

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

FACULDADE DE FARMÁCIA

BRUNA LOPES PICCOLI

DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODO POR
CROMATOGRAFIA A LÍQUIDO DE ALTA EFICIÊNCIA PARA
ANÁLISE DE MINOXIDIL

Porto Alegre

2013

Bruna Lopes Piccoli

DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODO POR
CROMATOGRAFIA A LÍQUIDO DE ALTA EFICIÊNCIA PARA
ANÁLISE DE MINOXIDIL

Artigo desenvolvido no curso de Farmácia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, apresentado à disciplina de Trabalho de Conclusão de Curso (TCC).

Orientador: Prof. Dr. Martin Steppe.

Coorientador: Ma. Amanda Thomas Barden.

PORTO ALEGRE

2013

“O sucesso nasce do querer, da determinação e persistência em se chegar a um objetivo. Mesmo não atingindo o alvo, quem busca e vence obstáculos, no mínimo fará coisas admiráveis.”

José de Alencar

AGRADECIMENTOS

Ao professor Dr. Martin Steppe pela oportunidade de realização deste trabalho, apoio e ajuda no que foi necessário, e por ser um exemplo de dedicação, ética e competência.

À minha coorientadora Amanda Thomas Barden pelo apoio, ajuda, dedicação e amizade.

A meus colegas de faculdade e futuros colegas de profissão, pelos inúmeros momentos que passamos juntos, pelo companheirismo, ajuda, força e pela amizade que eu sei que será pra sempre!

Aos demais amigos e colegas do laboratório 402, obrigada pela ajuda e compreensão.

E, principalmente, a minha família, que mesmo não estando perto sempre estive ao meu lado, lutando comigo para que meus objetivos fossem alcançados, me ensinando a ser uma pessoa corajosa e batalhadora, e uma profissional ética e responsável. Muito Obrigada! A minha irmã Andreli, pela amizade, dedicação, paciência e amor.

SUMÁRIO

1. ARTIGO	6
2. FIGURAS E TABELAS	25
3. ANEXO	30

1. ARTIGO

Este artigo foi elaborado segundo as normas da revista Quimica Nova apresentada em anexo.

Desenvolvimento e validação de método por cromatografia a líquido de alta eficiência para análise de minoxidil

Bruna Piccoli^{1,a*}, Amanda Thomas Barden^{1,b}, Martin Steppe^{1,c}

¹ Laboratório de Controle de Qualidade Farmacêutico, Faculdade de Farmácia, UFRGS, Av. Ipiranga 2752 Lab. 402, 90610-000, Porto Alegre, RS, Brasil.

^a Acadêmica da Faculdade de Farmácia – UFRGS.

^b Aluna de Doutorado no PPGCF – UFRGS.

^c Professor do Departamento de Produção e Controle de Medicamentos – UFRGS.

Título: Desenvolvimento e validação de método por cromatografia a líquido de alta eficiência para análise de minoxidil.

Abstract: Androgenic alopecia is a disease that leads to miniaturization of the hair follicle, whose most common treatment is the use of topical formulations containing minoxidil. The methods present in British and American pharmacopoeias are difficult to apply, and the Brazilian Pharmacopoeia does not describe an analytical methodology for this drug. Thus, it became necessary to develop and validate an quantitative method by HPLC for minoxidil analysis. The method used phenyl column and mobile phase consisted by a mixture of potassium phosphate buffer (0.36% triethylamine) and acetonitrile. The validation of the method has proven its specificity, linearity, precision, accuracy and robustness.

Keywords: Androgenic alopecia, Minoxidil, HPLC.

INTRODUÇÃO

A alopecia androgênica é a causa mais comum de alopecia em ambos os sexos.¹ É caracterizada por alteração no ciclo do cabelo levando à miniaturização folicular progressiva com conversão de fios terminais em fios mais finos, curtos e menos pigmentados.^{2,3} A doença se inicia entre 12 e 40 anos de idade para os homens, e afeta aproximadamente 50% da população antes dos 50 anos de idade.⁴

O folículo piloso passa por três estágios principais ao longo do seu desenvolvimento: proliferação (fase anágena), involução (fase catágena) e repouso (fase telógena), com regeneração em sucessivos ciclos. No couro cabeludo normal, a fase anágena dura de dois a sete anos, a fase catágena cerca de duas semanas, e a fase telógena aproximadamente três meses.¹ A miniaturização do folículo capilar ocorre devido a uma redução gradual na duração da fase anágena e a prolongação do período latente (fase telógena) do ciclo do cabelo.⁵

Entre as medidas farmacológicas empregadas atualmente para pacientes que sofrem com essa doença, destacam-se a solução tópica de minoxidil e o medicamento contendo finasterida, que é utilizado por via oral. No entanto, ambos necessitam de utilização por período prolongado para resultados satisfatórios, e nenhum deles é capaz de restaurar toda a perda capilar.¹

O fármaco minoxidil (3-oxido-2,4-diamino-6-piperidinopitimidina) (Figura 1) é um agente vasoativo conhecido por causar forte vasodilatação periférica, ocasionando dilatação das arteríolas através da abertura de canais de potássio.⁶ Seu uso é preconizado em concentrações de 5% para homens e 2 a 5% para mulheres.¹

Na década de 70, o minoxidil foi largamente utilizado por via oral por causar relaxamento da musculatura vascular lisa e reduzir a pressão sanguínea. Além disso, foi considerado um dos fármacos de escolha no tratamento da hipertensão renal maligna.⁷ No entanto, um efeito colateral importante de excessivo crescimento de cabelos foi observado com a utilização deste medicamento. Devido a isso, o uso do minoxidil foi remanejado como um tratamento de aplicação tópica para queda de cabelos.⁸

O mecanismo do fármaco ainda não está bem elucidado, apesar da sua utilização por mais de 20 anos. Sugere-se que o fármaco estimule os vasos da pele a aumentar o fluxo de sangue no local, ou que tenha uma possível ação dentro do próprio folículo capilar.⁸ O que se sabe é que este fármaco atua aumentando a duração da fase anágena, contribuindo para o aumento da densidade capilar.¹

O minoxidil é o tratamento medicamentoso que provou eficácia quando usado topicamente, e é o único cujo uso é aprovado para a queda de cabelos em mulheres.⁵ O seu uso é considerado seguro tanto pela comunidade médica quanto pela população em geral. No entanto, este fármaco atravessa facilmente as barreiras biológicas e se acumula nos lipídios. A literatura científica relata, ainda, que seu uso crônico no couro cabeludo pode causar hipotensão e taquicardia.⁷

O fármaco está associado à despigmentação do cabelo, irritação local, dermatite de contato, leucoderma, diminuição dos melanócitos e da melanina. Além disso, há dados que associam a ocorrência de morte súbita devido ao uso do fármaco.⁹ Estudos sugerem, finalmente, um potencial teratogênico significativo relacionando seu uso e mal formação fetal.⁷

O produto comercial disponível no mercado chama-se Regaine®, comercializado pelo laboratório Pharmacia.¹⁰ Trata-se de um produto importado, cuja

acessibilidade é difícil e o preço nas farmácias comerciais ainda é muito elevado. Isso torna a prática da manipulação desse produto uma alternativa vantajosa para a maioria da população.

Devido aos efeitos colaterais importantes associados ao uso do minoxidil e ao fato de que as preparações utilizadas pela grande maioria das pessoas serem de origem manipulada e não industrial, torna-se necessária a avaliação da qualidade e da concentração exata do fármaco nas formulações.

Segundo a especificação da Farmacopeia Britânica, produtos comercializados não devem conter menos que 95% e não mais que 110% de minoxidil em suas formulações.¹¹

Uma das técnicas de identificação e quantificação do fármaco, citada nas farmacopeias, é realizada através da Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE), utilizando uma mistura composta de docusato de sódio, ácido acético glacial, água e metanol como fase móvel, e análise em coluna C18.^{11,12}

Galdhane e colaboradores (2011) desenvolveram e validaram um método para análise de minoxidil por CLAE utilizando um gradiente de fase móvel contendo ácido acético glacial e tetrahidrofurano (THF).¹³ Zarghi e colaboradores (1998) utilizaram coluna C18 (150 x 3,9 mm, 4 mm) e fase móvel composta de uma mistura de água e tampão fosfato, adicionado de docusato de sódio, numa vazão de 1,3 mL/min.¹⁴ Em outro estudo, Orsi e colaboradores (2008) utilizaram um gradiente de concentração na fase móvel, que era composta de água (0,1% ácido trifluoroacético) e acetonitrila.¹⁵

As Farmacopeias Americana (USP) e Britânica, além dos artigos científicos citados nesse trabalho, apresentam métodos cromatográficos de difícil execução na prática, bem como o uso de substâncias irritantes à pele, olhos e ao sistema

respiratório, com risco inclusive de lesões oculares graves.^{13,16} . Além disso, a Farmacopeia Brasileira não apresenta monografia para esse fármaco.¹⁷ Sendo assim, o objetivo desse trabalho foi desenvolver e validar um novo método analítico por CLAE para a análise de minoxidil.

MATERIAIS E MÉTODOS

SUBSTÂNCIA QUÍMICA DE TRABALHO (SQT) E AMOSTRA

A SQT foi adquirida em quantidade suficiente e procedente do mesmo estabelecimento da amostra de minoxidil utilizada para validação do método (GEMINI Indústria de Insumos Farmacêuticos Ltda.). A matéria-prima de minoxidil utilizada nesse trabalho apresentou pureza declarada de 99,43%.

A amostra utilizada no desenvolvimento e validação de metodologia analítica foi adquirida no comércio da cidade de Porto Alegre, em farmácia de manipulação. Os componentes presentes na formulação são minoxidil 5%, etanol 70% e 3% de propilenoglicol.

EQUIPAMENTOS

Os experimentos foram realizados em cromatógrafo líquido (Agilent 1200 series, Santa Clara, EUA), equipado com bomba quaternária G1311A, degaseificador G1322A, compartimento termostaticado da coluna G1316A, injetor automático G1329A e detector de arranjo de fotodiodos G1315B.

O potenciômetro Digimed, modelo DM-20 (São Paulo, Brasil), foi usado para determinar o pH das soluções. A fase móvel foi filtrada utilizando-se Filtro Sartorius®

de 0,45 μm (Goettingen, Alemanha), e para filtrar o padrão e as amostras antes das análises foi utilizada membrana de 0,45 μm (Vertical®, Bangkok, Tailândia).

REAGENTES

Os reagentes utilizados foram: acetonitrila (Tedia®), ácido ortofosfórico (Merck®), água ultra pura (Millipore System), metanol (Tedia®), tampão fosfato de potássio monobásico (Synth®) e trietilamina (Merck®).

Ácido clorídrico (HCl) e hidróxido de sódio (NaOH), utilizados nas degradações, foram preparados de acordo com a Farmacopeia Brasileira 5ª edição e o tampão fosfato de potássio (pH 8,0) foi preparado conforme a Farmacopeia Americana.^{17,12}

DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODO ANALÍTICO

CONDIÇÕES CROMATOGRÁFICAS

O desenvolvimento do método analítico envolve a otimização de vários estágios como a preparação da amostra, a separação cromatográfica e a quantificação. Parâmetros como a fase móvel, a vazão, a coluna cromatográfica e o comprimento de onda de detecção devem ser pré-estabelecidos com critério.¹⁹

Depois de vários testes utilizando tampões mais simples, e com menor risco potencial à saúde, as condições cromatográficas otimizadas estão abaixo relacionadas (Tabela 1).

VALIDAÇÃO DE METODOLOGIA

Em nosso estudo, objetivou-se o desenvolvimento e validação de metodologia para a determinação do princípio ativo em produtos farmacêuticos. Dessa forma, os testes para essa determinação são classificados como pertencentes à categoria I da RE 899 de 2003. Nessa situação, os parâmetros que devem ser medidos para a validação de um método analítico são: especificidade, linearidade, intervalo, precisão (repetibilidade), exatidão e robustez.^{12, 18, 20}

Especificidade

Avaliação da especificidade do método frente à amostra simulada dos excipientes.

A solução de minoxidil foi avaliada frente à solução placebo, que contém os excipientes da formulação na concentração aproximada da utilizada na especialidade farmacêutica. A SQT foi preparada na concentração de 1,0 mg/mL em metanol. A partir dessa solução, foi realizada diluição em fase móvel obtendo-se a concentração final de 10 µg/mL.

A solução da amostra simulada dos excipientes foi preparada da mesma maneira que a solução SQT pesando-se, contudo, o equivalente à mistura dos excipientes contidos na solução contendo 5% de Minoxidil. Preparou-se, portanto, solução de propilenoglicol 3% em etanol 70%. A partir desta, realizou-se a diluição em fase móvel para análise. As soluções obtidas foram avaliadas quanto aos seus perfis cromatográficos.

Avaliação da especificidade do método frente à degradação forçada

A estabilidade da solução de Minoxidil foi avaliada frente a possíveis degradações em meio ácido, básico, na presença de peróxido de hidrogênio, luz e calor.

- *Hidrólise ácida*: exposição da solução amostra (1,0 mg/mL) à solução de ácido clorídrico (HCl 2 M) durante 3 dias.
- *Hidrólise básica*: exposição da solução amostra (1,0 mg/mL) à solução de hidróxido de sódio (NaOH 2 M) durante 3 dias.
- *Oxidação*: a degradação oxidativa do Minoxidil foi avaliada na presença de peróxido de hidrogênio 3% adicionada à solução de Minoxidil 1,0 mg/mL, durante 3 dias.
- *Fotólise*: para analisar a influência da luz sobre o produto farmacêutico, preparou-se solução contendo 1,0 mg/mL da SQR em cubetas de plástico que foram submetidas à luz UVA e UVC por até 12 horas.
- *Degradação térmica*: para avaliar a estabilidade térmica, uma solução 1,0 mg/mL de minoxidil foi mantida a 60 °C por aproximadamente 4 dias.

A especificidade do método foi determinada a partir da avaliação das áreas dos picos, interferência dos excipientes e a formação de produto de degradação. Nos tempos de coleta, alíquotas das amostras foram retiradas, neutralizadas quando necessário e diluídas em fase móvel na concentração de trabalho. Todas as amostras foram filtradas em membranas de 0,45 µm e posteriormente injetadas no CLAE.

Linearidade

Foi preparada solução 1,0 mg/mL da SQT em metanol. A partir desta, foram retiradas alíquotas para obtenção de concentrações finais de 2, 5, 10, 20 e 50

$\mu\text{g/mL}$. Os balões volumétricos foram completados com fase móvel e seu conteúdo filtrado por membrana de $0,45\ \mu\text{m}$. A linearidade foi avaliada a partir da construção de curvas padrões em 3 dias diferentes. A avaliação da linearidade foi realizada pela análise de regressão linear, calculada pelo método dos mínimos quadrados e validada pela Análise da Variância (ANOVA).

Precisão

A partir de solução contendo $1,0\ \text{mg/mL}$ de amostra de minoxidil em metanol, foram retiradas 6 alíquotas de $1,0\ \text{mL}$ cada e transferidas para balões volumétricos. Os balões foram completados com fase móvel, de modo que a concentração final das amostras foi de $10,0\ \mu\text{g/mL}$. A precisão foi avaliada a partir da repetibilidade e da precisão intermediária, utilizando-se o Desvio Padrão Relativo (DPR) dos resultados.

Exatidão

A exatidão do método foi avaliada a partir de nove determinações contemplando o intervalo linear do procedimento, ou seja, três níveis de concentrações, baixa, média e alta, em triplicata.¹⁸

Para esta análise, avaliada pelo teste de recuperação, foram adicionados volumes crescentes da SQT ($1,0\ \text{mg/mL}$) a uma solução que já continha $10\ \mu\text{g/mL}$ de amostra. A exatidão foi avaliada a partir da triplicata de três soluções diferentes contendo 30 , 40 e $50\ \mu\text{g/mL}$ de minoxidil.

Robustez

De acordo com a Tabela 2, a robustez foi avaliada através da suscetibilidade do método proposto após pequenas alterações nas condições cromatográficas.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

CONDIÇÕES CROMATOGRÁFICAS

Inicialmente, foram realizadas pesquisas bibliográficas para a obtenção de informações sobre métodos já desenvolvidos. Trabalhos anteriores relataram a utilização de comprimentos de onda de 231 nm, 254 nm, 281 nm, 282 nm, entre outros. Para definição do comprimento de onda de análise, foi realizada uma varredura na região do ultravioleta, obtidos pelo software do equipamento (Figura 2).

A partir do espectro obtido, foram monitorados em CLAE, durante o desenvolvimento do método, os comprimentos de onda de absorção em 230 nm, 268 nm e 286 nm. Em todos os comprimentos de onda selecionados, os picos cromatográficos observados para o minoxidil apresentaram-se com pureza superior a 99%.

Alguns fatores como composição da fase móvel, pH, vazão da fase móvel e concentração da SQT foram exaustivamente analisados através de testes com diversas condições de análise. Para definição do método foram analisados os parâmetros de adequabilidade do sistema, como nº de pratos teóricos, fator de capacidade, tempo de retenção e assimetria do pico.

O comprimento de onda de 286 nm, por ser mais elevado e apresentar menos possíveis interferentes, foi escolhido para análise do minoxidil, no presente trabalho.

A maioria dos trabalhos encontrados na literatura, assim como as farmacopeias já citadas, apresentam métodos de análise do minoxidil por CLAE utilizando colunas cromatográficas C18 e reagentes de alta toxicidade, como por exemplo, o docusato de sódio e/ou o THF.^{13,14} Além do risco que esses reagentes oferecem aos manipuladores, é necessário um cuidado especial quanto ao seu descarte no ambiente. O método desenvolvido neste trabalho utilizou reagentes de menor toxicidade, basicamente tampão fosfato de potássio e acetonitrila, o que diminui os problemas relacionados à sua execução e o descarte correto dos resíduos, após as análises. Além disso, esta metodologia apresenta uma nova alternativa na análise do fármaco utilizando coluna cromatográfica com grupamento fenil, permitindo aumento da polaridade e maior interação com o analito.

VALIDAÇÃO DO MÉTODO ANALÍTICO

Especificidade

A especificidade do método cromatográfico foi avaliada através da comparação dos cromatogramas obtidos pelas injeções das soluções amostra e simulada, o que permite avaliar a possível interferência dos excipientes e amostra degradada na determinação de minoxidil em solução.

A Figura 3 apresenta os cromatogramas obtidos, por CLAE, da solução minoxidil SQT (10 µg/mL) e da amostra simulada dos excipientes. É possível observar que o método apresenta especificidade, já que não sofre influência dos excipientes junto ao sinal do fármaco.

A especificidade do método foi realizada também para a amostra submetida às condições de estresse, na presença de ácido, base, peróxido de hidrogênio, luz e

temperatura. Os cromatogramas obtidos após análise por CLAE estão representados na Figura 4.

Em todas as condições de degradação foram avaliados o surgimento de novos picos, pureza do pico do minoxidil e porcentagem de redução do teor do fármaco. As degradações ácida, térmica e oxidativa apresentaram redução no teor do fármaco de 22,90%, 20,72% e 6,91%, respectivamente. As demais degradações não causaram redução no teor do fármaco. Nenhum cromatograma indicou surgimento de novo pico e o minoxidil apresentou uma pureza de pico superior à 99%, confirmada pela ferramenta presente no software do equipamento. Portanto, o método apresentou-se específico para análise de minoxidil em solução.

Linearidade

A linearidade foi avaliada a partir da construção de três curvas padrão construídas em dias diferentes. Gráficos de concentração *versus* área foram plotados e apresentaram linearidade na faixa de concentração de 2 – 50 µg/mL, com coeficiente de correlação igual a 1, e equação da reta $y = 61,597x - 27,306$, onde x corresponde à concentração e y corresponde à área (Figura 5). A análise da variância (ANOVA) efetuada sobre os valores das áreas das curvas de calibração apresentaram regressão linear significativa, sem desvio da linearidade ($p < 0,05$).

Precisão

A precisão foi verificada pela repetibilidade e pela precisão intermediária. Os resultados obtidos estão representados na Tabela 3. Os valores de DPR encontrados foram inferiores a 5%, indicando que o método é preciso.¹⁸

A precisão do método foi avaliada em três diferentes dias, nos quais foram realizadas seis determinações das amostras preparadas individualmente para cada dia. Segundo os resultados de DPR pode-se concluir que o método apresenta repetibilidade e precisão intermediária adequadas e em conformidade às normativas de validação analítica.¹⁸

Exatidão

Os percentuais de recuperação obtidos a partir do teste de recuperação do minoxidil SQT encontram-se na Tabela 4. Os elevados percentuais de recuperação, próximos 100%, indicam a exatidão do método proposto.

A Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) recomenda que o desvio padrão relativo não exceda 5%. Assim, os valores encontrados atendem aos limites estabelecidos.

Robustez

A robustez de um método analítico é a medida de sua capacidade em resistir a pequenas e deliberadas variações dos parâmetros analíticos. Indica sua confiança durante o uso normal. A partir das variações realizadas, foram analisados alguns parâmetros de adequabilidade do sistema, sendo eles: número de pratos teóricos, tempo de retenção, área do pico, fator capacidade e fator cauda. Os resultados obtidos estão expostos na Figura 6, a partir dos Gráficos de Pareto gerados pelo programa estatístico Minitab®.

Segundo os Gráficos de Pareto obtidos é possível evidenciar que a proporção da fase móvel é o parâmetro que mais influencia no método cromatográfico, no

entanto, não é capaz de influenciar com significância a área do pico, o que determina a confiabilidade dos resultados analíticos.

CONCLUSÃO

O presente trabalho apresentou o desenvolvimento e validação de novo método indicativo de estabilidade do fármaco minoxidil por CLAE, utilizando-se uma coluna cromatográfica fenil de 25 cm, e fase móvel constituída de uma mistura de tampão fosfato de potássio monobásico (0,36% trietilamina) e acetonitrila (80:20). O método proposto apresentou-se específico, linear, preciso e exato, possibilitando sua aplicação na análise de rotina de amostras contendo minoxidil. A robustez do método indicou que as variações na composição da fase móvel podem refletir em alterações significativas nos parâmetros cromatográficos, porém, não alteram a análise quantitativa do fármaco.

REFERÊNCIAS

1. MULINARI-BRENNER, F. M.; SEIDEL, G.; HEPP, T. Entendendo a alopecia androgenética. **Surgical & Cosmetic Dermatology**, v.3, n.4, p. 329-37, nov. 2011.
2. TRUEB, RM.; Molecular mechanisms of androgenetic alopecia. **Experimental Gerontology**, v. 37, n. 8-9, p. 981-90, ago/set. 2002.
3. KRAUSE, K.; FOITZIK K.; Biology of the hair follicle: the basics. **Seminars in Cutaneous Medicine and Surgery**, v. 25, n. 1, p. 2-10, mar. 2006.

4. TSUBOI, R.; et. al.; Randomized clinical trial comparing 5% and 1% topical Minoxidil for the treatment of androgenetic alopecia in Japanese men. **J. Dermatol.**, n. 36, p. 437-446, Ago. 2009.
5. MESSENGER, A. G.; RUNDEGREN, J.; Minoxidil: mechanisms of action on hair growth. **Br. J. Dermatol.**, n. 150, p. 186-194, fev. 2004.
6. GÜMÜS, N.; et. al.; Effects of topically applied Minoxidil on the survival of rat dorsal skin flap. **Aesthetic Plastic Surgery**, n. 36, p. 1382-1386, dez. 2012.
7. SMORLESI, C.; et. al.; Topically applied Minoxidil may cause fetal malformation: A case report. **Birth defects Research. Part A, Clinical and molecular teratology**, n. 67, p. 997-1001, dez. 2003.
8. SHORTER, K.; et. al.; Human hair follicles contain two forms of ATP-sensitive potassium channels, only one of which is sensitive to Minoxidil. **The FASEB Journal**, n. 22, p. 1725-36, Jun. 2008.
9. MALAKAR, S.; DHAR S.; Leucoderma associated with the use of topical Minoxidil: A report of two cases. **Dermatol.**, n. 201, p. 183-4, 2000.
10. Bula Regaine. Disponível em <http://www.bulas.med.br/>, acesso em 05 de maio de 2013.
11. BRITISH PHARMACOPOEIA. The Stationary Office: Pharmacopoeia Commission British, 2011, p. 3018.
12. THE UNITED STATES PHARMACOPEIA. 35.ed. Rockville: United States Pharmacopoeial Convention, 2011, p. 3931.
13. GALDHANE, H. K.; et. al.; Development and Validation of stability Indicating HPLC Method for the estimation of Minoxidil and related substance in topical formulation. **J. Pharm. Res.**, n. 4, p. 4481-4484, dez. 2011.
14. ZARGHI, A. et al. HPLC determination of the tretinoin-minoxidil solution. **Pharmaceutica Acta Helvetiae**, v. 73, p.163, 1998.
15. DE ORSI, D. et al. High-performance liquid chromatography-diode array and electrospray-mass spectrometry analysis of non-allowed substances in cosmetic

products for preventing hair loss and other hormone-dependent skin diseases. **J. Pharm. Biomed. Anal.**, v. 48, n. 3, p. 641, 2008.

16. <http://www.rosler.com/>, acesso em 04 de maio de 2013.

17. FARMACOPEIA BRASILEIRA. 5.ed. Rio de Janeiro: Atheneu, 2010.

18. BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução nº 899, 29 de maio de 2003. Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Brasília, 2003.

19. CAUSON 1997)(CAUSON, R. Validation of chromatographic methods in biomedical analysis; viewpoint and discution. **J. Chromatogr. B: Biomed. Sci. Appl.**, Amsterdam, v. 689, n.1, p.175-180, 1997.

20. ICH -International Conference on Harmonisation of technical requirements for registration of pharmaceuticals for human use: Guideline on validation of analytical procedure: Text and Methodology Q2(R1), 2005.

FIGURAS E TABELAS

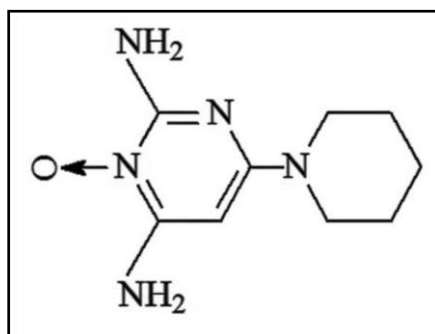


Figura 1. Estrutura química do minoxidil.

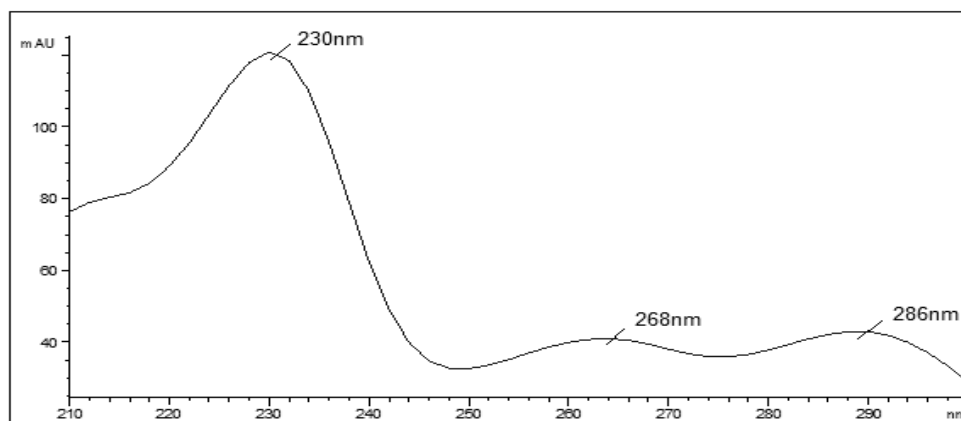


Figura 2 - Espectro de absorção obtido a partir de solução de minoxidil SQT 10 $\mu\text{g/mL}$ em CLAE.

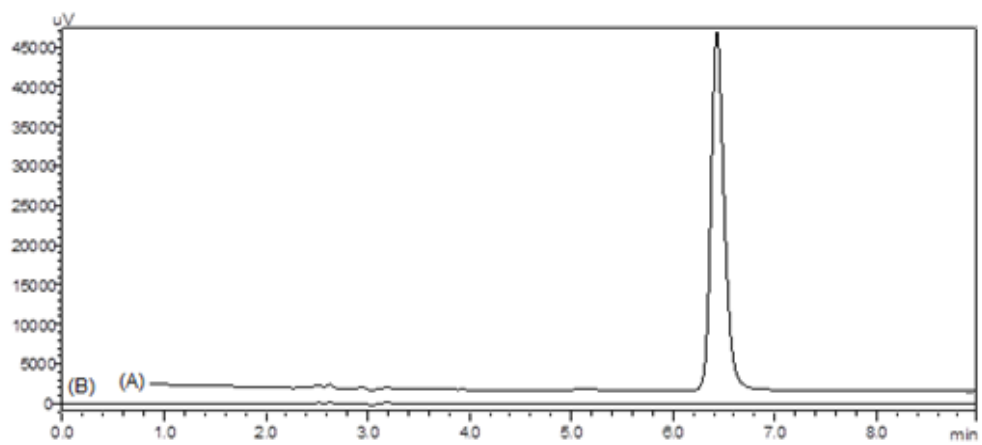


Figura 3 - Sobreposição dos cromatogramas obtido através da análise por CLAE das soluções de minoxidil SQT (A) e da solução da amostra simulada dos excipientes (B). Condições cromatográficas definidas na Tabela 1.

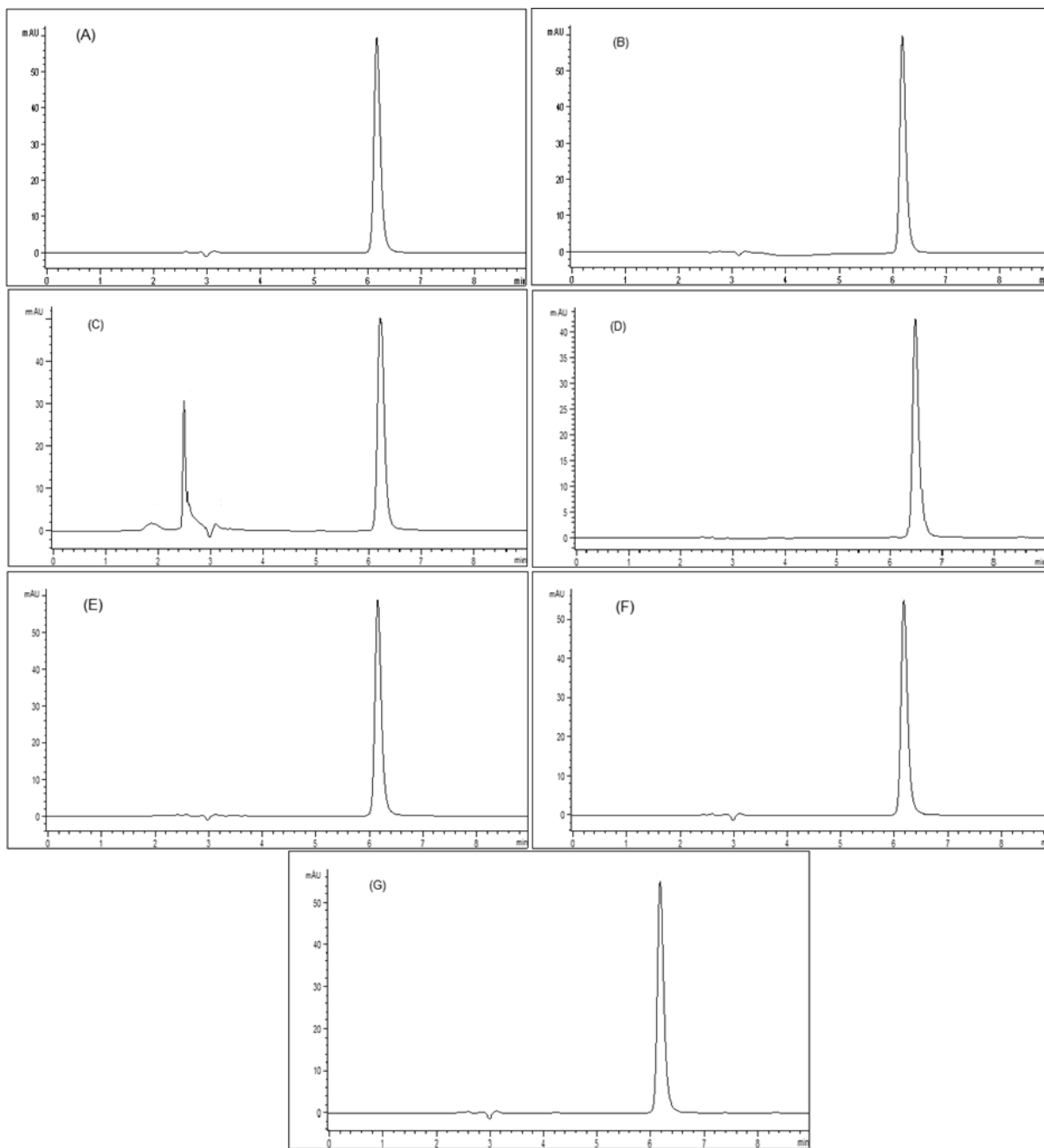


Figura 4 - Cromatogramas obtidos após submissão da amostra às condições de degradação ácida por 3 dias (A), básica por 3 dias (B), em presença de peróxido de hidrogênio por 4 dias (C), à 60 °C por 4 dias (D), radiação UVA por 12 horas (E), radiação UVC por 12 horas (F) e sem degradação (G).

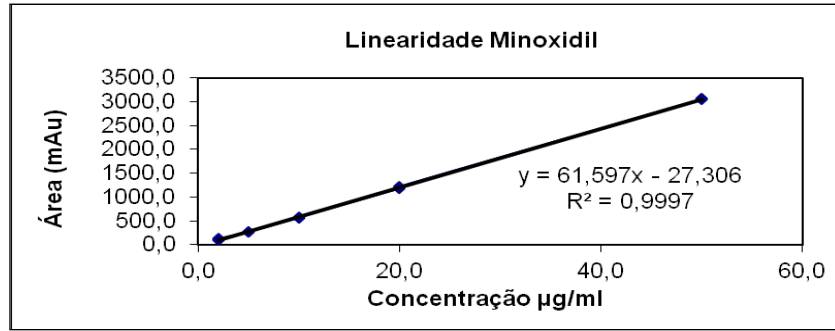


Figura 5 - Gráfico da média das curvas padrão, área *versus* concentração.

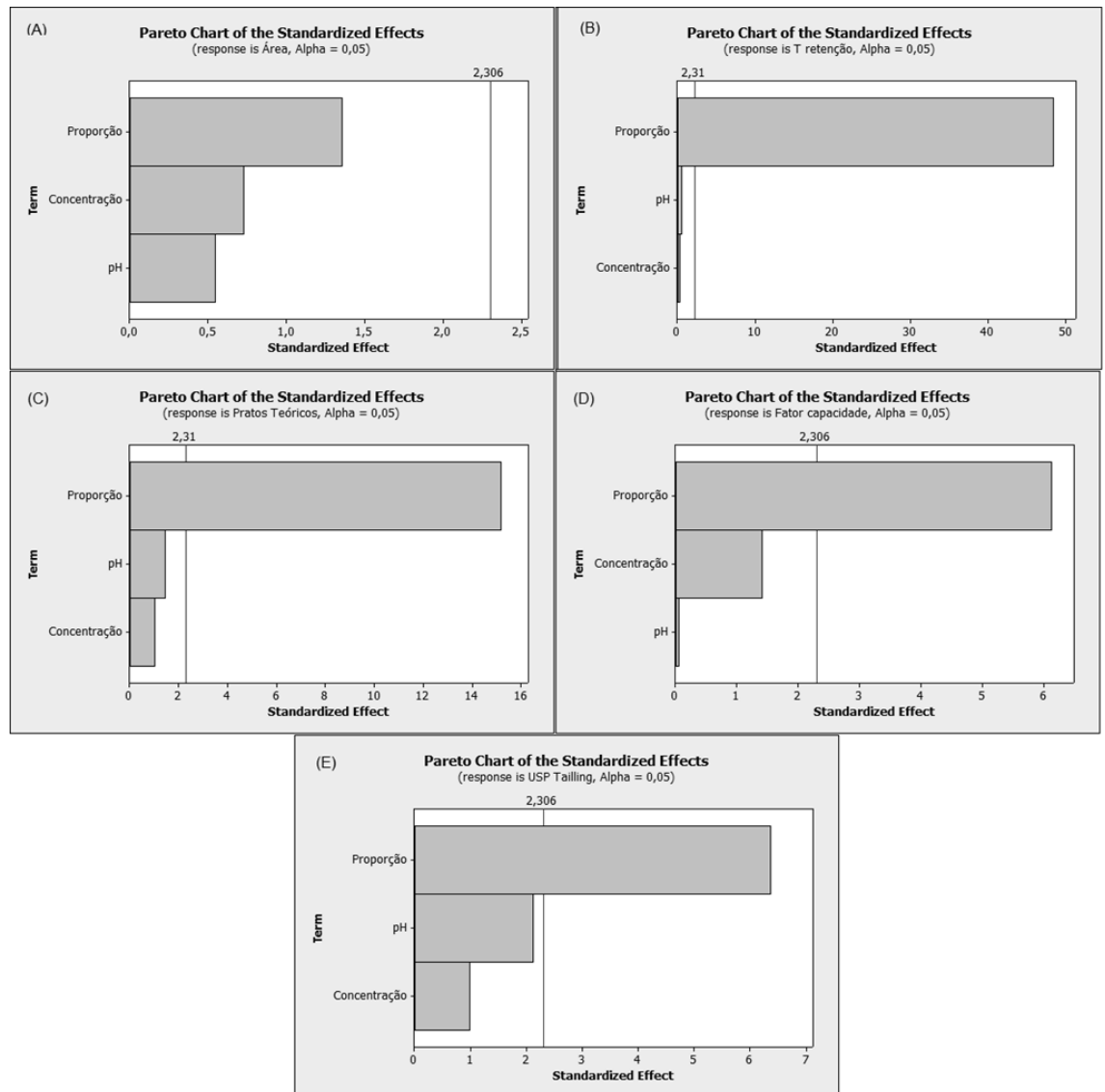


Figura 6 - Resultados obtidos para análise da Robustez após variações nas condições do método e análise pelo programa estatístico Minitab®. Os parâmetros de adequabilidade do sistema: área (A), tempo de retenção (B), nº pratos teóricos (C), fator capacidade (D) e fator cauda (E), foram analisados.

TABELAS

Tabela 1. Condições cromatográficas para determinação de minoxidil em solução.

Equipamento	Agilent 1200 series, Santa Clara, EUA, com detector de arranjo de fotodiodos G1315B
Coluna	Fenil 25cm (Bridge 4,6X250mm)
Fase móvel	Acetonitrila : Tampão fosfato de potássio 25mM pH 8,0 com 0,36% de Trietilamina (20:80)
Fluxo	1,1 mL/min
Comprimento de onda	286 nm
Volume de injeção	20 µL
Temperatura	25 °C
Concentração de trabalho do Minoxidil	10 µg/mL

Tabela 2. Alterações nas condições de análise por CLAE para verificação da robustez do método.

Condições padronizadas de análise	Modificações avaliadas
	Proporções da fase móvel *
80:20 (v/v)	78:22 (v/v) e 82:18 (v/v)
	pH da fase móvel **
8,0	7,8 e 8,2
	Concentração de tampão
25mM	23 mM e 27 mM

* Composição da fase móvel: Tampão fosfato de potássio (0,36% Trietilamina): Acetonitrila.

** Valor do pH ajustado com Trietilamina e HCl 2M.

Tabela 3 - Apresentação dos valores experimentais obtidos a partir da determinação de Minoxidil por CLAE para análise da precisão.

	Repetibilidade			Precisão intermediária
	Teor (%) das soluções de minoxidil 10 µg/mL.			
	Dia 1	Dia 2	Dia 3	
Média	110,99	107,35	112,44	110,26
DPR (%)	0,35	0,41	0,45	2,38

Tabela 4 - Resultados do teste de recuperação por CLAE.

	Concentração (µg/mL)		Recuperação (%)	Média (%)	DPR (%)
	Adicionada	Recuperada			
R1	20	19,75	98,74	98,68	0,06
R2	30	29,61	98,70		
R3	40	39,45	98,62		

2. ANEXO

Revista Química Nova - NORMAS DE PUBLICAÇÃO

GERAL - Serão considerados para publicação na Revista Química Nova manuscritos em Português, Inglês e Espanhol, que cubram as áreas tradicionais da Química bem como artigos sobre Ensino de Química, História da Química, Política Científica, etc, além de artigos de áreas afins, desde que tenham acentuado conteúdo químico. Os trabalhos devem se encaixar dentro de uma das modalidades abaixo:

Artigos Originais: refere-se a trabalhos inéditos de pesquisa. Devem seguir a forma usual de apresentação, contendo Introdução, Resultados e Discussão, Parte Experimental etc, de acordo com as peculiaridades de cada trabalho. Deverão ter no máximo 25 páginas, incluindo figuras, tabelas, esquemas, etc e todas as páginas deverão ser numeradas.

Artigos de Revisão: destinados à apresentação do progresso em uma área específica de Química, com o objetivo de dar uma visão crítica do estado da arte do ponto de vista do especialista altamente qualificado e experiente. Deverão ter no máximo 40 páginas, incluindo figuras, tabelas, esquemas, etc e todas as páginas deverão ser numeradas.

É imprescindível que, na referida área, o autor tenha publicações que comprovem a sua experiência e qualificação. Antes do envio do manuscrito, o autor deverá submeter à editoria, por e-mail, um resumo da revisão pretendida e lista de publicações, acompanhados de uma carta explicativa da pertinência do trabalho. O material será analisado pelos Editores e, uma vez aprovado, será solicitado ao autor

o envio do manuscrito completo, dentro das normas de QN, e só então será dado início ao processo de avaliação pelos assessores.

O Corpo Editorial de QN poderá, eventualmente, convidar pesquisadores qualificados para submeter artigo de revisão.

Artigos sobre Educação: trabalhos de pesquisas relacionadas ao ensino de Química e divulgação de experiências inovadoras no ensino de graduação e pós-graduação. Deverão ter no máximo 25 páginas, incluindo figuras, tabelas, esquemas, etc e todas as páginas deverão ser numeradas.

Notas Técnicas: trabalhos de comunicação de métodos, validação de métodos, técnicas, aparelhagens ou acessórios desenvolvidos no laboratório de origem do autor do manuscrito. Deverão ter no máximo 25 páginas, incluindo figuras, tabelas, esquemas, etc e todas as páginas deverão ser numeradas.

Assuntos Gerais: abordagem de assuntos de interesse geral dos químicos, tais como política científica, programas de graduação e pós-graduação, história da química. etc. Deverão ter no máximo 40 páginas, incluindo figuras, tabelas, esquemas etc. e todas as páginas deverão ser numeradas.

PREPARAÇÃO DE MANUSCRITOS - Todos os trabalhos deverão ser digitados em espaço duplo, utilizando somente Microsoft Word. A seguir, deve ser gerado um único arquivo no formato *.pdf*, do trabalho todo, para ser submetido através do sistema *on line de QN*. A revista não aceita a submissão de trabalhos por outra forma.

A primeira página deverá conter o título do trabalho, nome e endereço dos autores. Havendo autores com diferentes endereços, estes deverão vir imediatamente após o nome de cada autor. Os autores deverão ser agrupados por endereço. O autor para correspondência, que deverá ser o mesmo que submete o artigo *on line*, deverá ser indicado com asterisco (*) e seu e-mail colocado no rodapé da página (um só e-mail).

A segunda página deverá conter o título e o resumo do trabalho em inglês (abstract), com no máximo 100 (cem) palavras, e a indicação de 3 palavras-chave (keywords), também em inglês.

As figuras (incluindo gráficos, esquemas, etc) deverão ser em número máximo de 7 figuras simples e ter qualidade gráfica adequada (usar somente fundo branco). Para número maior ver o item Material Suplementar. As figuras, tabelas, esquemas, etc deverão ser colocadas após as referências e devidamente identificadas pelo respectivo número. Se escaneadas, deverão ser em alta resolução (*800 dpi/bitmap para traços*). No caso particular de esquemas contendo estruturas químicas, estas deverão ter sempre a mesma dimensão, para que possam ser reduzidas uniformemente, além de boa qualidade gráfica. Considerar que as figuras deverão ter largura máxima de uma coluna (8,5 cm).

Figuras coloridas terão custo de publicação repassado aos autores, quando da publicação. Esse valor só poderá ser informado aos autores quando o trabalho estiver previsto para ser publicado, ocasião em que a gráfica fornece o orçamento. A publicação de figuras coloridas na versão online é isenta de custos.

Para figuras, gráficos, esquemas, tabelas, etc idênticos aos já publicados anteriormente na literatura, os autores deverão pedir permissão para publicação junto à empresa/sociedade científica que detenha os direitos autorais e enviá-la à editoria de QN junto com a versão final do manuscrito.

As referências deverão ser numeradas consecutivamente no texto, na forma de expoentes, após a pontuação (se houver). A lista de referências deverá ser colocada no final do texto. As legendas das figuras, gráficos e esquemas deverão ser colocadas em uma única folha à parte, separadas das figuras. A seguir, deverão ser colocadas as figuras, os gráficos, os esquemas, as tabelas e os quadros. Colocar os títulos acima de cada tabela. No texto, deverá ser indicada apenas a inserção de cada um(a).

Referências

Revistas:

Será utilizada a abreviatura da revista como definida no Chemical Abstracts Service Source Index (ver <http://www.cas.org/content/references/corejournals>). Caso a abreviatura autorizada de uma determinada revista não puder ser localizada e não for óbvio como o título deve ser abreviado, deve-se citar o título completo.

1. Varma, R. S.; Singh, A. P.; *J. Indian Chem. Soc.* **1990**, 67, 518.

2. No caso especial da revista citada não ser de fácil acesso, é recomendado citar o seu número de Chemical Abstract, como segue:

Provstyanoi, M. V.; Logachev, E. V.; Kochergin, P. M.; Beilis, Y. I.; *Izv. Vyssh. Uchebn. Zadev.; Khim. Khim. Tekhnol.* **1976**, 19, 708. (CA 85:78051s).

3. Caso o trabalho tenha doi, mas não a referência completa, citar doi da seguinte maneira:

Vidotti, M.; Silva, M. R.; Salvador, R. P.; de Torresi, S. I. C.; Dall'Antonia, L. H.; *Electrochimica Acta* (2007), doi:10.1016/j.electacta.2007.11.029.

É recomendado o uso de referências compostas na medida do possível, em lugar de uma lista de referências individuais. O estilo das referências compostas é o seguinte:

4. Varela, H.; Torresi, R. M.; *J. Electrochem. Soc.* **2000**, *147*, 665; Lemos, T. L. G.; Andrade, C. H. S.; Guimarães, A. M.; Wolter-Filho, W.; Braz-Filho, R.; *J. Braz. Chem. Soc.* **1996**, *7*, 123; Ângelo, A. C. D.; de Souza, A.; Morgon, N. H.; Sambrano, J. R.; *Quim. Nova* **2001**, *24*, 473.

Patentes:

Devem ser identificadas da seguinte forma (na medida do possível o número do Chemical Abstracts deve ser informado entre parênteses).

5. Hashiba, I.; Ando, Y.; Kawakami, I.; Sakota, R.; Nagano, K.; Mori, T.; *Jpn. Kokai Tokkyo Koho 79 73,771* **1979**. (CA 91:P193174v)

6. Kadin, S.B.; *US pat. 4,730,004* **1988**. (CA 110:P23729y)

7. Eberlin, M. N.; Mendes, M. A.; Sparrapan, R.; Kotiaho, T. *Br PI 9.604.468-3*, **1999**.

Livros:

com editor(es):

8. Regitz, M. Em *Multiple Bonds and Low Coordination in Phosphorus Chemistry*; Regitz, M.; Scherer, O. J., eds.; Georg Thieme Verlag: Stuttgart, 1990, cap. 2.

sem editor(es):

9. Cotton, F.A.; Wilkinson, G.; *Advanced Inorganic Chemistry*, 5th ed., Wiley: New York, 1988.

Programas de computação (Softwares):

10. Sheldrick, G. M.; *SHELXL-93; Program for Crystal Structure Refinement*; Universidade de Göttingen, Alemanha, 1993.

Teses:

11. Velandia, J. R.; *Tese de Doutorado*, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Brasil, 1997.

Material apresentado em Congressos:

12. Ferreira, A. B; Brito, S. L.; *Resumos da 20^a Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química*, Poços de Caldas, Brasil, 1998.

Páginas Internet:

<http://www.s bq.org.br/jbcs>, acessada em Junho 2001.

Material não publicado:

Para material aceito para publicação: Magalhães, U. H.; *J. Braz. Chem. Soc.*, no prelo. Para material submetido mas ainda não aceito: Magalhães, U. H.; *J. Braz.*

Chem. Soc., submetido. Para trabalho não publicado ou comunicação pessoal: Magalhães, U. H.; trabalho não publicado ou Magalhães, U. H., comunicação pessoal. Os resultados não publicados só poderão ser citados com a permissão explícita das pessoas envolvidas na sua obtenção.

Os autores devem procurar seguir, naquilo que for possível, as normas recomendadas pela IUPAC, inclusive o Sistema Internacional de Unidades. Sobre a nomenclatura de compostos (orgânicos e inorgânicos) já há traduções para a língua portuguesa publicadas em QN. Quanto aos Símbolos e Terminologias, onde não há tradução, espera-se que adaptação seja feita pelos autores, criando então, paulatinamente, um conjunto de normas em português.

SUBMISSÃO DOS ARTIGOS – A QN oferece aos autores a submissão *on line*, que pode ser acessada através do registro de Login e Senha. É possível registrar-se em nossa home page (<http://quimicanova.sbg.org.br>) usando a opção Novo Usuário. Após estar cadastrado no sistema, o autor pode facilmente seguir as instruções fornecidas na tela. Será solicitada a submissão de um único arquivo do manuscrito completo, em formato .pdf. Está disponível uma ferramenta para gerar o arquivo .pdf, a partir de arquivo .doc ou .rtf, com envio automático para o e-mail do autor. Tão logo seja completada a submissão, o sistema informará automaticamente, por e-mail, o código temporário de referência do manuscrito, até que este seja verificado pela editoria. Então será enviado e-mail com o número de referência do trabalho.

Se não for recebido o e-mail com código de submissão temporária, por algum motivo, a submissão não foi completada e o autor terá prazo máximo de 5 (cinco) dias para completá-la. Depois desse prazo, o sistema não permite o envio, devendo ser feita nova submissão.

O autor poderá acompanhar, diretamente através do sistema, a situação de seu manuscrito.

Ao fazer a submissão, solicita-se uma carta de apresentação, que deverá ser digitada no local indicado, sendo obrigatória a apresentação dos e-mails de todos os autores. Além disso, devem ser enviados também os nomes, instituições a que pertencem e e-mails de três ou quatro possíveis assessores, que não podem pertencer à(s) mesma(s) instituição(ões) dos autores.

Material Suplementar – Esta modalidade foi criada para que na versão impressa da revista apareça o número estritamente necessário de figuras e tabelas (6 a 7 figuras simples). Ressalta-se que, como este material ficará disponível apenas na versão *on line*, figuras, tabelas e ilustrações coloridas apresentadas na forma de material suplementar não terão custo repassado aos autores, nem limite de páginas. Porém, devem ter boa qualidade gráfica.

O material suplementar deverá ser colocado no final do trabalho, com indicação clara. Deverá ser submetido um único documento .pdf, incluindo o material suplementar.

Os Editores poderão solicitar aos autores, em qualquer fase da tramitação, a separação de Material Suplementar.

MANUSCRITOS REVISADOS – Manuscritos enviados aos autores para revisão deverão retornar à Editoria dentro de prazo máximo de trinta dias ou serão considerados retirados, sendo que o sistema encerra o processo, não permitindo que seja reaberto. Vencido o prazo, deverá ser feita nova submissão, dando início a um novo processo.

A submissão do manuscrito revisado deverá ser feita pelo mesmo autor, usando o Login e a Senha registrados anteriormente. O autor deve seguir as instruções fornecidas na tela, para envio do documento *.pdf* completo da versão revisada. Deve ser redigida uma carta de encaminhamento, em *pdf*, aos assessores, detalhando as alterações feitas na nova versão e justificando as alterações sugeridas nos pareceres e que não foram aceitas pelos autores. Esses dois arquivos devem ser enviados através da seção Envio de Nova Versão, na Página do Autor, no sistema de submissão *on line* de QN.

Tão logo seja completada a submissão o sistema informará automaticamente, por e-mail, o código temporário de referência do manuscrito, até que ele seja verificado pela editoria. Então será enviado e-mail contendo o número de referência do trabalho.

Se não receber o e-mail com código de submissão temporária, por algum motivo, a submissão não foi completada e o autor terá prazo máximo de 5 (cinco) dias para completá-la. Depois desse prazo, o sistema não permite o envio, devendo ser feita nova submissão.

O autor poderá acompanhar, diretamente através do sistema, o status de seu manuscrito.

VERSÃO FINAL – Quando for solicitada a versão final, o autor receberá instruções específicas quanto a programas para envio de arquivos (texto, figuras, tabelas, etc) . Arquivos em formato *.pdf* não são mais solicitados nessa fase.

Se as Figuras forem escaneadas, deverão ser em alta resolução (800 dpi/bitmap para traços) com extensão *tif* ou *jpg*, desde que nas dimensões especificadas pelos

Editores. As fotos ou desenhos com cor (300 dpi/grayscale) deverão ser enviadas com extensão *tif/jpg*, com largura máxima total de 8,5 cm para não haver problemas ao aplicá-las no padrão da Revista. Outras extensões possíveis: *cdr, eps, cdx ou opj*. No caso particular de esquemas contendo estruturas químicas, estas deverão ter sempre a mesma dimensão, para que possam ser reduzidas uniformemente.

A Editoria de QN reserva-se o direito de efetuar, quando necessário, pequenas alterações nos manuscritos, de modo a adequá-los às normas da revista ou tornar seu estilo mais claro, respeitando, naturalmente, o conteúdo do trabalho. Qualquer que seja a natureza do manuscrito submetido, ele deve ser original em nível de metodologia, informação, interpretação ou crítica. A qualificação do trabalho será atestada por dois consultores, indicados pela Editoria.

Copyright ©2012 Sociedade Brasileira de Química

Para publicação, requer-se que os manuscritos submetidos a esta revista não tenham sido publicados anteriormente e não sejam submetidos ou publicados simultaneamente em outro periódico. Ao submeter o manuscrito, os autores concordam que o copyright de seu artigo seja transferido à Sociedade Brasileira de Química (SBQ), se e quando o artigo for aceito para publicação. O copyright abrange direitos exclusivos de reprodução e distribuição dos artigos, inclusive separatas, reproduções fotográficas, microfilmes ou quaisquer outras reproduções de natureza similar, inclusive traduções. Nenhuma parte desta publicação pode ser reproduzida, armazenada em bancos de dados ou transmitida sob qualquer forma ou meio, seja eletrônico, eletrostático, mecânico, por fotocópia, gravação, mídia magnética ou algum outro modo, sem permissão por escrito da detentora do copyright. Embora todo esforço seja feito pela SBQ, Editores e Conselho Editorial

para garantir que nenhum dado, opinião ou afirmativa errada ou enganosa apareçam nesta revista, deixa-se claro que o conteúdo dos artigos e propagandas aqui publicados são de responsabilidade, única e exclusiva, dos respectivos autores e anunciantes envolvidos. Conseqüentemente, a SBQ, o Conselho Editorial, os Editores e respectivos funcionários, diretores e agentes isentam-se, totalmente, de qualquer responsabilidade pelas conseqüências de quaisquer tais dados, opiniões ou afirmativas erradas ou enganosas.