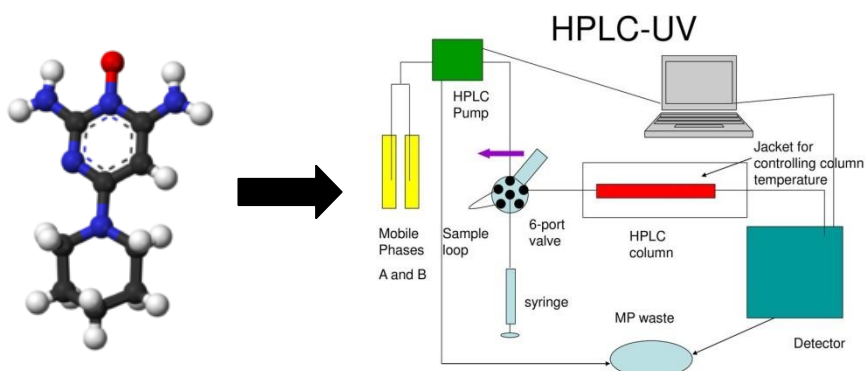


## Graphical Abstract



This work shows the development and validation of a method for quantification of minoxidil, since the Brazilian Pharmacopoeia does not present a monograph for the same and the methodologies present in other pharmacopoeias are complex.

### DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE UM MÉTODO PARA QUANTIFICAÇÃO DE MINOXIDIL EM SOLUÇÕES CAPILARES POR CLAE-UV

**Jonh Helton de Oliveira Soares<sup>a</sup>, Layssa Guedes da Silva<sup>a</sup>, \* Sebastião Ricardo Almeida Menezes<sup>a</sup> Carlos Eduardo Miranda de Sousa<sup>a</sup>, Ana Catarina Simonetti<sup>a</sup>**

<sup>a</sup>Centro Universitário Tabosa de Almeida, 55016-901 Caruaru - PE, Brasil

( ) Manuscrito com material suplementar.

(X) Manuscrito sem material suplementar.

\* layssa.guedes12@gmail.com

## DEVELOPMENT AND VALIDATION OF A METHOD FOR QUANTIFYING MINOXIDIL IN HAIR SOLUTIONS BY CLAE-UV

Minoxidil is a vasodilator, originally used for the treatment of hypertension, but has been widely used for hair growth in people with baldness and growth or repair of the failed beard. Fast and gentle analytical methods for the quantification of minoxidil are quite valued in pharmaceutical quality control. In this context, the objective of this work was based on the development and validation of a new analytical method by Liquid High Efficiency Chromatography (HPLC) for quantification of the active principle minoxidil. The analyzes were carried out by a high performance liquid chromatograph Prominence Shimadzu, in isocratic mode using C8 column, with detection at 254nm. The mobile phase consisted of methanol and water at 0.5% acetic acid (35:65 v/v) at a flow rate of 1 mL/min. The linearity range of the method was 50 µg/mL to 150 µg/mL ( $R^2=0.9929011$ ). The retention time of minoxidil was  $\pm 3.37$  minutes, in this way, it proved to be a sensitive, specific, accurate, precise and fast method. The identification and quantification of minoxidil were carried out in six drugs purchased in pharmacies of manipulation of Caruaru - PE, where all the samples obtained results in the recommended range, making them approved.

Key words: Minoxidil; HPLC; Method; Validation.

## INTRODUÇÃO

A alopecia androgênica (AAG) é a forma mais comum de perda de cabelos acometendo tanto homens quanto mulheres.<sup>1</sup> Em decorrência da alteração no ciclo do cabelo, acontece uma miniaturização dos fios, tornando-se finos e mais curtos<sup>2</sup>, assim afetando o folículo piloso e ocorre pela conjugação de fatores genéticos e ambientais.<sup>2</sup> Embora não traga consequências à saúde, a perda de cabelo pode interferir na qualidade de vida do indivíduo.<sup>3</sup>

O folículo sofre alterações que caracterizam três fases bem distintas no ciclo de crescimento dos pelos: a anágena ou de crescimento, a catágena ou de regressão e a telógena ou de repouso.<sup>3</sup> A fase anágena, pode ter duração de dois a seis anos e se encontra em atividade mitótica da matriz. Já a fase catágena é a menor fase do ciclo e tem duração de duas a três semanas. Na fase telógena, o fio apresenta-se mais delgado e claro e tem duração de aproximadamente três meses.<sup>2</sup> Na AAG a fase de latência entre os ciclos é evidente, levando a uma redução no número de cabelos visíveis no couro cabeludo.<sup>4</sup>

A AAG é uma condição progressiva se não tratada. O número de fios diminui aproximadamente 5% ao ano.<sup>5</sup> Duas opções terapêuticas foram bem investigadas e possuem efeitos comprovados para AAG : o minoxidil tópico e o finasteride oral, para os homens.<sup>3</sup> O minoxidil (3-óxido-2,4-diamino-6-piperidina) é um sólido cristalino branco, inodoro, insolúvel em água em acetona ou soluções alcalinas, pouco solúvel em álcoois e solúvel em soluções ácidas.<sup>6</sup>

O minoxidil é um vasodilatador, e originalmente usado para tratamento de hipertensão.<sup>9</sup> O fármaco age como vasodilatador periférico, que ao ser ingerido é metabolizado no fígado pela ação da sulfotransferase, transformando-se em hidralazina ativa. Como a hidralazina produz apenas vaso-dilatação arteriolar, causa ativação simpática reflexa, taquicardia e retenção hidro-salina, portanto o minoxidil deve ser administrado em conjunto com diuréticos e bloqueadores simpáticos para minimizar as reações adversas citadas acima.<sup>10</sup> Percebeu-se ainda que esse fármaco possui um outro efeito colateral importante, o crescimento excessivo de cabelos, assim, o minoxidil passou a ser usado como um tratamento de aplicação tópica para a queda de cabelos.<sup>11</sup>

O minoxidil prolonga a fase anágena através de um mecanismo que ainda não é conhecido, diminuindo a queda de cabelo, mas não inibindo o processo biológico.<sup>3</sup> A formulação tópica a 5% aumenta o tempo de evolução da doença e promove um leve crescimento de cabelos em 40% dos homens, mas em apenas 4% dos pacientes este crescimento é moderado a intenso.<sup>7</sup> Quando há a interrupção do tratamento, em quatro a seis semanas a queda de cabelo reinicia

e, em cerca de seis meses, sem a medicação, o paciente retorna ao estado inicial.<sup>8</sup>

O uso do minoxidil é considerado seguro pela comunidade médica e pela população em geral. Entretanto, este fármaco acumula-se nos lipídeos e atravessa com facilidade as barreiras biológicas.<sup>12</sup> O fármaco está associado à despigmentação do cabelo, irritação local, dermatite de contato, leucoderma, diminuição dos melanócitos e da melanina. Além disso, estudos sugerem, um potencial teratogênico significativo relacionando seu uso e mal formação fetal.<sup>12</sup> Os produtos comerciais disponíveis no mercado chama-se Regaine® e Alooxidil®, comercializados pelos laboratórios Pharmacia e Theraskin, respectivamente.<sup>13,14</sup> Existe uma maior busca da população pela forma manipulada do produto, por ter um preço mais acessível quando comparado ao preço dos vendidos em farmácias comerciais, já que se trata de um produto importado.<sup>15</sup>

Em decorrência dos efeitos colaterais associados ao uso do minoxidil e ao fato de que as preparações utilizadas pela grande parte da população serem manipuladas e não industriais, faz-se necessária a avaliação da qualidade e da concentração exata do fármaco nas formulações.<sup>15</sup>

A Farmacopeia Brasileira não apresenta monografia para o minoxidil.<sup>16</sup> Entretanto, segundo a Farmacopeia Britânica, produtos comercializados não devem conter menos que 95% e não mais que 110% de minoxidil em suas formulações.<sup>17</sup>

Estudos foram realizados, utilizando métodos diversos para quantificação do minoxidil, como o uso da análise por injeção de fluxo (FIA) com detecção espectrofotométrica.<sup>18</sup> A determinação eletroanalítica de minoxidil usando dois eletrodos compósitos de grafite-poliuretana (GPUE) e grafite-borracha de silicone (GSRE). Ambos apresentaram-se eficientes, com resultados exatos e precisos.<sup>18</sup> Um outro método é proposto baseado na reação redox entre  $\text{KMnO}_4$  e o minoxidil (Permanganometria). Através de estudos realizados, concluiu-se que o método é eficiente, de aplicação simples e de baixo custo, dentro das limitações de um procedimento volumétrico clássico.<sup>10</sup> Um outro método foi desenvolvido para determinação de minoxidil em cosméticos usando Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC).<sup>19</sup>

A Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) é uma das técnicas de identificação e quantificação do fármaco, citada nas farmacopeias, é realizada através da utilização de uma mistura composta de docusato de sódio, ácido acético glacial, água e metanol como fase móvel e análise em coluna C18.<sup>17</sup>

Em trabalhos anteriores, que envolveram a análise minoxidil por CLAE, houve métodos que utilizaram um gradiente de fase móvel contendo ácido acético glacial e tetrahidrofurano.<sup>20</sup> Em

outro método encontrado na literatura, a fase móvel foi constituída por acetonitrila, tampão fosfato de potássio 25mM com 0,36% de Trietilamina.<sup>15</sup> Por fim, foi encontrada na literatura, métodos, onde sua fase móvel foi composta apenas por acetonitrila e água a 0,1% de ácido trifluoracético.<sup>19</sup>

Assim como citado anteriormente, não há monografia sobre o minoxidil na Farmacopéia Brasileira e as metodologias de identificação e quantificação do fármaco presentes nas Farmacopeias Internacionais são complexas e de difícil execução. Dessa forma, o objetivo desse trabalho foi desenvolver e validar um novo método analítico por CLAE- UV para a análise de minoxidil.

## **PARTE EXPERIMENTAL**

### **Substância Química de Trabalho (SQT) e amostra**

A SQT foi adquirida em quantidade suficiente, fornecido pelo laboratório Purifarma sendo utilizada para validação do método. As amostras utilizadas no desenvolvimento e validação de metodologia analítica foram adquiridas no comércio da cidade de Caruaru - PE, em farmácia de manipulação, totalizando seis amostras. O componente presente na formulação é minoxidil 5%, em soluções hidroalcoólica.

### **Equipamentos**

Os experimentos foram realizados em cromatógrafo líquido Prominence Shimadzu (Kyoto, Japão), equipado com 2 bombas isocráticas LC-20AD, compartimento termostaticado da coluna Shimpack CLC C8(m), injetor manual (Capacidade: 20ul) e detector SPD-10A Shimadzu equipado com lâmpada UV, gerenciado pelo software LcSolution (Shimadzu).

### **Reagentes**

Os reagentes utilizados foram: água obtida através do sistema Milli-Q (Millipore Corporation), ácido acético padrão HPLC (VETEC - Química Fina), metanol grau HPLC (SIGMA-ALDRICH).

### **Preparo e processamento da SQR e amostra**

Para preparação da solução de SQR, foi pesado, exatamente, o equivalente a 5 mg de

minoxidil e dissolvido em 5 mL de metanol (1 mg/mL). Alíquotas desta solução foram diluídas em metanol para obter concentrações que foram precisas para o desenvolvimento desta pesquisa.

Para preparação das amostras, não foi preciso utilizar métodos de extração. Consistiu na simples diluição manual de um volume exato da solução hidroalcoólica de minoxidil em metanol, suficiente para atingir a concentração de 1mg/mL. Com essa solução, foi feita através de mesmo método, todas as diluições necessárias para se atingir as concentrações desejadas para se realizar toda a pesquisa.

Vale salientar, que após cada diluição, a solução resultante foi homogeneizada com auxílio de vortex (KACIL INDÚSTRIA E COMÉRCIO).

## **Desenvolvimento do método analítico**

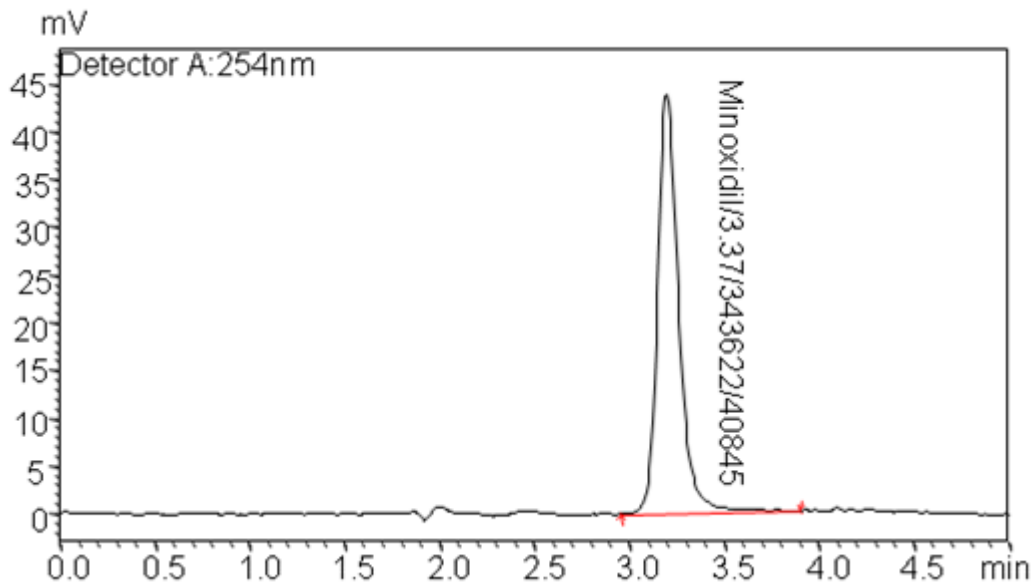
### *Condições cromatográficas*

O desenvolvimento do método analítico envolve a construção de diversas etapas como a preparação da amostra, a escolha de condições cromatográficas e a quantificação do produto em questão. Parâmetros como a fase móvel, o fluxo, a coluna cromatográfica e o comprimento de onda de detecção devem ser pré-estabelecidos com critério.

Inicialmente, foram realizadas pesquisas bibliográficas para a obtenção de informações sobre métodos já desenvolvidos. Alguns fatores como composição da fase móvel e fase estacionária foram exaustivamente analisados através de testes com diversas condições de análise. Foram executadas diversas tentativas-erro, com diversas formas de se trabalhar com fase móvel, como: Metanol e água Milli-Q em diferentes proporções se mostraram falhas: (50:50 v/v); (40:60 v/v); (70:30 v/v); (20:80 v/v), todas essas mostraram picos cromatográficos assimétricos e impossíveis de serem quantificados. Após testes, adicionamos 0.5% de ácido acético na fase constituída por água e obtivemos melhorias significativas em nossos resultados. Além das tentativas de fase móvel, também foi trabalhada formas com fases estacionárias diferentes, como: Gemini 5u C18 110A Phenomenex; Hypersil ODS. Essas fases estacionárias também não trouxeram resultados satisfatórios.

Através da metodologia de tentativa-erro, a condição cromatográfica melhor encontrada foi constituída de: Fase estacionária Shimpack CLC C8; Fase móvel de água a 0.5% de ácido acético e metanol (65:35v/v); Fluxo da fase móvel em 1ml/min; Corrida Cromatográfica de

7 minutos; Tempo de retenção aproximado de 3.37 minutos; Comprimento de onda em 254nm.



**Figura 1.** Cromatograma típico obtido a partir das condições de análise estabelecidas. O tempo de retenção para o minoxidil foi de 3,37 minutos.

### **Validação da metodologia**

Em nosso estudo, objetivou-se o desenvolvimento e validação de metodologia para a determinação do princípio ativo minoxidil em produtos farmacêuticos. Todos os testes para validação do método foram de acordo com a RDC 166 DE 2017. Nessa situação, os parâmetros que devem ser medidos para a validação de um método analítico são: Linearidade, Precisão, Exatidão, Efeito Matriz e Seletividade.

#### *Linearidade*

A linearidade foi avaliada a partir da construção de uma curva padrão em análise em triplicata de cinco pontos de concentração (50, 75, 100, 125, 150 ug/mL) da SQR. A avaliação da linearidade foi realizada através do cálculo do coeficiente de variação(CV%) entre os pontos da curva e o coeficiente de correlação linear( $r^2$ ), através de representação gráfica das respostas em função da concentração do analito, para que seja comprovado a capacidade de obter respostas analíticas diretamente proporcionais à concentração de um analito em uma amostra, onde o coeficiente de correlação deve estar acima de 0,990.

### *Precisão*

A partir de solução contendo 1,0 mg/mL de amostra de minoxidil em metanol, foram retiradas 6 alíquotas de 1,0 mL cada e transferidas para balões volumétricos. Os balões foram completados com fase móvel suficiente, de modo que a concentração final das amostras fosse de 100,0 µg/mL. Esse teste foi feito por dois analistas diferentes que fizeram o mesmo procedimento por dois dias diferentes. Os resultados foram obtidos através da média aritmética dos dados obtidos, onde foi feito o cálculo de desvio padrão, coeficiente de variação e exatidão. Com todos esses dados, deve ser comprovado que o método analítico fornece uma reprodutibilidade satisfatória.

### *Exatidão*

A exatidão do método foi avaliada a partir de cinco determinações contemplando o intervalo linear do procedimento, ou seja, três níveis de concentrações, baixa, média e alta, em triplicata. A exatidão foi avaliada a partir da triplicata de três soluções diferentes contendo 50, 100 e 150 µg/mL de minoxidil. Após as injeções e cálculos de: Desvio padrão, Coeficiente de variação e Exatidão, deve ser provado que o método fornece dados em concordância com o valor verdadeiro conhecido.

### *Efeito Matriz*

O efeito Matriz foi avaliado a partir da construção de uma curva padrão de análise em triplicata de cinco pontos de concentração (50, 75, 100, 125, 150 µg/mL) da solução SQR e uma solução de amostra da pesquisa, a fim que se comprove que há proporcionalidade de resultado entre as duas.

### *Seletividade*

É feita a análise da SQR em concentração desejada, de uma solução composta apenas de fase móvel e uma solução de amostra na mesma concentração da SQR. Deve se fazer um comparativo a fim de se comprovar que o pico cromatográfico encontrado seja realmente do princípio ativo pesquisado, e que não sofreu ações de possíveis interferentes.

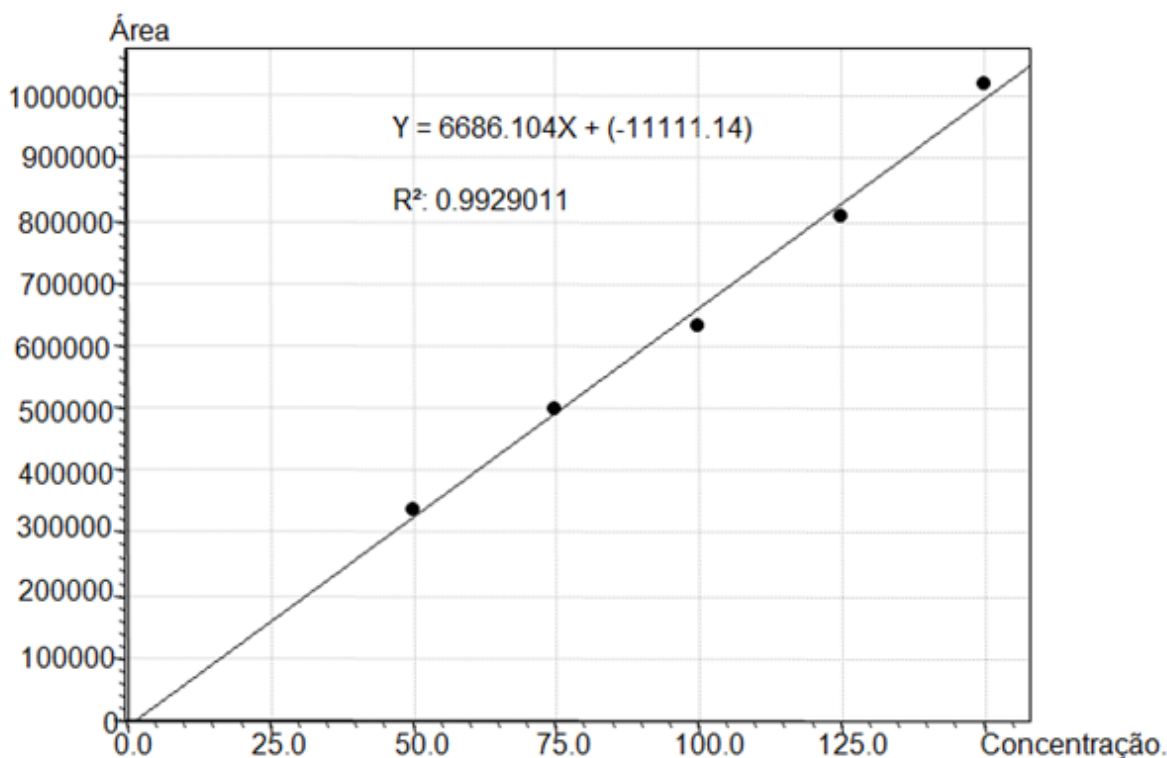


## RESULTADOS E DISCUSSÕES

### Validação do método analítico

#### Linearidade

A linearidade foi avaliada a partir da construção de uma curva padrão. Gráfico de concentração *versus* área foi feito e apresentaram linearidade na faixa de concentração de 50 – 150 µg/mL, com coeficiente de correlação igual a 0.9929011 (Aprovado), e equação da reta  $Y = 6686.104X + (-11111.14)$ , onde x corresponde à concentração e y corresponde à área (Figura 2).



**Figura 2.** Gráfico concentração versus área: Linearidade.

#### Precisão

A precisão foi verificada pela reprodutibilidade. Os resultados obtidos estão representados na Tabela 1. Os valores de DPR encontrados foram inferiores a 5%, indicando que o método é preciso.

A precisão do método foi avaliada em dois diferentes dias e por dois analistas em cada dia, nos quais, cada analista realizou seis determinações das amostras preparadas individualmente para cada dia na concentração de 100µg/mL de minoxidil. Segundo os resultados de DPR, pode-se concluir que o método apresenta reprodutibilidade.

**Tabela 1.Precisão**

**Precisão /Concentração = 100ng/mL (100%)**

	<b>Dia 1</b>		<b>Dia2</b>	
	<b>Analista 1</b>	<b>Analista 2</b>	<b>Analista 1</b>	<b>Analista 2</b>
<b>Média (n=6)</b>	100,456	100,817	100,147	102,876
<b>Desvio padrão</b>	1,22	0,95	0,87	0,86
<b>Coef.de Variação</b>	1,22	0,95	0,87	0,84
<b>Exatidão %</b>	100,46	100,82	100,15	102,88

**Exatidão**

Foram escolhidos três pontos médios da curva de calibração para esta análise (50ug/mL, 100ug/mL e 150ug/mL). A Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) recomenda que o desvio padrão relativo não exceda 5%. Assim, os valores encontrados atendem aos limites estabelecidos, como está estabelecido na Tabela 2.

**Tabela 2.Exatidão**

<b>Nível (%)</b>	<b>Média (n=3)</b>	<b>Desvio padrão</b>	<b>Coef.de Variação</b>	<b>Exatidão</b>
50	51,411	0,725	1,410	102,82
100	100,945	0,492	0,487	100,95
150	150,816	1,433	0,950	100,54

### *Efeito Matriz*

Houve paralelismo na reta do resultado entre a solução de amostra e solução SQR, tornando o método aprovado neste quesito.

### *Seletividade*

Através da análise, foi comprovado que o pico cromatográfico é realmente do minoxidil e não houve ação de outros possíveis interferentes.

### **Doseamento das amostras através do método analítico**

O doseamento se deu pelo preparo de alíquotas de 6 medicamentos minoxidil a 5% na forma farmacêutica semi-sólida, adquiridos em farmácias de manipulação de Caruaru - PE em frascos de 100mL. O preparo foi através de diluições para chegarmos a concentração de 100 ug/mL, após o preparo, realizamos as injeções em triplicata com as condições cromatográficas usadas na validação do método analítico. Todos os resultados foram obtidos após os cálculos do equipamento. A Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) recomenda que o Teor de minoxidil presente nas amostras, conseqüentemente no medicamento, por meio da RDC 31/2010 não ultrapasse a faixa de 5% para mais ou para menos. Consideramos o número 100% para o total de minoxidil que teoricamente cada amostra deveria ter, seguindo a margem de erro de  $5\% \pm$ , não poderíamos ter valores abaixo de 95% nem acima de 105%. O coeficiente de variância, para nosso método ser aprovado, não poderia ter valores acima de 5%. Todos os 6 medicamentos testados foram aprovados, como é mostrado na Tabela 3.

***Tabela 3. Doseamento***

<b>Amostra</b>	<b>M1</b>	<b>M2</b>	<b>M3</b>	<b>M4</b>	<b>M5</b>	<b>M6</b>
Teor	98,775	101,57	103,48	104,13	101,47	104,28
CV	4,158	4,08	4,1741	4,21	4,07	4,842

## CONCLUSÃO

O método desenvolvido através de CLAE revelou-se adequado para a quantificação de minoxidil em soluções semi-líquidas. Através da validação, os parâmetros de seletividade, linearidade, precisão, efeito matriz e exatidão apresentaram conformidade com as exigências nacionais descritas na RDC 166/2017 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). A nova metodologia consiste numa alternativa simples, rápida, econômica e segura para a indústria de medicamentos, laboratórios de pesquisa e de controle de qualidade, comprovando que é seletivo, exato, sensível e rápido. Foi utilizado reagentes menos tóxicos e de menor custo em relação a outros métodos de quantificação em CLAE-UV na literatura vigente. A respeito dos resultados, dos seis produtos analisados, todos obtiveram dados dentro da faixa recomendada.

## REFERÊNCIAS

1. Silva, R. T. D.; *Trabalho de Conclusão de Curso*, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Brasil, 2011.
2. Da Silva, L. B. P.; SANTOS, B. A.; *Id online Revista De Psicologia* **2018**, 12, 1065.
3. Mulinari-Brenner, F.; Soares, I. F.; *Revista de Ciências Médicas* **2009**,18, 153.
4. Courtois, M.; Loussouarn, G.; Hourseau, C.; Grollier, J.F. *Skin Pharmacol* **1994**, 7, 84.
5. Rushton, D.H.; Ramsay, I.D.; Norris, M.J.; Gilkes, J.J. *ClinExpDermatol.* **1991**; 16, 188.
6. Busavari, S. S; O'Neil, M.J.; Smith, A.; Heckelman, P. E.; Kinneary, J. F. *Merck & Company Incorporated* **2001**, 6229.
7. Savin RC. *J Am AcadDermatol* **1987**, 16, 696.
8. Olsen, E.A.; Weiner, M.S. *J Am AcadDermatol* **1987**, 17, 97.
9. Devine, B.L.; Fife, R.; Trust, P.M. *Br Med J* **1977**, 2, 667.

10. Sousa, R.A.; Cavaleiro, E.T.G. *Ecletica Quim.* **2009**, 34, 41.
11. Shorter, K.; et. al.; *The FASEB Journal* **2008**, 22, 1725.
12. Smorlesi, C.; et. al. *Birth defects Research. Part A, Clinical and molecular teratology* **2003**, 67, 997.
13. [http://www.medicinanet.com.br/bula/4445/regaine\\_5.htm](http://www.medicinanet.com.br/bula/4445/regaine_5.htm), acessada em Julho 2018.
14. <http://www.theraskin.com.br/produtos/aloxidil/>, acessada em Julho 2018.
15. Piccoli, P. L. *Trabalho de Conclusão de Curso*, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Brasil, 2013.
16. *Farmacopéia Brasileira*, 5ª ed., Atheneu: Rio de Janeiro, 2010.
17. *British Pharmacopoeia*. The Stationary Office: Pharmacopoeia Commission British, 2011, 3018.
18. Sousa, R.A. *Tese de Doutorado*, Universidade Federal de São Carlos, Brasil, 2009.
19. De Orsi, D. et al. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2008**, 48, 641.
20. Galdhane, H. K.; et. al.. *J. Pharm. Res* **2011**, 4481.