFMANN, K. L.; BECHTEL, M. A. Hair Loss in Women. **Clinical Obstetrics and Gynecology**, v. 58, n. 1, p.185-199. 2015.

HIGGINS, C. A.; CHRISTIANO, A.M. Regenerative medicine and hair loss: how hair follicle culture has advanced our understanding of treatment options for androgenetic alopecia. **Regenerative Medicine**. v. 9, n. 1, p. 101-111. 2014.

HYDE, K. D.; BAHKALI, A. H.; MOSLEM, M. A. Fungi – an unusual source for cosmetics. **Fungal Diversity**. v. 43, p. 1-9. 2010.

INNOVATION CAPILAR. Disponível em <<https://innovacioncapilar.es/estructura-del-pelo/>>. Acesso em: dezembro de 2017.

INNUI, S.; NAKAJIMA, T.; NAKAGAWA, K.; ITAMI, S. Clinical significance of dermoscopy in alopecia areata: analysis of 300 cases. **International Journal of Dermatology**. v. 47, p. 688-693. 2008.

JOHNSTONE, M. A.; ALBERT, D. M. Prostaglandin-Induced Hair Growth. **Survey of Ophthalmology**. v. 47, p.185-202. 2002.

KIM, H. S.; CHO, D. H.; KIM, H. J.; LEE, J. Y.; CHO, B. K.; PARK, H. J. Immunoreactivity of corticotropin releasing hormone, adrenocorticotrophic hormone and α -melanocyte-stimulating hormone in alopecia areata. **Experimental Dermatology**. v. 15, p. 515-522. 2006.

KIM, J. H.; LEE, S. Y.; LEE, H. J.; YOON, N. Y.; LEE, W. S. The Efficacy and Safety of 17 α -Estradiol (Ell-Cranell alpha 0.025%) Solution on Female Pattern Hair Loss: Single Center, Open-Label, Non-Comparative, Phase IV Study. **Annals of Dermatology**. v. 24, n. 3, p. 295-305. 2012.

KRAUSE, K.; FOITZIK, K. Biology of the hair follicle: the basics. **Seminars in Cutaneous Medicine and Surgery**. v. 25, p. 2–10. 2006.

LANGAN, E. A.; PHILPOTT, M. P.; KLOEPPER, J. E.; PAUS, R. Human hair follicle organ culture: theory, application and perspectives. **Experimental Dermatology**. v. 24, p. 903–911. 2015.

LIU, J.; KURASHIKI, K.; SHIMIZU, K.; KONDO, R. 5- α -reductase inhibitory effect of triterpenoids isolated from *Ganoderma lucidum*. **Biological Pharmaceutical Bulletin**. v. 29, n. 2, p. 392-395. 2006a.

LIU, J.; KURASHIKI, K.; SHIMIZU, K.; KONDO, R. Structure-activity relationship for inhibition of 5- α -reductase by triterpenoids isolated from *Ganoderma lucidum*. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**. v. 14, p. 8654-8660. 2006b.

LIU, J.; SHIMIZU, K.; KONISHI, F.; NODA, K.; KUMAMOTO, S.; KURASHIKI, K.; KONDO, R. Anti-androgenic activities of the triterpenoids fraction of *Ganoderma lucidum*. **Food Chemistry**. v. 100, p. 1691-1696. 2007a.

LIU, J.; SHIMIZU, K.; KONISHI, F.; KUMAMOTO, S.; KONDO, R. The anti-androgen effect of ganoderol B isolated from the fruiting body of *Ganoderma lucidum*. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**. v. 15, p. 4966-4972. 2007b.

LIU, J.; KURASHIKI, K.; FUKUTA, A.; KANEKO, S.; SUIMI, Y.; SHIMIZU, K.; KONDO, R. Quantitative determination of the representative triterpenoids in the extracts of *Ganoderma lucidum* with different growth stages using high-performance liquid chromatography for evaluation of their 5- α -reductase inhibitory properties. **Food Chemistry**, v. 133, p. 1034-1038. 2012.

LIU, R.; ZHEDAN, G.; HAI, J.; HOUJIN, H. Protective effect of *Ganoderma lucidum* spore on androgen protein and inhibin expressions by cadmium in rat testis. **Journal of Zunyi Medical University**. v. 3, p.195-203. 2015.

MATOS, Breno Noronha. Desenvolvimento de uma formulação tópica contendo nanopartículas de quitosana como estratégia para aumentar a penetração folicular do minoxidil sulfato no tratamento da alopecia androgênica. Brasília, 56 p., Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas)—Universidade de Brasília, Brasília, 2014.

MIN, B. S.; NAKAMURA, N.; MIYASHIRO, H.; BAE, K. W.; HATTORI, M. Triterpenes from the spores of *Ganoderma lucidum* and their inhibitory activity against HIV-1 protease. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**, v. 46, n. 10, p. 1607-1612. 1998.

MIN, B. S.; GAO, J. J.; HATTORI, M.; LEE, H. K.; KIM, Y. H. Anticomplement activity of terpenoids from the spores of *Ganoderma lucidum*. **Planta Medica**, v. 67, p. 811-814. 2001.

MOLINA, L.; DONATI, A.; VALENTE, N. S. Y.; ROMITI, R. Alopecia areata incógnita. **Clinics**. v. 66, n. 3, p. 513-515. 2011.

MULINARI-BRENNER, F.; ROSAS, F. M. B.; FILLUS NETO, J.; TORRES, L. F. B. Morfometria de folículos pilosos do couro cabeludo normal. **Anais Brasileiros de Dermatologia**. v. 81, n. 1, p. 217-223. 2006.

MULINARI-BRENNER, F.; SEIDEL, G.; HEPP, T. Understanding androgenetic alopecia. **Surgical and Cosmetic Dermatology**. v. 3, n. 4, p. 329-337. 2011.

MURATA, C.; TRAN, Q. T.; ONDA, S.; USUKI, T. Extraction and isolation of ganoderic acid R from *Ganoderma lucidum*. **Tetrahedron Letters**. v. 57, p. 5368-5371. 2016.

NOVAK, A. C. **Potencial cosmético dos esporos de *Ganoderma lucidum***. Curitiba, 121 p. Tese (Doutorado em Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia) – Setor de Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2013.

OH, J. W.; KLOEPPER, J.; LANGAN, E. A.; KIM, Y.; YEO, J.; KIM, M. J.; HSI T. C.; ROSE, C.; YOON, G. S.; LEE, S. J.; SEYKORA, J.; KIM, J. C.; SUNG, Y. K.; KIM, M.; PAUS, R.; PLIKUS, M. A Guide to Studying Human Hair Follicle Cycling In Vivo. **Journal of Investigative Dermatology**, v.136, p. 34-44. 2016.

OHNEMUS, U.; UENALAN, M.; INZUNZA, J.; GUSTAFSSON, J. A.; PAUS, R. The Hair Follicle as an Estrogen Target and Source. **Endocrine Reviews**. v. 27, n. 6, p. 677–706. 2006.

PANTELEYEV, A. A. Putting the Human Hair Follicle Cycle on the Map. **Journal of Investigative Dermatology**, v.136, p. 4-6, 2016.

PATEL, S.; SHARMA, V.; CHAUHAN, N. S.; THAKUR, M.; DIXIT, V. K. Evaluation of hair growth potential of *Phyllanthus niruri*. **Avicenna Journal Phytomedicine**, v. 5, n. 6, p. 512-519. 2015.

PRICE, V. H.; ROBERTS, J. L.; HORDINSKY, M.; OLSEN, E. A.; SAVIN, R.; BERGFELD, W.; FIEDLER, V.; LUCKY, A.; WHITING, D. A.; PAPPAS, F.; CULBERTSON, J.; KOTEY, P.; MEEHAN, A.; WALDSTREICHER, J. Lack of efficacy of finasteride in postmenopausal women with androgenetic alopecia. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 43, n. 5, p. 768-776. 2000.

RADWANSKI, H. N.; ALMEIDA, M. W. R.; AGUIAR, L. F. S.; ALTENHOFEN, M. S.; PITANGUY, I. Algorithm for approaching scar alopecia and treatment options. **Revista Brasileira de Cirurgia Plástica**. v. 24, n. 2, p. 170-175. 2009.

RANDALL, V. A.; BOTCHKAREVA, N. The Biology of Hair Growth. **Cosmetic Applications of Laser and Light-Based Systems**. p. 3-35, 2009.

RIVITTI, E. A. Alopecia areata: a revision and update. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 80, n. 1, p. 57-68. 2005.

RUFINO, M. S. M.; ALVES, R. E.; BRITO, E. S.; MORAIS, S. M.; SAMPAIO, C. G.; PEREZ-JIMENEZ, J.; SAURA-CALIXTO, F. D. Metodologia Científica: Determinação da Atividade Antioxidante Total em frutas pela Captura do Radical Livre DPPH. **Embrapa**. Comunicado Técnico 127. Fortaleza-CE. 2007.

RUSSELL, R.; PATERSON, M. Review *Ganoderma* – A therapeutic fungal biofactory. **Phytochemistry**. v. 67, p. 1985–2001. 2006.

SANTOS, R. M.; DIAS-SOUZA, M. V. Effectiveness of five antidandruff cosmetic formulations against planktonic cells and biofilms of dermatophytes. **Saudi Journal of Biological Sciences**. v. 24, p. 331–337. 2017.

SCHWARTZ, J. R.; HENRY, J. P.; KERR, K. M.; MIZOGUCHI, H.; LI, L. The role of oxidative damage in poor scalp health: ramifications to causality and associated hair growth. **International Journal of Cosmetic Science**. v. 37, n. 2, p. 9–15. 2015.

SCHWEIGER, E. S.; BOYCHENKO, O.; BERNSTEIN, R. M. Update on the pathogenesis, Genetics and Medical treatment of patterned hair loss. **Journal of Drugs in Dermatology**. v. 9, n. 11, p. 1412-1419. 2010.

SLIVA, D.; SEDLAK, M.; SLIVOVA, V.; VALACHOVICOVA, T.; LLOYD, F. P.; HO, N. W. Y. Biological activity of spores and dried powder from *Ganoderma lucidum* for the inhibition of highly invasive human breast and prostate cancer cells. **The Journal of Alternative and Complementary Medicine**, v. 9, n. 4, p. 491-497, 2003.

SMINA, T. P.; MATHEW, J.; JANARDHANAN, K. K.; DEVASAGAYAM, T. P. A. Antioxidant activity and toxicity profile of total triterpenes isolated from *Ganoderma lucidum* (Fr.) P. Karst occurring in South India. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 32, p. 438-446. 2011.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE DERMATOLOGIA. Disponível em: <<http://www.sbd.org.br/doencas/alopecia-areata/>>. Acesso em: 20 ago. 2016.

SOCCOL, A. T. **Desenvolvimento de dermocosméticos à base de compostos bioativos de macromiceto, cianobactéria e melatonina na redução de poros, rugas e manchas na pele humana.** Curitiba, 169 p. Tese (Doutorado em Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia) – Setor de Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2014.

TOSTI, A.; TORRES, F. Dermoscopy in the diagnosis of hair and scalp disorders. **Actas Dermo-Sifiliograficas.** v. 100, n. 1, p. 114-119. 2009.

VOGT, A.; HADAM, S.; HEIDERHOFF, M.; AUDRING, H.; LADEMANN, J.; STERRY, W.; BLUME-PEYTAVI, U. Morphometry of human terminal and vellus hair follicles. **Experimental Dermatology.** v. 16, p. 946–950. 2007.

WOSICKA, H.; CAL, K. Targeting to the hair follicles: current status and potential. **Journal of Dermatological Science.** v. 57, p. 83–89. 2010.

WU, G. S.; GUO, J. J.; BAO, J. L.; LI, X. W.; CHEN, X. P.; LU, J. J.; WANG, Y. T. Anti-cancer properties of triterpenoids isolated from *Ganoderma lucidum* - a review. **Expert Opinion on Investigational Drugs.** v. 22, n. 8, p. 981-992. 2013.

ZANCHET, L.; LUNELLI, V. **Estudo comparativo dos efeitos biomoduladores da luz coerente e não coerente no folículo piloso de camundongos.** Chapecó. Monografia (Medicina), Universidade Unochapecó. Chapecó, 2010.

ZHANG, B.; ZHANG, R. W.; YIN, X. Q.; LAO, Z. Z.; ZHANG, Z.; WU, Q. G.; YU, L. W.; LAI, X. P.; WAN, Y. H.; LI, G. Inhibitory activities of some traditional Chinese herbs against testosterone 5 α -reductase and effects of *Cacumen platycladi* on hair re-growth in testosterone-treated mice. **Journal of Ethnopharmacology,** v. 177, p. 1-9. 2016.

ZHOU, Y.; QU, Z. Q.; ZENG, Y. S.; LIN, Y. K.; LI, Y.; CHUNG, P.; WONG, R.; HAGG, U. Neuroprotective effect of preadministration with *Ganoderma lucidum* spore on rat hippocampus. **Experimental and Toxicologic Pathology,** v. 64, p. 673-680. 2012.

ZUBAIR, S.; MUJTABA, G. Hair – a mirror of diabetes. **Journal of Pakistan Association of Dermatologists.** v. 19, p. 31-33. 2009.

**ANEXO A – CERTIFICADO DE APROVAÇÃO NA COMISSÃO DE ÉTICA
NO USO DE ANIMAIS (CEUA)**



Ministério da Educação
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
Setor de Ciências Biológicas
Comissão de Ética no Uso de Animais
(CEUA)



Nº 905

CERTIFICADO

A Comissão de Ética no Uso de Animais do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná (CEUA/BIO – UFPR), instituída pela Resolução Nº 86/11 do Conselho de Ensino Pesquisa e Extensão (CEPE), de 22 de dezembro de 2011, **CERTIFICA** que os procedimentos utilizando animais no projeto de pesquisa abaixo especificado estão de acordo com a Diretriz Brasileira para o Cuidado e a Utilização de Animais para fins Científicos e Didáticos (DBCA) estabelecidas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e com as normas internacionais para a experimentação animal.

STATEMENT

The Ethics Committee for Animal Use from the Biological Sciences Section of the Federal University of Paraná (CEUA/BIO – UFPR), established by the Resolution Nº 86/11 of the Teaching Research and Extension Council (CEPE) on December 22nd 2011, **CERTIFIES** that the procedures using animals in the research project specified below are in agreement with the Brazilian Guidelines for Care and Use of Animals for Scientific and Teaching purposes established by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA) and with the international guidelines for animal experimentation.

PROCESSO/PROCESS: 23075.078191/2015-31

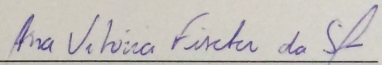
APROVADO/APPROVAL: 25/08/2015 – R.O. 08/2015

TÍTULO: Loção Capilar produzida a partir de extrato de *Ganoderma lucidum*.

TITLE: Hair lotion produced from the extract of *ganoderma lucidum*.

AUTORES/AUTHORS: Vanete Thomaz Soccol, Liliana Isabel Chitolina Zoz.

DEPARTAMENTO/DEPARTMENT: Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia


 Profa. Dra. Ana Vitória Fischer da Silva
Coordenadora da CEUA

ANEXO B – PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

UNIVERSIDADE FEDERAL DO
PARANÁ - SETOR DE
CIÊNCIAS DA SAÚDE/ SCS -



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Loção capilar a base de extrato de Ganoderma lucidum

Pesquisador: Carlos Ricardo Soccol

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 60128516.0.0000.0102

Instituição Proponente: Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Bioprocessos e

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.817.016

Apresentação do Projeto:

Trata-se de estudo oriundo do Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia, sob a responsabilidade do Prof. Dr. Carlos Ricardo Soccol e tendo como Colaboradores: Profa. Dra. Vanete Thomaz Soccol, doutoranda Liliana Isabel Chitolina Zoz e Dra. Andrea Thomaz Soccol.

O estudo pretende avaliar a eficácia de uma loção capilar à base do extrato de Ganoderma lucidum no tratamento da alopecia.

A metodologia utilizada será de estudo duplo cego, no qual cada participante receberá, da pesquisadora Dra Andrea, um frasco contendo a loção controle ou a loção teste contendo apenas um código conhecido apenas pela pesquisadora Liliana Isabel Chitolina Zoz, responsável pela formulação e posterior análise dos resultados. A pesquisadora Andrea Thomaz Soccol será a responsável pela triagem dos participantes, pela orientação de uso do produto, e demais orientações cabíveis.

Cada participante será submetido a uma análise de fototricograma no início, no término da pesquisa e a cada 21 dias, por no mínimo 3 meses. As análises serão feitas no consultório da pesquisadora Andrea Thomaz Soccol, localizado na Rua Marechal Floriano Peixoto, nº 475, na cidade de Mafra, Santa Catarina. Antes do início do tratamento será solicitado ao participante uma coleta de sangue para dosagem

Endereço: Rua Padre Camargo, 285 - Térreo

Bairro: Alto da Glória

UF: PR

Município: CURITIBA

CEP: 80.060-240

Telefone: (41)3360-7259

E-mail: cometica.saude@ufpr.br

UNIVERSIDADE FEDERAL DO
PARANÁ - SETOR DE
CIÊNCIAS DA SAÚDE/ SCS -



Continuação do Parecer: 1.817.016

de níveis hormonais (DHT, testosterona e estradiol). O exame de sangue deverá ser realizado em laboratório autorizado.

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Geral: Comprovar a eficácia de extrato de Ganoderma lucidum como agente de prevenção à queda capilar e restauração de falhas de cabelos.

Objetivos Específicos: Avaliar a melhora da qualidade dos fios de cabelo; Avaliar os níveis de hormônios responsáveis pelo afinamento dos fios.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

De acordo com as informações dos pesquisadores: "Os riscos dessa pesquisa são raros e estão relacionados à alergia, caso em que será suspenso imediatamente o uso do produto e haverá acompanhamento da médica participante da pesquisa Dra Andrea Thomaz Soccol. Na ocasião da coleta de sangue o paciente poderá sentir a dor da picada da agulha, que é passageira e alguns pacientes poderão apresentar hematoma (mancha roxa) na região puncionada. Isto é perfeitamente normal e poderá ser solucionado com compressas de gelo no local. O benefício da pesquisa é o desenvolvimento de uma loção capilar à base de um bioproduto, que seja capaz de cessar a queda capilar, aumentar a quantidade e qualidade dos fios de cabelo, que seja de fácil utilização e esteja à disposição de toda a população que sofre com o crescente problema da alopecia, levando à estados depressivos graves".

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

A pesquisa é de relevância social, pois a calvície pode levar a quadros sérios de depressão. Apenas uma pequena parcela da população não se incomoda com a calvície, afirmando que faz parte do envelhecimento. A grande maioria chega até a mudar seus hábitos evitando a socialização; a calvície pode ser bem aceita para e pelos homens, porém o mesmo não acontece para com as mulheres. Farão parte desta pesquisa pessoas maiores de 18 anos, sendo 55 deles homens e 55 mulheres. Todos eles deverão apresentar problemas relacionados à queda capilar, preferencialmente com falhas de cabelo. Os participantes deverão assinar um Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Termos obrigatórios anexados

Recomendações:

Ver considerações finais.

Endereço: Rua Padre Camargo, 285 - Térreo

Bairro: Alto da Glória

CEP: 80.060-240

UF: PR

Município: CURITIBA

Telefone: (41)3360-7259

E-mail: cometica.saude@ufpr.br

UNIVERSIDADE FEDERAL DO
PARANÁ - SETOR DE
CIÊNCIAS DA SAÚDE/ SCS -



Continuação do Parecer: 1.817.016

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Pendências atendidas.

- É obrigatório retirar na secretaria do CEP/SD uma cópia do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido com carimbo onde constará data de aprovação por este CEP/SD, sendo este modelo reproduzido para aplicar junto ao participante da pesquisa.

O TCLE deverá conter duas vias, uma ficará com o pesquisador e uma cópia ficará com o participante da pesquisa (Carta Circular nº. 003/2011CONEP/CNS).

Considerações Finais a critério do CEP:

Solicitamos que sejam apresentados a este CEP, relatórios semestrais e final, sobre o andamento da pesquisa, bem como informações relativas às modificações do protocolo, cancelamento, encerramento e destino dos conhecimentos obtidos, através da Plataforma Brasil - no modo: NOTIFICAÇÃO. Demais alterações e prorrogação de prazo devem ser enviadas no modo EMENDA. Lembrando que o cronograma de execução da pesquisa deve ser atualizado no sistema Plataforma Brasil antes de enviar solicitação de prorrogação de prazo.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_794769.pdf	27/10/2016 14:56:28		Aceito
Outros	Concordancia_dos_servicos_envolvidos_Lab.pdf	27/10/2016 14:55:54	Carlos Ricardo Soccol	Aceito
Outros	Concordancia_dos_servicos_envolvidos_Clinica.pdf	27/10/2016 14:54:58	Carlos Ricardo Soccol	Aceito
Outros	Pendencias_parecer.docx	27/10/2016 14:53:46	Carlos Ricardo Soccol	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	Termo_de_Consentimento_Livre_e_Esclarecido_Corrigido.docx	27/10/2016 14:51:26	Carlos Ricardo Soccol	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto_de_Pesquisa_Corrigido.docx	27/10/2016 14:50:57	Carlos Ricardo Soccol	Aceito
Outros	Check_list.pdf	19/09/2016 17:05:57	Carlos Ricardo Soccol	Aceito
Projeto Detalhado	Projeto_de_Pesquisa.docx	19/09/2016	Carlos Ricardo	Aceito

Endereço: Rua Padre Camargo, 285 - Térreo

Bairro: Alto da Glória

CEP: 80.060-240

UF: PR

Município: CURITIBA

Telefone: (41)3360-7259

E-mail: cometica.saude@ufpr.br

UNIVERSIDADE FEDERAL DO
PARANÁ - SETOR DE
CIÊNCIAS DA SAÚDE/ SCS -



Continuação do Parecer: 1.817.016

/ Brochura Investigador	Projeto_de_Pesquisa.docx	17:05:06	Soccol	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	Termo_de_Consentimento_Livre_e_Esclarecido.docx	19/09/2016 17:04:12	Carlos Ricardo Soccol	Aceito
Outros	Termo_de_Responsabilidades_no_Projeto.pdf	19/09/2016 17:02:11	Carlos Ricardo Soccol	Aceito
Outros	Termo_de_Compromisso_para_Utilizacao_de_Dados.pdf	19/09/2016 17:01:16	Carlos Ricardo Soccol	Aceito
Outros	Termo_de_Compromisso_para_o_Inicio_da_Pesquisa.pdf	19/09/2016 17:00:22	Carlos Ricardo Soccol	Aceito
Outros	Declaracao_de_Uso_Especifico_do_Material_e_Dados_Coletados.pdf	19/09/2016 16:59:45	Carlos Ricardo Soccol	Aceito
Outros	Declaracao_de_tornar_publicos_os_resultados.pdf	19/09/2016 16:58:54	Carlos Ricardo Soccol	Aceito
Outros	Termo_de_Confidencialidade.pdf	19/09/2016 16:58:20	Carlos Ricardo Soccol	Aceito
Outros	Concordancia_dos_servicos_envolvidos.pdf	19/09/2016 16:57:49	Carlos Ricardo Soccol	Aceito
Outros	Analise_de_Merito_Cientifico.pdf	19/09/2016 16:57:17	Carlos Ricardo Soccol	Aceito
Outros	Ata_de_Aprovacao_do_Projeto.pdf	19/09/2016 16:56:51	Carlos Ricardo Soccol	Aceito
Outros	Oficio_do_Pesquisador_encaminhando_o_projeto_ao_CEP_SD.pdf	19/09/2016 16:56:15	Carlos Ricardo Soccol	Aceito
Folha de Rosto	Folha_Rostro_PB.pdf	19/09/2016 16:55:03	Carlos Ricardo Soccol	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

CURITIBA, 11 de Novembro de 2016

Assinado por:
IDA CRISTINA GUBERT
(Coordenador)

Endereço: Rua Padre Camargo, 285 - Térreo

Bairro: Alto da Glória

CEP: 80.060-240

UF: PR

Município: CURITIBA

Telefone: (41)3360-7259

E-mail: cometica.saude@ufpr.br

**ANEXO C – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO
(TCLE)**



PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA DE BIOPROCESSOS E BIOTECNOLOGIA
SETOR DE TECNOLOGIA
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA DE BIOPROCESSOS E BIOTECNOLOGIA

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Nós, Carlos Ricardo Soccol, Liliana Isabel Chitolina Zoz, Vanete Thomaz Soccol e Andrea Thomaz Soccol da Universidade Federal do Paraná, estamos convidando o(a) senhor(a), acima de 18 anos, que apresenta problemas relacionados à queda de cabelos, a participar de um estudo intitulado Loção capilar a base do extrato do fungo medicinal *Ganoderma lucidum*. Essa loção foi elaborada para ser usada no tratamento contra queda de cabelos provocada principalmente devido ao afinamento de fios. *Ganoderma lucidum* é um fungo que tem sido amplamente utilizado na medicina chinesa, com propriedades anticancerígenas, antienvhecimento e de melhora do sistema imunológico.

- a) O objetivo desta pesquisa é comprovar a eficácia de extrato de *Ganoderma lucidum* como agente de prevenção à queda capilar, para a melhora da qualidade dos fios de cabelo, o crescimento e aumento de volume dos bulbos capilares.
- b) Caso o(a) sr(a) participe da pesquisa, será necessário realizar consultas para acompanhamento a cada 21 dias de tratamento, realizar coleta de sangue para acompanhamento dos seus níveis hormonais no início e ao término da pesquisa, e responder aos questionamentos que a médica, Dra Andrea Thomaz Soccol, lhe submeterá para avaliação da eficácia da loção testada. O(a) sr(a) não poderá fazer uso de qualquer outro produto para tratamento de queda capilar durante o período da pesquisa.
- c) Para tanto o(a) sr(a) deverá comparecer na Clínica CIOM, localizada na Rua Marechal Floriano Peixoto, nº 475, em Mafra (SC), para consultas médicas de acompanhamento a cada 21 dias, por um período aproximado de 3 meses. Os exames laboratoriais serão realizados no laboratório Riolab, localizado na Praça João Pessoa, nº 170, no centro da cidade de Rio Negro, Paraná.

Participante da pesquisa (Rubrica): Pesquisador que aplicou o TCLE (Rubrica): Orientador (Rubrica):

Comitê de ética em Pesquisa com Seres Humanos do Setor de Ciências da Saúde da UFPR CEP/SD Rua Pe. Camargo, 285 Térreo Alto da Glória Curitiba/PR CEP:80060-240 cometica.saude@ufpr.br - telefone (041) 3360-7259
--

d) É possível que o(a) senhor(a) experimente algum desconforto, principalmente na ocasião da coleta de sangue, onde o paciente poderá sentir a dor da picada da agulha, que é passageira e alguns pacientes poderão apresentar hematoma (mancha roxa) na região puncionada. Isto é perfeitamente normal e poderá ser solucionado com compressas de gelo no local.

e) Alguns riscos relacionados ao estudo podem ser:

- A não eficácia do produto a ser testado levando ao não crescimento de cabelo;
- Alergia no couro cabeludo. A descontinuação do uso será indicada e cada caso que poderá vir a ocorrer será acompanhado pela médica Dra Andrea Thomaz Soccol, uma das participantes responsáveis pelo estudo.

f) Os benefícios esperados com essa pesquisa são: aumentar a quantidade de fios de cabelo cobrindo áreas com falhas, bem como a qualidade de fios (brilho e resistência). No entanto, nem sempre o(a) sr(a) será diretamente beneficiado com o resultado da pesquisa, mas poderá contribuir para o avanço científico.

g) Os pesquisadores, responsáveis por este estudo poderão ser contatados para esclarecer eventuais dúvidas que você possa ter e fornecer-lhe as informações que queira, antes, durante ou depois de encerrado o estudo.

- Professor Dr Carlos Ricardo Soccol, orientador e pesquisador responsável pela pesquisa:

Telefone: (41) 9623-5111

Email: soccol@ufpr.br

Endereço: Av. Francisco H dos Santos, 210 - Cenbapar - Jardim das Américas - Curitiba, Paraná (Segunda-feira a sexta-feira, das 8:00 às 18:00).

- Liliana Isabel Chitolina Zoz, doutoranda:

Telefone: (41) 9997-1727

Email: zoz.liliana@yahoo.com.br

Endereço: Av. Francisco H dos Santos, 210 - Cenbapar - Jardim das Américas - Curitiba, Paraná (Segunda-feira a sexta-feira, das 8:00 às 18:00).

Participante da pesquisa (Rubrica): Pesquisador que aplicou o TCLE (Rubrica): Orientador (Rubrica):

Comitê de ética em Pesquisa com Seres Humanos do Setor de Ciências da Saúde da UFPR CEP/SD Rua Pe. Camargo, 285 Térreo Alto da Glória Curitiba/PR CEP:80060-240 cometica.saude@ufpr.br - telefone (041) 3360-7259
--

- Professora Dra Vanete Thomaz Soccol, co-orientadora responsável pela pesquisa:

Telefone: (41) 9956-5001

Email: vanetesoccol@gmail.com

Endereço: Av. Francisco H dos Santos, 210 - Cenbapar - Jardim das Américas - Curitiba, Paraná (Segunda-feira a sexta-feira, das 8:00 às 18:00).

- Dra Andrea Thomaz Soccol, médica responsável pela pesquisa:

Telefone: (47) 3642-5010 e (41) 8503-0505 (Segunda-feira a sexta-feira, das 8:00 às 18:00)

Email: andreasoccol@yahoo.com.br

Endereço: Rua Marechal Floriano Peixoto, 475 - Mafra, Santa Catarina.

h) Neste estudo será utilizado um grupo controle. Isto significa que o(a) sr(a) poderá receber um tratamento sem o princípio ativo (grupo controle) que poderá não gerar resultados.

i) A sua participação neste estudo é voluntária e se o(a) sr(a) não quiser mais fazer parte da pesquisa poderá desistir a qualquer momento e solicitar que lhe devolvam o termo de consentimento livre e esclarecido assinado.

j) As informações relacionadas ao estudo poderão ser conhecidas por pessoas autorizadas, sendo elas: o orientador e pesquisador responsável prof Dr Carlos Ricardo Soccol, a doutoranda Liliana Isabel Chitolina Zoz, a co-orientadora profa Dra Vanete Thomaz Soccol e a médica responsável, Dra Andrea Thomaz Soccol. No entanto, se qualquer informação for divulgada em relatório ou publicação, isto será feito sob forma codificada, para que a **sua identidade seja preservada e seja mantida a confidencialidade.**

k) O material obtido: amostras biológicas, questionários e imagens serão utilizados unicamente para essa pesquisa e serão descartados ao término do estudo, dentro de 2 anos.

l) As despesas necessárias para a realização da pesquisa (exames, medicamentos) não são de sua responsabilidade e serão pagos pelos próprios pesquisadores. O(a) sr(a) não receberá qualquer valor em dinheiro pela sua participação.

Participante da pesquisa (Rubrica): Pesquisador que aplicou o TCLE (Rubrica): Orientador (Rubrica):

Comitê de ética em Pesquisa com Seres Humanos do Setor de Ciências da Saúde da UFPR CEP/SD Rua Pe. Camargo, 285 Térreo Alto da Glória Curitiba/PR CEP:80060-240 cometica.saude@ufpr.br - telefone (041) 3360-7259

m) O(a) senhor(a) terá a garantia de que problemas como alergias decorrentes do estudo serão tratados na Clínica CIOM.

n) Quando os resultados forem publicados, não aparecerá seu nome, e sim um código.

o) Se você tiver dúvidas sobre seus direitos como participante de pesquisa, você pode contatar também o Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos (CEP/SD) do Setor de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Paraná, pelo telefone 3360-7259.

Eu, _____ li esse Termo de Consentimento e compreendi a natureza e objetivo do estudo do qual concordei em participar. A explicação que recebi menciona os riscos e benefícios. Eu entendi que sou livre para interromper minha participação a qualquer momento sem justificar minha decisão e sem qualquer prejuízo para mim. Eu entendi o que não posso fazer durante a pesquisa, como utilizar um tratamento alternativo. Fui informado que serei atendido sem custos para mim se eu apresentar algum dos problemas relacionados no item m.

Eu concordo voluntariamente em participar deste estudo.

Mafra, ____ de _____ de _____.

Assinatura do Participante de Pesquisa

Assinatura do Pesquisador Responsável ou quem aplicou o TCLE

Comitê de ética em Pesquisa com Seres Humanos do Setor de Ciências da Saúde da UFPR CEP/SD Rua Pe. Camargo, 285 Térreo Alto da Glória Curitiba/PR CEP:80060-240 cometica.saude@ufpr.br - telefone (041) 3360-7259
--

Histórico capilar:

- Presença de alopecia areata:

Sim Não

- Apresenta falha capilar:

Sim Não

-

- Já usou algum produto para queda capilar:

Sim Não

Em caso afirmativo, qual:

Minoxidil Finasterida

Pantogar Imecaap

Avaliação capilar:

- O cabelo apresenta quebra:

Sim Não

- O cabelo é fino:

Sim Não

- O cabelo apresenta queda:

Sim Não

**ANEXO E – FICHA DE AUTOAVALIAÇÃO DE 30, 60 E 90 DIAS
ENTREGUE AOS PACIENTES**



Mafra, ____ de _____ de _____.

Loção capilar a base de extrato do fungo medicinal *Ganoderma lucidum*

Nome:	
Endereço:	
Data de Nascimento:	Data de cadastro:
Telefone:	Email:
Código do paciente:	Frasco nº:

ANÁLISE CAPILAR

ETAPA II

Avaliação capilar:

- Houve melhora:

Sim Não

Em caso afirmativo, assinale os itens nos quais a melhora foi observada:

Queda Brilho

Quebra Nascimento capilar

- Houve aparecimento de reações adversas:

Sim Não

Em caso afirmativo, quais:

Coceira Lesões

Vermelhidão Outros _____

Anotações:

Dra Andrea Thomaz Soccol
Médica Responsável pela Pesquisa
Clínica CIOM

Clínica CIOM – Centro Integrado de Otorrinolaringologia de Mafra
Rua Marechal Floriano Peixoto, 475 | Mafra/SC | CEP:89300-000
clinica.ciom@hotmail.com - telefone (047) 3642-1020