

Universidade de Brasília
Faculdade de Ciências da Saúde

Bruna Caroline Cardoso Pinheiro

AVALIAÇÃO DA PERMEAÇÃO CUTÂNEA *IN VITRO* DO MINOXIDIL
A PARTIR DE DIFERENTES FORMULAÇÕES FARMACÊUTICAS

Brasília

2017

Universidade de Brasília
Faculdade de Ciências da Saúde

AVALIAÇÃO DA PERMEAÇÃO CUTÂNEA *IN VITRO* DO MINOXIDIL
A PARTIR DE DIFERENTES FORMULAÇÕES FARMACÊUTICAS

Orientanda: Bruna Caroline C. Pinheiro

Matrícula: 12/0008297

Orientador: Prof. Dr. Guilherme M. Gelfuso

Co-orientadora: Msc Thaiene Avila Reis

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado à Universidade de Brasília
como requisito parcial para obtenção de
grau Farmacêutico.

Brasília

2017

FOLHA DE APROVAÇÃO

Bruna Caroline Cardoso Pinheiro

Avaliação da permeação cutânea *in vitro* do minoxidil a partir de diferentes formulações farmacêuticas

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à Universidade de Brasília como requisito parcial para obtenção de grau Farmacêutico.



Prof. Dr. Guilherme Martins Gelfuso (Presidente)

Universidade de Brasília

AGRADECIMENTOS

À Deus em primeiro lugar, por abençoar o meu caminho, me proteger e ouvir minhas orações.

À minha mãe Florenice, pelo amor que dedicou a mim e principalmente pelo incentivo que me deu para que eu chegasse até aqui.

Ao meu pai Carlos, por todo o apoio que me ofereceu e pelos preciosos conselhos.

À Universidade de Brasília, por ter me recebido e me proporcionado tantas oportunidades enriquecedoras.

Aos meus professores, sem eles nada seria possível e serei eternamente grata.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Guilherme Gelfuso, pela oportunidade e por sua atenção comigo.

À minha co-orientadora, Thaiene Avila, por ter me ajudado sempre com muita paciência e carinho, e por todo conhecimento e crescimento que me proporcionou.

Aos colegas do Laboratório de Tecnologia de Medicamentos, Alimentos e Cosméticos (LTMAC), que me receberam bem e sempre estiveram dispostos em ajudar e tirar dúvidas.

Ao Ismael, por todo carinho, incentivo e apoio que me oferece.

Aos meus colegas de curso e em especial às minhas amigas Fernanda e Viviane.

Por fim, agradeço a todos que contribuíram de alguma forma para a realização deste trabalho.

RESUMO

A alopecia androgênica (AAG) é uma doença que promove alterações no ciclo folicular e gera como consequência clínica a perda de cabelo em homens e mulheres. A terapia tópica com formulações a base de minoxidil em solução a 2% ou 5% é amplamente utilizada para o tratamento da AAG. Para medicamentos de uso tópico, o perfil de permeação está diretamente associado à eficácia do tratamento. Esse estudo comparou, por meio de ensaios de permeação cutânea *in vitro*, as formulações Aloxidil[®], Regaine[®], Kirkland[®] e uma quarta formulação manipulada com o objetivo constatar a qualidade das formulações à base de minoxidil presentes no mercado. Os estudos de permeação foram conduzidos *in vitro* em células de difusão vertical do tipo Franz por um período de seis horas utilizando pele de suínos. O minoxidil foi recuperado das diferentes camadas da pele (estrato córneo, epiderme e folículo piloso) e a solução receptora foi coletada para análise. O fármaco foi quantificado através de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) utilizando método sensível previamente validado. Aloxidil[®] proporcionou uma maior quantificação do minoxidil na solução receptora e também foi a formulação que menos apresentou retenção no estrato córneo ($18,13 \pm 3,73 \mu\text{g}/\text{cm}^2$). A formulação manipulada proporcionou uma ampla distribuição do fármaco pelas camadas da pele de forma geral e na solução receptora. Rogaine[®] e Kirkland[®] foram os únicos que apresentaram um perfil de permeação semelhante entre si. As formulações também foram analisadas quanto ao teor de fármaco em sua composição, para as três formulações industrializadas o valor 50 mg/mL informado nas bulas foi confirmado. Já a formulação manipulada apresentou uma concentração superior ($66,08 \pm 0,70 \text{ mg}/\text{mL}$). Os testes de permeação realizados mostraram diferentes perfis de permeação, porém o direcionamento do fármaco para o folículo piloso, local de ação do minoxidil na alopecia, foi semelhante entre três das quatro formulações testadas. Levando em consideração a ausência de mecanismos eficientes para avaliar a bioequivalência de medicamentos tópicos no Brasil e a capacidade dos estudos de permeação cutânea em elucidar o perfil de permeação de fármacos a partir de diferentes formulações, esse estudo espera ser referência para validação de estudos *in vitro* de permeação cutânea para avaliação de biodisponibilidade e bioequivalência de produtos tópicos.

Palavras-chave: Minoxidil, Permeação cutânea, Alopecia Androgênica, Bioequivalência.

ABSTRACT

Androgenic Alopecia (AA) is a disease that promotes changes in the follicular cycle and as a result the clinical consequence is a hair loss in men and women. Topical therapy with minoxidil formulations is widely used for the AA treatment and the formulations found on the market consist of 2% or 5% minoxidil solutions. The permeation profile is directly associated with the efficacy of the treatment with topical medications. This in vitro skin permeation study compared Aloxil[®], Rogaine[®], Kirkland[®] formulations and one manipulated formulation, with the purpose to evaluate the quality of minoxidil formulations on the market. The permeation studies were carried out in vitro for 6 hours, using Franz diffusion cells with porcine skin. Minoxidil was extracted from skin layers (stratum corneum, epidermis and hair follicle) and receptor solution was collected for analysis. The drug was quantified by High Performance Liquid Chromatography (HPLC) using a previously validated sensitive method. Aloxil[®] provided a greater minoxidil quantification in the receptor solution and was the formulation that resulted least retention in the stratum corneum ($18.13 \pm 3.73 \mu\text{g} / \text{cm}^2$). The manipulated formulation provided wide distribution of the drug into skin layers in general and receptor solution. Rogaine[®] and Kirkland[®] were the only ones that presented a similar permeation profile. The formulations were also analyzed for the drug level in their composition, for the three industrialized formulations the value 50 mg/mL reported in the package inserts was confirmed. The manipulated formulation had a higher concentration ($66.08 \pm 0.70 \text{ mg} / \text{mL}$). Permeation tests performed showed different permeation profiles, however the direction of the drug to the hair follicle (site of Minoxidil action in alopecia), was similar among the four formulations tested. Taking into account the absence of efficient mechanisms to evaluate the bioequivalence of topical drugs in Brazil and the ability of skin permeation studies to elucidate the permeation profile of drugs from different formulations, this study expects to be a reference for the validation of in vitro skin permeation study for evaluation of bioavailability and bioequivalence of topical products.

Keywords: Minoxidil, Skin permeation, Androgenic Alopecia, Bioequivalence.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Camadas da epiderme: camada córnea (estrato córneo), camada granulosa, camada espinhosa e camada basal.....05
- Figura 2.** Vias de permeação de fármacos pela pele: via transcelular, via intercelular e via apendicular 06
- Figura 3.** Fotografia ilustrativa do padrão típico da AAG masculina.....07
- Figura 4.** Ciclo de crescimento do pelo representando as fases de anagênese, catagênese e telogênese..... 08
- Figura 5.** Estrutura química da molécula de (A) minoxidil base e (B) minoxidil sulfato..... 09
- Figura 6.** Formulações industrializadas à base de MXB: (A) Aloxidil[®], (B) Rogaine[®], (C) Kirland[®], e (D) formulação manipulada à base de MXS..... 13
- Figura 7.** Célula de difusão do tipo Franz modificada..... 16
- Figura 8.** Peles de suínos retiradas das células Franz após o estudo de permeação *in vitro* com as formulações comerciais de minoxidil Kirkland[®] e Rogaine[®]17
- Figura 9.** (A) Sobreposição dos cromatogramas obtidos por CLAE, referentes à curva analítica para o MXB. (B) Sobreposição dos cromatogramas obtidos por CLAE, referentes à curva analítica para o MXS.....18
- Figura 10.** Representação gráfica das curvas analíticas obtidas por CLAE para o (A) MXB e para o (B) MXS.....19
- Figura 11.** Teor de minoxidil nas formulações Kirkland[®], Rogaine[®], Aloxidil[®] e manipulada..... 21

Figura 12. Quantidade de minoxidil permeada em 6h de permeação passiva, a partir das formulações Kirkland[®], Rogaine[®], Aloxidil[®] e manipulada.....
23

Figura 13. Quantidade de minoxidil retida no (A) estrato córneo (B) folículos pilosos e (C) pele remanescente a partir das formulações Kirkland[®], Rogaine[®], Aloxidil[®] e manipulada.....25

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
2. OBJETIVOS	3
3. REFERENCIAL TEÓRICO	4
3.1. Pele e vias de permeação cutânea.....	4
3.2. Alopecia	6
3.3. Tratamento para alopecia com Minoxidil.....	9
3.4. Bioequivalência e Biodisponibilidade.....	10
4. MATERIAL E MÉTODOS	12
4.1. Material	12
4.2. Formulações	12
4.3. Método analítico para o minoxidil base e minoxidil sulfato.....	13
4.4. Análise do teor e pH das formulações.....	15
4.5. Estudos <i>in vitro</i> de permeação cutânea de minoxidil em pele de suínos.....	1
4.5.1 Quantificação do minoxidil a partir do estrato córneo, da epiderme e do folículo piloso.....	16
4.6. Análise estatística dos dados.....	17
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	18
5.1. Método analítico para o minoxidil base e o minoxidil sulfato.....	18
5.2. Características físico-químicas das formulações: análise de teor e pH.....	20
5.3. Determinação da permeação cutânea <i>in vitro</i> do minoxidil a partir das formulações.....	22
6. CONCLUSÕES	30
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	31

1. INTRODUÇÃO

A queda de cabelos e/ou pelos do corpo é denominada alopecia. Esta doença pode ser classificada, de acordo com as causas de seu aparecimento, em alopecia androgênica, alopecia quimioterápica e alopecia areata (GELFUSO et al., 2011).

A alopecia androgênica, popularmente conhecida como calvície, é uma doença hereditária e progressiva que promove uma perturbação no ciclo folicular e gera, como consequência clínica, a perda de cabelo. Acomete em sua maioria homens de idade avançada (WOSICKA H et al., 2010), mas também afeta mulheres adultas.

O fármaco mais utilizado no tratamento tópico da alopecia androgênica é o minoxidil. O exato mecanismo que estimula o crescimento do cabelo com aplicação de medicamentos contendo esse fármaco ainda não foi claramente elucidado, mas estudos mostram que ele atua ativando canais de potássio ATPase nos folículos capilares (SHORTER, 2008), favorece a irrigação sanguínea local (BUHL et al., 1990) e, conseqüentemente, aumenta o tempo da fase de crescimento capilar. Além disso, outros estudos sugerem que o minoxidil estende a fase de crescimento do pelo ativando beta-catenina nas células da papila dérmica do folículo piloso (KWACK et al., 2011). No entanto, o tratamento tópico com a formulação de minoxidil não proporciona resultados imediatos e, além disso, podem ocorrer reações dermatológicas indesejadas.

Por se tratar de um medicamento para uso tópico, o perfil de permeação, ou seja, a concentração de minoxidil que efetivamente atinge o bulbo capilar após aplicação da formulação, está diretamente associado à eficiência e eficácia do tratamento. A legislação brasileira atual, no entanto, concede registro de formulações para aplicação tópica apenas com a apresentação de ensaios farmacopeicos, não requerendo nenhum estudo que comprove a permeação do fármaco a partir das formulações (SOARES et al., 2015). Além disso, para registro de medicamentos genéricos de uso tópico, somente é requerido que a

formulação tenha o mesmo fármaco, na mesma concentração e que contenha excipientes que desempenhem a mesma função dos da formulação referência, não sendo necessariamente os mesmos excipientes (ANVISA, 2011). Apesar disso, já existe um consenso global de que estudos que comprovem tanto a dermatofarmacocinética de novos produtos de aplicação tópica (permeação cutânea), quanto a bioequivalência para registro de medicamentos são necessários para se garantir eficácia e segurança desses produtos.

Nesse sentido, o presente estudo teve como objetivo avaliar a qualidade de diferentes medicamentos à base de minoxidil disponíveis no mercado em termos de permeação cutânea *in vitro* do fármaco. Com isso, espera-se além de relatar qualidade e intercambialidade dos produtos, propor o método *in vitro* de permeação cutânea para servir de referência na validação de estudos de determinação de dermatofarmacocinética e bioequivalência de produtos tópicos.

Assim, o estudo comparou a permeação cutânea *in vitro* do minoxidil a partir de três formulações industrializadas e uma formulação manipulada.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Este estudo teve como objetivo avaliar a qualidade de diferentes medicamentos à base de minoxidil disponíveis no mercado em termos de permeação cutânea *in vitro* do fármaco.

2.2 Objetivos específicos

- Verificar o teor das formulações comerciais e manipulada;
- Analisar a linearidade do método analítico em CLAE;
- Estudar *in vitro* a permeação cutânea do minoxidil a partir das formulações comerciais e manipulada;
- Comparar dos resultados de permeação entre as formulações.

3. REFERENCIAL TEÓRICO

3.1 Pele e vias de permeação cutânea

A pele é a estrutura que reveste o corpo humano e que está em continuidade com as mucosas dos orifícios naturais. Sendo o órgão de maior superfície, pode apresentar uma área total de até 25.000 cm² em um ser humano adulto. Ela é dividida em três camadas principais: a epiderme, a derme e a hipoderme (HARRIS, 2009).

A hipoderme é a camada mais profunda, ela é composta por um tecido adiposo onde estão presentes vasos sanguíneos e nervos e sua funcionalidade é promover isolamento térmico, proteção mecânica e aporte nutricional. A derme, também chamada de cório, é a camada intermediária que abriga as estruturas vasculares e nervosas, glândulas sudoríparas, glândulas sebáceas, músculos eretores do pelo e folículos pilosos. A derme é composta por tecido conjuntivo e desempenha a função de sustentar a epiderme estruturalmente e proporcionar aporte de nutrientes. As células predominantes na derme são os fibroblastos, além deles também estão presentes células nervosas responsáveis por transmitir sensações de pressão e tato (RIVITT, 2014).

A epiderme (Figura 1) é a camada mais externa da pele e é constituída por subcamadas denominadas estrato basal, estrato espinhoso, estrato granuloso e estrato córneo. O estrato basal está situado na porção mais interna da epiderme, local onde os queratinócitos passam por intensa divisão celular. A medida em que essas células se movimentam para as demais camadas da epiderme elas sofrem diversos processos de diferenciação e queratinização, ao chegarem no estrato córneo se apresentam anucleadas e achatadas, sendo chamadas então de corneócitos (HARRIS, 2009; ALEXANDER et al., 2012).

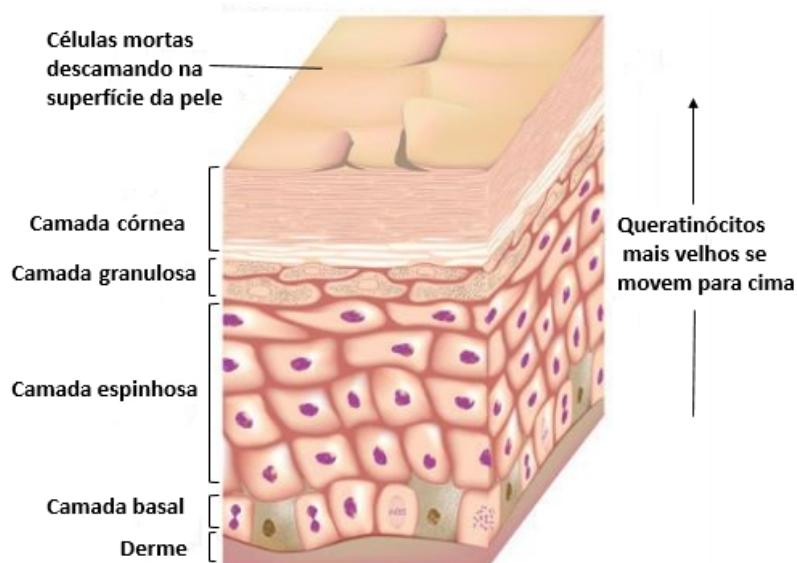


Figura 1. Camadas da epiderme: camada córnea (estrato córneo), camada granulosa, camada espinhosa e camada basal (adaptado de <http://www.todamateria.com.br>).

Os corneócitos são células ricas em queratina que estabelecem ligações entre si por meio de estruturas conhecidas como desmossomas, todo esse sistema está envolto por uma matriz lipídica intercelular constituída por ceramidas, ácidos graxos e colesterol. Além disso, os corneócitos também são revestidos por uma fina camada formada a partir de substâncias secretadas pelas glândulas sebáceas, juntamente com o suor, bactérias e células mortas da pele. Todas essas características contribuem para que a camada córnea seja considerada a principal barreira à penetração de substâncias químicas, microrganismos e à perda de água transepidérmica (ELIAS, 2007; PROW et al., 2011).

Apesar da limitação imposta pelo estrato córneo, a permeação cutânea de fármacos pode acontecer através de três vias diferentes: a via intercelular, a via transcelular e a via apendicular (Figura 2). Na via transcelular o fármaco passa diretamente através dos corneócitos e da matriz celular, já na via intercelular ele se difunde somente pela matriz lipídica que circunda os corneócitos. Na via apendicular a permeação do fármaco ocorre

através dos apêndices cutâneos, ou seja, dos folículos pilosos, glândulas sebáceas e sudoríparas (MOSER et al., 2001; GRATIERI et al., 2008).

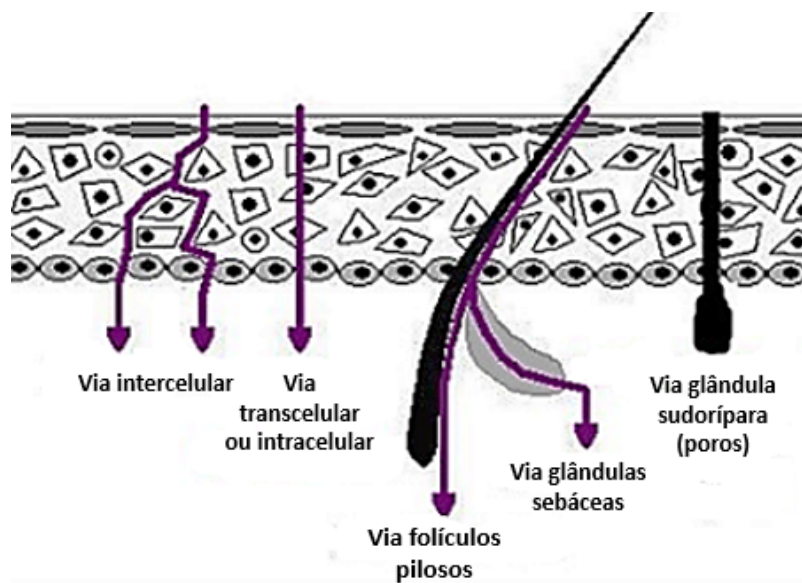


Figura 2. Vias de permeação de fármacos pela pele: via transcelular, via intercelular e via apendicular (adaptado de <http://www.inventiva.ind.br>).

Apesar dos apêndices compreendem apenas 0,1% do total da superfície da pele humana, os folículos pilosos favorecem a penetração por apresentarem sua parte inferior não queratinizada (AKHTAR, 2014). Além disso, estudos sobre a penetração folicular demonstram que os folículos pilosos representam uma via de penetração altamente relevante e eficiente como reservatório para substâncias administradas por via tópica (BLUME-PEYTAVI et al., 2010).

3.2 Alopecia

A alopecia, também conhecida como calvície, é uma doença que resulta na visível redução do cabelo. Ela existe em diferentes formas, uma delas é a alopecia areata que afeta quase 0,1% da população mundial em geral e é caracterizada como uma doença crônica e inflamatória que resulta em uma perda de cabelo imprevisível e incontrolável. Mas a forma mais comum de perda de cabelo em homens e mulheres é através da alopecia androgênica

(AAG) (Figura 3). Apesar de não haver consequências à saúde física, a alopecia traz alterações da aparência, afetando negativamente a autoestima (ELLIS e SINCLAIR, 2008; MULINARI-BRENNER e SOARES, 2009).

Nos homens, a AAG afeta metade da população caucasiana de meia-idade e 95% dos homens caucasianos com mais de 80 anos. Ela é caracterizada clinicamente por uma rarefação simétrica de cabelos em couro cabeludo frontal e coroa. Também pode ocorrer em mulheres causando uma perda difusa do cabelo e deixando-os mais ralos, porém a prevalência no sexo feminino é menor. A AAG resulta na perda de cabelo por intervir no ciclo capilar diminuindo os ciclos foliculares (ELLIS e SINCLAIR, 2008).

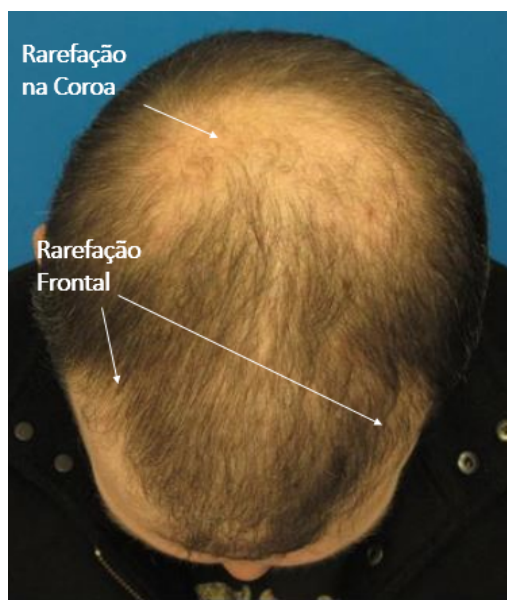


Figura 3. Fotografia ilustrativa do padrão típico da AAG masculina (adaptado de <https://hassonandwong.com>).

O ciclo capilar (Figura 4) faz com que o folículo seja constantemente renovado passando por três fases distintas: a anágena ou de crescimento, a catágena ou de regressão e a telógena ou de repouso. A fase anágena caracteriza-se por intensa atividade mitótica da matriz do folículo piloso e no couro cabeludo, essa fase dura cerca de 3 a 8 anos. A fase catágena é um período de transição entre a fase de crescimento e a de repouso. Na fase

telógena, o pelo se separa da papila dérmica e é facilmente destacado. A queda de um pelo telógeno normal delimita o fim de um ciclo e o início de outro com a substituição por um novo pelo na mesma localização. Entretanto, em áreas do couro cabeludo afetadas por AAG, a cada ciclo que se inicia o folículo vai diminuindo seu diâmetro resultando em um afinamento das hastes, levando a um processo de miniaturização (MULINARI-BRENNER e SOARES, 2009).

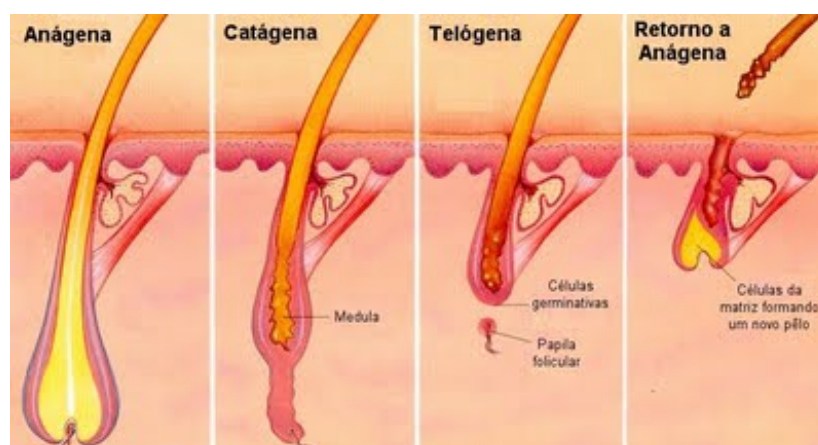


Figura 4. Ciclo de crescimento do pelo representando as fases de anagênese, catagênese e telogênese (SINCLAIR, 2004).

A AAG se relaciona principalmente a fatores genéticos somados a ação dos andrógenos. Indivíduos geneticamente predispostos possuem alteração nos genes que codificam o receptor de andrógeno e a aromatase, enzima que converte testosterona em estradiol. Essa alteração genética nos receptores de andrógenos possibilita que os folículos do couro cabeludo tenham maior capacidade de captar os andrógenos circulantes aumentando sua ação nesses folículos. Já a alteração no gene da aromatase resulta em um aumento de testosterona circulante (BERNAD et al., 2014).

A testosterona, ao ser captada pelos receptores no couro cabeludo, é convertida em diidrotestosterona (DHT) pela enzima 5α -redutase. A ação biológica da DHT nos receptores andrógenos é mais potente que a da testosterona. A DHT age inibindo a

adenilato ciclase, fazendo com que diminua o AMP cíclico dos folículos pilosos e, conseqüentemente, não haja energia suficiente para o desenvolvimento completo dos ciclos foliculares, resultando em um processo de miniaturização. Esses processos celulares encurtam a fase anágena do ciclo capilar e fazem com que os cabelos passem para a fase telógena mais precocemente (BIENOVÁ et al., 2005; BERNAD et al., 2014).

3.3 Tratamento para alopecia com Minoxidil

Os tratamentos farmacológicos aprovados para AAG pelo FDA (Food and Drug Administration) e pela Anvisa (Agência Nacional de Vigilância Sanitária) incluem finasterida (comprimido 1 mg) e minoxidil (solução capilar 2% e 5%).

O minoxidil (Figura 5) é um vasodilatador periférico utilizado originalmente para tratamento de hipertensão, mas apresentou como reações adversas hipertricose auricular (crescimento de pelos nas orelhas) e aparecimento de pelos em pessoas calvas (MESSENGER; RUNDEGREN, 2004). Portanto, foram desenvolvidas formulações tópicas de minoxidil para tratar AAG (GELFUSO, 2009; ROUSSO e KIM, 2014).

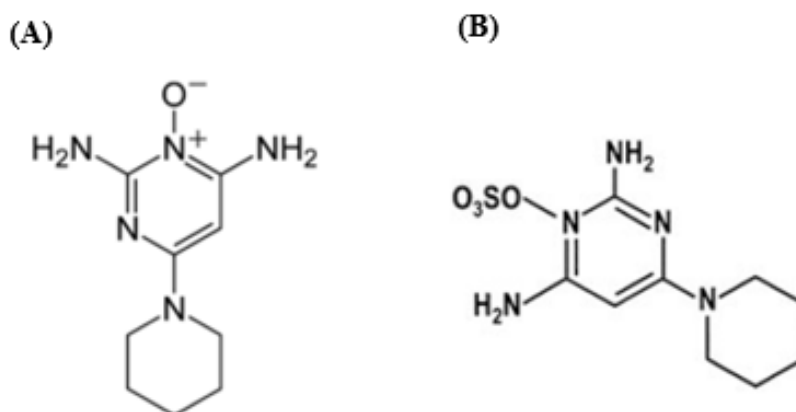


Figura 5. Estrutura química da molécula de (A) minoxidil base e (B) minoxidil sulfato.

O exato mecanismo de ação ainda não foi completamente elucidado, mas o minoxidil parece retardar a progressão da miniaturização folicular e aumentar a duração da fase anágena. A princípio acreditava-se que o minoxidil estimulava o crescimento capilar por promover vasodilatação e criar uma irrigação no couro cabeludo. No entanto, estudos sugerem que o minoxidil estende a fase anágena por ativar beta-catenina nas células da papila dérmica do folículo piloso (KWACK et al., 2011).

O minoxidil é pouco solúvel em água e por essa razão muitas das formulações comercializadas possuem álcool etílico e propilenoglicol em sua composição. Devido à intolerância cutânea à formulação, efeitos indesejáveis como irritação, coceira, vermelhidão, ressecamento do couro cabeludo e dermatite alérgica de contato podem surgir. Para que se evidencie um crescimento capilar adequado, são necessárias duas aplicações diárias por um período de dois a quatro meses. Caso a aplicação de minoxidil seja suspensa, o nascimento de novos pelos é interrompido, e em situação de pausa superior a 3 meses é possível regressão ao aspecto inicial do tratamento (ALOXIDIL, 2013).

3.4 Bioequivalência e Biodisponibilidade

Por definição, bioequivalência consiste na demonstração de equivalência farmacêutica entre produtos apresentados sob a mesma forma farmacêutica, contendo idêntica composição qualitativa e quantitativa de princípio ativo, e que tenham comparável biodisponibilidade, quando estudados sob um mesmo desenho experimental (BRASIL, 1999). A biodisponibilidade a partir do uso medicamentos tópicos, chamada de biodisponibilidade tópica, é definido como a velocidade e a extensão de absorção a partir de uma formulação que permita que o fármaco se apresente disponível no local da ação (STORPIRTIS et al., 2011).

A determinação de bioequivalência e biodisponibilidade pode ser realizada através métodos *in vitro*, que incluem os ensaios de liberação e permeação cutânea. E também por métodos *in vivo* como ensaios clínicos, os farmacodinâmicos, estudos de dermatofarmacocinética (DPK) e a microdiálise dérmica (LEAL et al., 2017). Contudo, no Brasil, a legislação ainda não regulamentou a avaliação da bioequivalência de medicamentos tópicos cópia em relação ao medicamento referência, os estudos de bioequivalência não são obrigatórios para o registro desses medicamentos (ANVISA,2011).

Dessa forma, um estudo comparativo acerca da permeação de diferentes formulações de minoxidil é de grande valia para comparar a biodisponibilidade do fármaco no folículo piloso e constatar se o fator de permeação está contribuindo ou não para a eficácia do tratamento.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Material

O minoxidil base (MXB, 99%) e o minoxidil sulfato (MXS, 99%) utilizado na preparação das curvas de calibração foram cedidos pela Galena Química Ltda. (Campinas, Brasil). A água utilizada em todas análises foi água tipo Milli-Q (Millipore, França). O tampão foi preparado utilizando fosfato de sódio nas formas monobásica e dibásica (Vetec, Rio de Janeiro, Brasil) e cloreto de sódio (Serva, Rio de Janeiro, Brasil). Os solventes metanol e acetonitrila de grau HPLC foram obtidos da Tedia Brazil Ltda (Rio de Janeiro, Brasil). *O tape stripping* diferencial foi realizado com cola de cianoacrilato obtida da Loctite (São Paulo, Brasil) e fitas adesivas Scotch Book Tape (3M, Alemanha).

A pele utilizada nos experimentos foi retirada de orelhas de suínos logo após o abate. Este material foi gentilmente cedido pela Bonasa Alimentos (São Sebastião, DF, Brasil). Não foi necessária nenhuma autorização de conselhos de ética para uso desse material biológico por se tratar de produto liberado para consumo. Para a obtenção da pele, cada orelha foi lavada com água tipo Milli-Q e fixada sobre uma placa de isopor recoberta por papel alumínio. A pele foi então separada da cartilagem com o auxílio de um bisturi. A camada adiposa adjacente à derme foi removida com o auxílio de uma tesoura. A pele foi armazenada congelada a -4°C por um período máximo de dois meses antes do seu uso.

4.2 Formulações

O perfil de permeação cutânea de minoxidil foi determinado comparando-se três formulações industrializadas e uma manipulada (Figura 6). As três formulações industrializadas escolhidas foram de MXB com concentração de 50 mg/mL:

- Aloxidil[®] (minoxidil 5%) - *Theraskin* Farmacêutica
- Rogaine[®] (minoxidil 5%) - *Johnson & Johnson* Industrial
- Kirkland[®] (minoxidil 5%) - *Kirkland Signature*

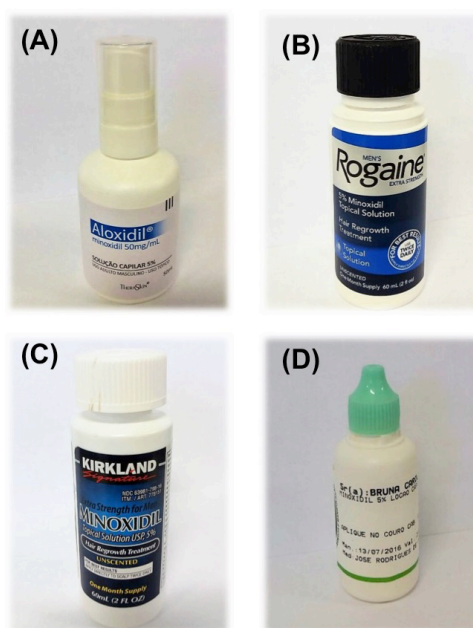


Figura 6. Formulações industrializadas à base de MXB: (A) Aloxidil[®], (B) Rogaine[®], (C) Kirland[®], e (D) formulação manipulada à base de MXS.

Aloxidil[®] é o medicamento de referência no Brasil. Rogaine[®] e Kirland[®] apesar de serem formulações muito utilizadas no Brasil, ainda não possuem registro e são adquiridas em outros países. Rogaine[®] e Kirland[®] foram selecionadas como amostras nesse trabalho pois no momento em que as formulações foram adquiridas não havia outras formulações industrializadas de minoxidil disponíveis no mercado brasileiro além de Aloxidil[®].

A formulação manipulada foi obtida em uma farmácia de manipulação localizada no Distrito Federal. Diferentemente das formulações industrializadas, a formulação manipulada foi preparada com MXS, que é o derivado que se usa comumente magistralmente, com a mesma concentração de 50 mg/mL.

4.3 Método analítico para o minoxidil base e minoxidil sulfato

Os princípios ativos MXB e MXS foram dosados com o auxílio de um Cromatógrafo Líquido de Alta Eficiência (CLAE), modelo Shimadzu LC-20AD, composto

por duas bombas (modelo LC-20AT), um injetor automático (modelo SIL-20AC) e forno (modelo CTO-20A), acoplados a um detector espectrofotométrico (modelo SPD-M20A) e a um computador equipado com o programa de análise cromatográfica Shimadzu LC. Foi utilizada uma coluna de fase reversa C₁₈ (dimensões: 150 mm x 4,6 mm, tamanho de partículas 5 µm) e a fase móvel foi composta por uma mistura de Água deionizada e Metanol (70:30, v/v). A vazão utilizada foi de 1 mL/min, o volume de injeção das amostras foi de 20 µL, o forno foi utilizado a 40 °C e a detecção foi feita em 285 nm (adaptado de MATOS, 2014).

Apesar do método analítico descrito acima já ter sido estabelecido, curvas analíticas foram preparadas para avaliar sua linearidade e comparar a sensibilidade dos métodos para os dois derivados analisados. Inicialmente, preparou-se três soluções de cada princípio ativo (MXB e MXS) com concentração de 50 µg/mL diluindo-se 2,5 mg do fármaco em 50 mL de metanol. A partir de cada solução estoque foram feitas as diluições com concentração de 0,25; 0,5; 1,0; 2,5; 5,0 e 10,0 µg/mL. As curvas analíticas de cada fármaco foram construídas e, após aplicação do método de regressão linear, obteve-se uma reta $y = ax + b$, onde (a) corresponde ao coeficiente angular e (b) coeficiente linear. O coeficiente de correlação linear (r) aceitável foi de, no mínimo, $r = 0,99$ (ANVISA, 2003).

Os limites de quantificação e detecção teóricos foram calculados de acordo com as fórmulas abaixo:

$$\text{Limite de Quantificação} = \frac{10 \times s}{S} \quad (\text{Equação 1})$$

$$\text{Limite de Detecção} = \frac{3 \times s}{S} \quad (\text{Equação 2})$$

Onde s é o desvio padrão dos valores de interceptação do eixo das curvas e S é o coeficiente angular da curva.

4.4 Análise do teor e pH das formulações

O teor das formulações foi realizado com o objetivo de confirmar a concentração informada por seus respectivos fabricantes de 50 mg/mL. Como é o único parâmetro requerido para registro de produtos cópias, esses dados foram usados para dar suporte à discussão de comparação dos perfis de permeação do fármaco a partir das diferentes formulações. Assim, foram realizadas diluições de 1:10000 (v/v) de todas as formulações em metanol e o minoxidil presente nas amostras foi quantificado em CLAE. O experimento foi realizado em quintuplicata para cada formulação.

O pH de cada formulação foi verificado em triplicata utilizando um medidor de pH de bancada Digimed modelo DM-22 (São Paulo, Brasil).

4.5 Estudos *in vitro* de permeação cutânea de minoxidil em pele de suínos

Os estudos de permeação foram conduzidos *in vitro* em células de difusão vertical do tipo Franz (Figura 7). Esta célula possui um compartimento doador, no qual foi inserido 1 mL de cada formulação, e um compartimento receptor, que foi preenchido com uma solução tampão fosfato 0,01 M, pH 7,4. A pele suína ficou disposta na célula entre os dois compartimentos com o estrato córneo voltado para cima. Após aplicação das formulações sobre a pele, elas permaneceram em uma placa de agitação magnética e em banho termostático a $35 \pm 2^\circ\text{C}$ por um período de 6 horas. Amostras de 1 mL foram coletadas do compartimento receptor nos tempos de 2 h, 4 h e 6 h, sendo que igual volume de solução tampão fosfato 0,01 M, pH 7,4 foi imediatamente repostado após cada coleta. As alíquotas foram filtradas e armazenadas em frascos para análise quantitativa do fármaco permeado por CLAE. Todos os experimentos foram realizados em quintuplicata.



Figura 7. Célula de difusão do tipo Franz modificada (MATOS, 2014)

4.5.1 Quantificação do minoxidil a partir do estrato córneo, da epiderme e do folículo piloso

Ao final do estudo de permeação *in vitro* das formulações comerciais e manipulada, o fármaco foi recuperado das diferentes camadas da pele (estrato córneo, epiderme remanescente e folículo piloso) utilizando a técnica de *tape stripping* diferencial previamente validado (MATOS et al., 2014). Os fragmentos de pele removidos de cada célula de Franz (Figura 8) foram lavados superficialmente com água Milli-Q para retirar o excesso de formulação e secados suavemente com lenço de papel absorvente. Eles foram esticados e presos sobre um suporte de isopor e um *template* de fita adesiva foi colocado sobre o fragmento de pele de modo a deixar exposto somente a área que esteve em contato com a formulação. O estrato córneo foi removido utilizando a técnica *tape stripping* com o auxílio de 15 pedaços de fita adesiva por amostra de pele. Posteriormente à retirada do estrato córneo, 1 gota de cola cianoacrilato foi aplicada sobre a pele para remoção dos folículos pilosos com o auxílio de mais um pedaço de fita. Por fim, a epiderme e derme remanescentes foram picotadas.

Os 15 pedaços de fitas provenientes da remoção do estrato córneo, o pedaço de fita com os folículos pilosos e a epiderme picotada foram transferidos para frascos contendo 5 mL de metanol para extração do fármaco. Os frascos foram deixados sob agitação magnética por

um período de 24 h. O metanol foi então filtrado em membranas de 0,22 μm e analisado por CLAE para quantificação do minoxidil.

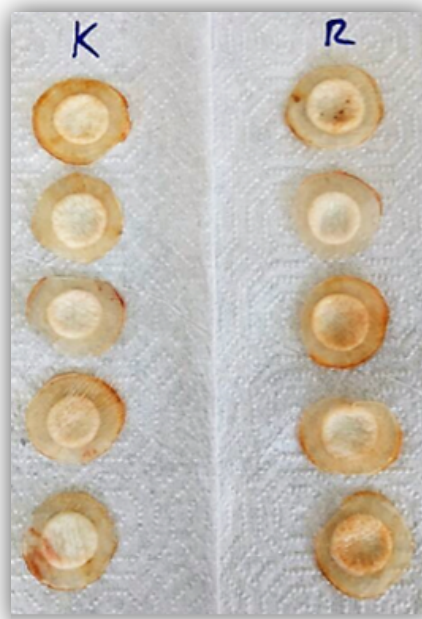


Figura 8. Peles de suínos retiradas da células do tipo Franz após o estudo de permeação *in vitro* com as formulações comerciais de minoxidil Kirkland[®] e Rogaine[®]. Os dois ensaios foram realizados em quintuplicata.

4.6 Análise estatística dos dados

Os conjuntos de dados foram verificados por análise de variância *one-way* ANOVA, seguido do teste de Tukey com comparação múltipla dos dados. O nível de significância estatística foi fixado como sendo $p < 0,05$.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Método analítico para o minoxidil base e o minoxidil sulfato

As formulações industrializadas testadas neste trabalho continham o MXB e a formulação manipulada, o MXS. Dessa forma, seguindo-se o método cromatográfico já estabelecido para o MXS com adaptações (MATOS et al., 2015), determinou-se para cada um dos fármacos as respectivas curvas analíticas, além de se analisar os respectivos cromatogramas, para se verificar alterações no tempo de retenção, e possíveis alterações na sensibilidade do método na análise de cada uma das formas do fármaco minoxidil.

Na Figura 9 estão apresentados os cromatogramas dos fármacos MXB (A) e MXS (B).

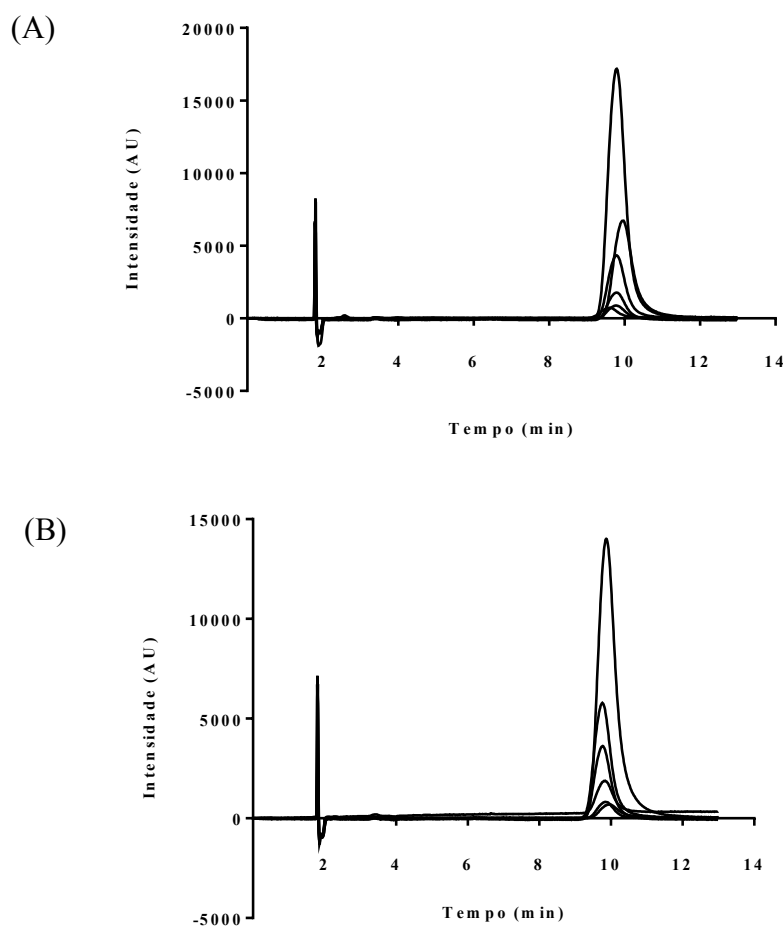


Figura 9. (A) Sobreposição dos cromatogramas obtidos por CLAE, seguindo o método descrito anteriormente, referentes à curva analítica para o MXB. (B) Sobreposição dos cromatogramas obtidos por CLAE, seguindo o método descrito anteriormente, referentes à curva analítica para o MXS.

Nota-se que, apesar de diferenças nas suas formas estruturais, já que o MXS possui um grupo sulfato a mais ligado à estrutura do MXB, o tempo de retenção dos compostos foram praticamente os mesmos durante todas as análises cromatográficas. Desta forma, não se é possível distinguir uma molécula da outra por meio do método cromatográfico. De qualquer forma, nos experimentos apresentados a seguir, os fármacos foram analisados sempre de maneira separada.

Na Figura 10 estão apresentadas as curvas analíticas construídas para cada fármaco.

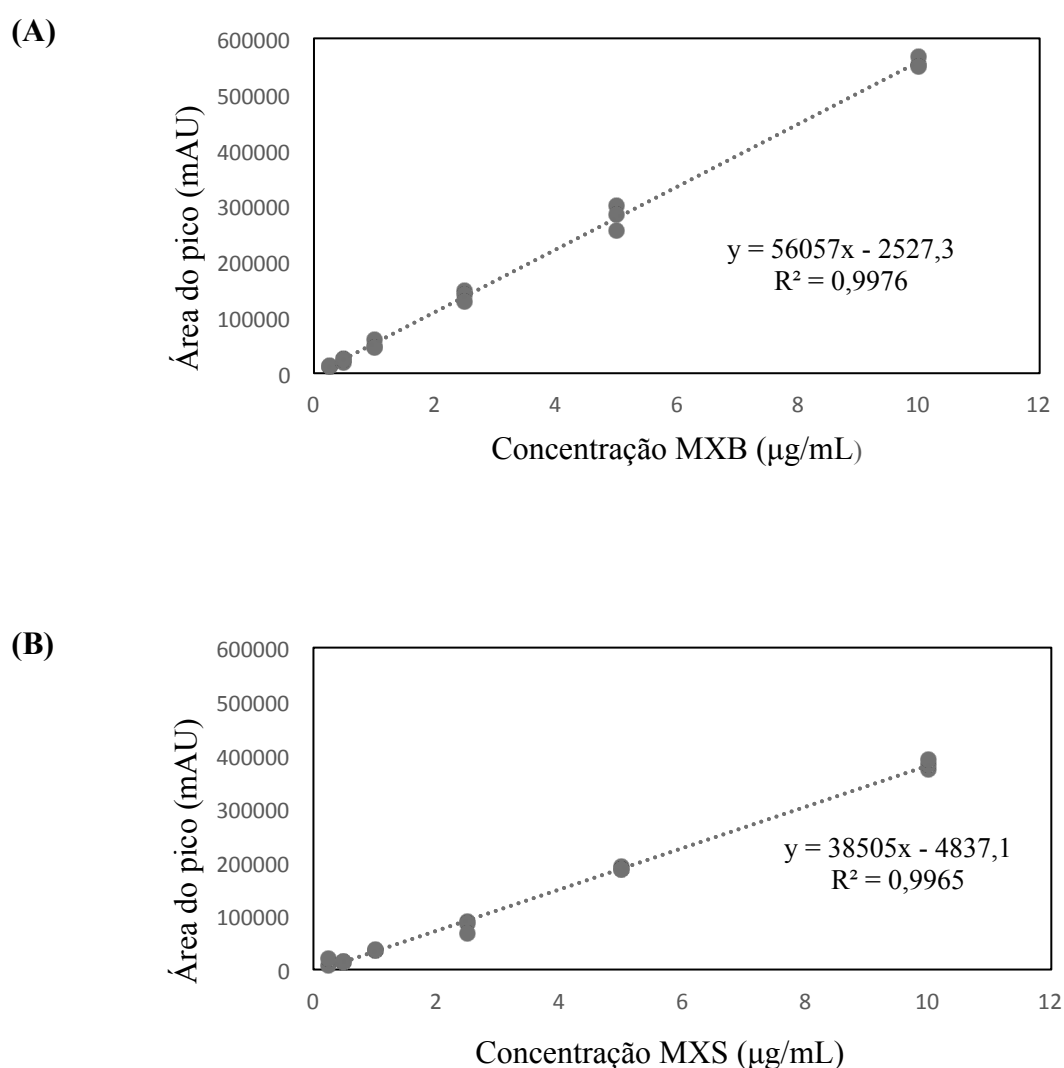


Figura 10. Representação gráfica das curvas analíticas obtidas por CLAE para o (A) MXB: Equação da reta: $y = 56057x - 2527,3$ e coeficiente de correlação linear: $r^2 = 0,998$ e para o (B) MXS: equação da reta: $y = 38505x - 4837,1$ e coeficiente de correlação linear: $r^2 = 0,997$.

Os limites de quantificação e detecção teóricos para os fármacos foram adequados para a dosagem do MXB e MXS nos experimentos de permeação *in vitro*. O limite de detecção para o MXB foi 0,185 µg/mL e para o MXS foi de 0,177 µg/mL. Enquanto o limite de quantificação calculado para o MXB foi 0,559 µg/mL e para o MXS foi 0,535 µg/mL.

O método também se mostrou linear para dosagem de ambos os fármacos, uma vez que os coeficientes de correlação linear obtidos foram 0,998 para a curva de MXB e 0,997 para a curva de MXS, todos dentro do limite estabelecido pela Anvisa (ANVISA, 2003). Foi possível, portanto, analisar com segurança e confiabilidade os fármacos na faixa de concentração entre 0,25 µg/mL e 10,0 µg/mL.

5.2 Características físico-químicas das formulações: análise de teor e pH

A formulação de minoxidil adquirida em farmácia de manipulação é composta por 5% de MXS, 10 % de propilenoglicol e QSP 100% de álcool cereais. A solubilidade do MXS em meio aquoso é de 56,14 g/L (MATOS, 2014). As formulações industrializadas Aloxidil[®], Rogaine[®], Kirkland[®] são compostas por 5% de MXB e QSP 100% de álcool etílico, propilenoglicol e água purificada. A solubilidade do MXB em meio aquoso é de 2,2 g/L a 25°C, sendo considerado pouco solúvel (THE MERCK INDEX, 1987; GORECKI, 1988).

As formulações industrializadas de MXB Aloxidil[®], Rogaine[®] e Kirkland[®], apresentaram valores de pH iguais a $7,95 \pm 0,45$; $7,84 \pm 0,13$; e $8,00 \pm 0,42$ respectivamente. Enquanto isso, a formulação manipulada de MXS apresentou pH igual a $3,98 \pm 0,06$, estatisticamente diferente ao pH das formulações comerciais ($p < 0,05$).

Os dados de análise de teor de fármaco nas diferentes formulações estão apresentados na Figura 11 abaixo.

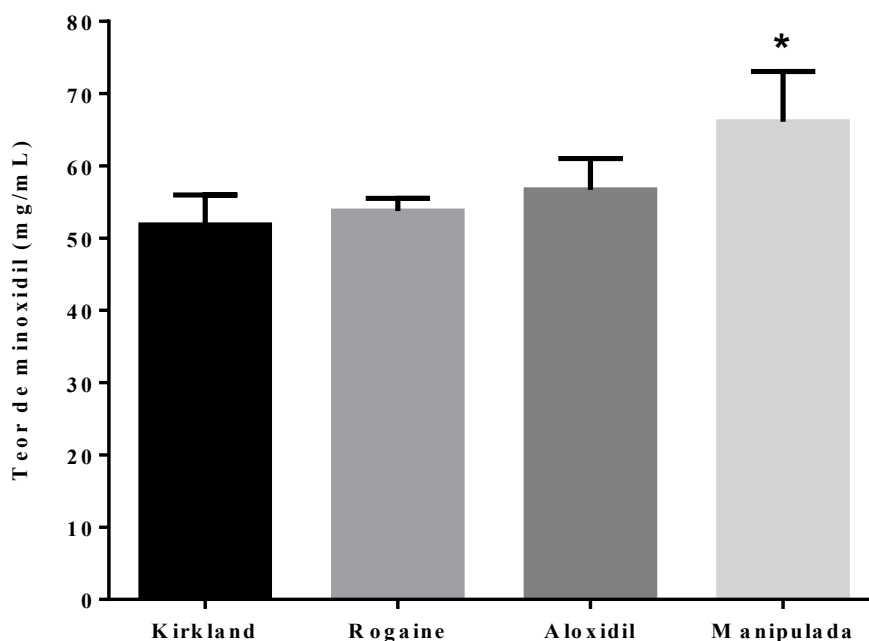


Figura 11. Teor de minoxidil nas formulações Kirkland[®], Rogaine[®], Aloxidil[®] e manipulada.

De acordo com a análise de teor, as formulações industrializadas Kirkland[®], Aloxidil[®] e Rogaine[®] possuem a concentração de 50 mg/mL, assim como informado pelos seus respectivos fabricantes. A formulação manipulada apresentou concentração igual a $66,08 \pm 0,70$ mg/mL, sendo significativamente superior às demais ($p < 0,05$), numa razão de 32%. O controle de qualidade existente nas indústrias farmacêuticas pode ser o diferencial que garantiu a concentração das formulações industrializadas, por outro lado as farmácias de manipulação não contam com um controle tão rígido como nas indústrias.

Considerando os dados de teor de fármaco e pH, pode-se concluir que as formulações industrializadas de MXB têm equivalência farmacêutica entre si. Por conta da diferença estrutural existente na molécula de MXS a formulação manipulada não poderia ser considerada equivalente às formulações industrializadas a base de MXB. Porém, ainda que a diferença estrutural entre as moléculas fosse desconsiderada, de acordo com os resultados de teor e pH, a formulação manipulada ainda assim não seria farmacologicamente equivalente à formulação referência Aloxidil[®].

5.3 Determinação da permeação cutânea *in vitro* do minoxidil a partir das formulações

Os estudos de permeação permitem analisar a difusão do fármaco através das camadas da pele e constatar se ocorre penetração do fármaco, retenção no estrato córneo ou ainda direcionamento para os anexos cutâneos (OYAFUSO, 2012). O transporte do fármaco através da pele é um processo de difusão passiva, que pode ser entendido como a passagem de moléculas através de uma membrana que não participa ativamente do processo. Nesse caso, a membrana é a pele e o fármaco é impulsionado a atravessar suas camadas devido ao gradiente de concentração existente, ou seja, as diferenças de concentração do fármaco no meio doador e no meio receptor da célula de Franz (NETZ et al., 2002).

Na terapia dermatológica tópica, a formulação de minoxidil é aplicada diretamente no local a ser tratado e para se obter a ação esperada é fundamental que ela seja capaz de se difundir passivamente nas camadas da pele e se acumular no folículo piloso. Tendo isso em vista, as permeações *in vitro* foram realizadas com o objetivo de comparar o perfil de permeação cutânea do minoxidil em formulações comercializadas, como indicativo da efetividade dos produtos disponíveis no mercado.

Os estudos de permeação cutânea foram realizados por um período total de seis horas, e a cada 2 horas 1 mL da solução receptora foi coletado para análise e imediatamente repostos 1 mL da mesma solução tampão fosfato 0,01 M, pH = 7,4. Após as seis horas do experimento o fármaco foi extraído do estrato córneo, dos folículos pilosos e da epiderme. O processo de extração do fármaco das camadas da pele suína, e o método analítico utilizado com adaptação para quantificação do minoxidil por CLAE, foram validados previamente em estudo do grupo, encontrando-se valores de recuperação acima de 84,45% para todas as camadas da pele (MATOS, 2014).

Nas primeiras duas horas de experimento não foi possível detectar o fármaco na solução receptora, na quarta hora o minoxidil permeado pôde ser detectado pelo método analítico, porém não houve quantificação. A coleta realizada após as seis horas de experimento permitiu que houvesse quantificação do fármaco na solução receptora e os valores estão representados na Figura 12.

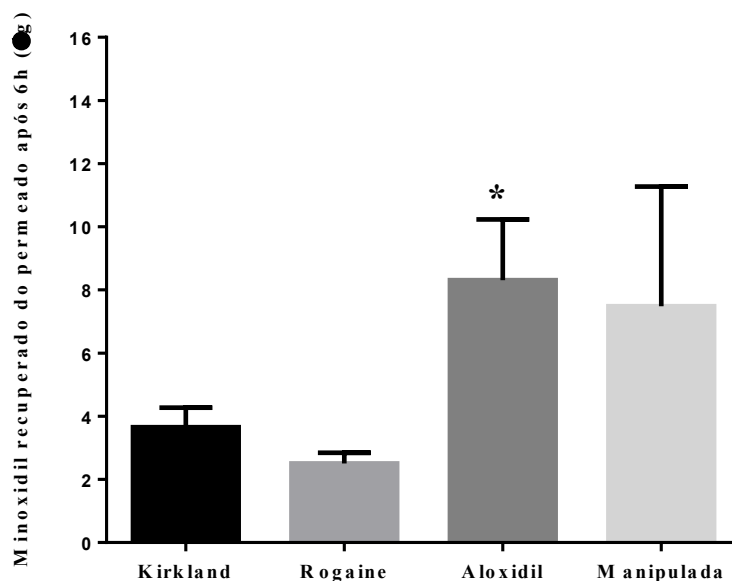


Figura 12. Quantidade de minoxidil permeada em 6h de permeação passiva, a partir das formulações Kirkland[®], Rogaine[®], Aloxidil[®] e manipulada. As barras representam a média \pm desvio padrão da média.

O MXB quantificado na solução receptora foi significativamente maior em Aloxidil[®] se comparado com Kirkland[®] e Rogaine[®] ($p < 0,05$). Apesar de possuírem os mesmos componentes, as proporções de propilenoglicol e álcool etílico não são informadas na literatura e, uma possível diferença na proporção desses excipientes entre as três formulações pode justificar a maior permeação do fármaco a partir do Aloxidil[®].

A formulação manipulada permitiu a permeação de $7,49 \pm 3,79 \mu\text{g}$ de MXS, apresentando diferença significativa apenas em relação ao Rogaine[®] ($p < 0,05$). O MXS é a forma sulfatada do MXB, por ser mais hidrossolúvel apresenta maior facilidade na

manipulação farmacotécnica. O responsável pelos efeitos farmacológicos na pele é o sulfoconjugado ativo do minoxidil, portanto, mesmo quando a formulação é manipulada a partir do MXB ao chegar no folículo piloso o fármaco é metabolizado em MXS (BUHL et al., 1990; KUDLACEK et al., 1995). Não foi encontrado na literatura nenhuma evidência de que a presença ou a ausência de sulfatação na molécula de minoxidil possa interferir na permeação cutânea do fármaco. Porém, a maior concentração da formulação manipulada que foi evidenciada na análise de teor, pode ter influenciado em sua alta permeação.

A capacidade das formulações em permitir que o minoxidil seja absorvido em maiores quantidades pelas camadas mais profundas da pele pode ser considerada uma desvantagem, tendo em vista que a presença do minoxidil em altas concentrações sistêmicas pode gerar efeitos indesejados associados ao seu potencial anti-hipertensivo (MATOS, 2014). Isso no entanto não pode ser concluído com este tipo de estudo *in vitro*, uma vez que aqui a pele não está em condição total de viabilidade, ou seja, a quantidade permeada do fármaco pode significar apenas a quantidade que transpassa o estrato córneo, mas não o que seria absorvido pela circulação sanguínea.

Na Figura 13A estão apresentados os dados de retenção de MXB e MXS no estrato córneo a partir das diferentes formulações analisadas.

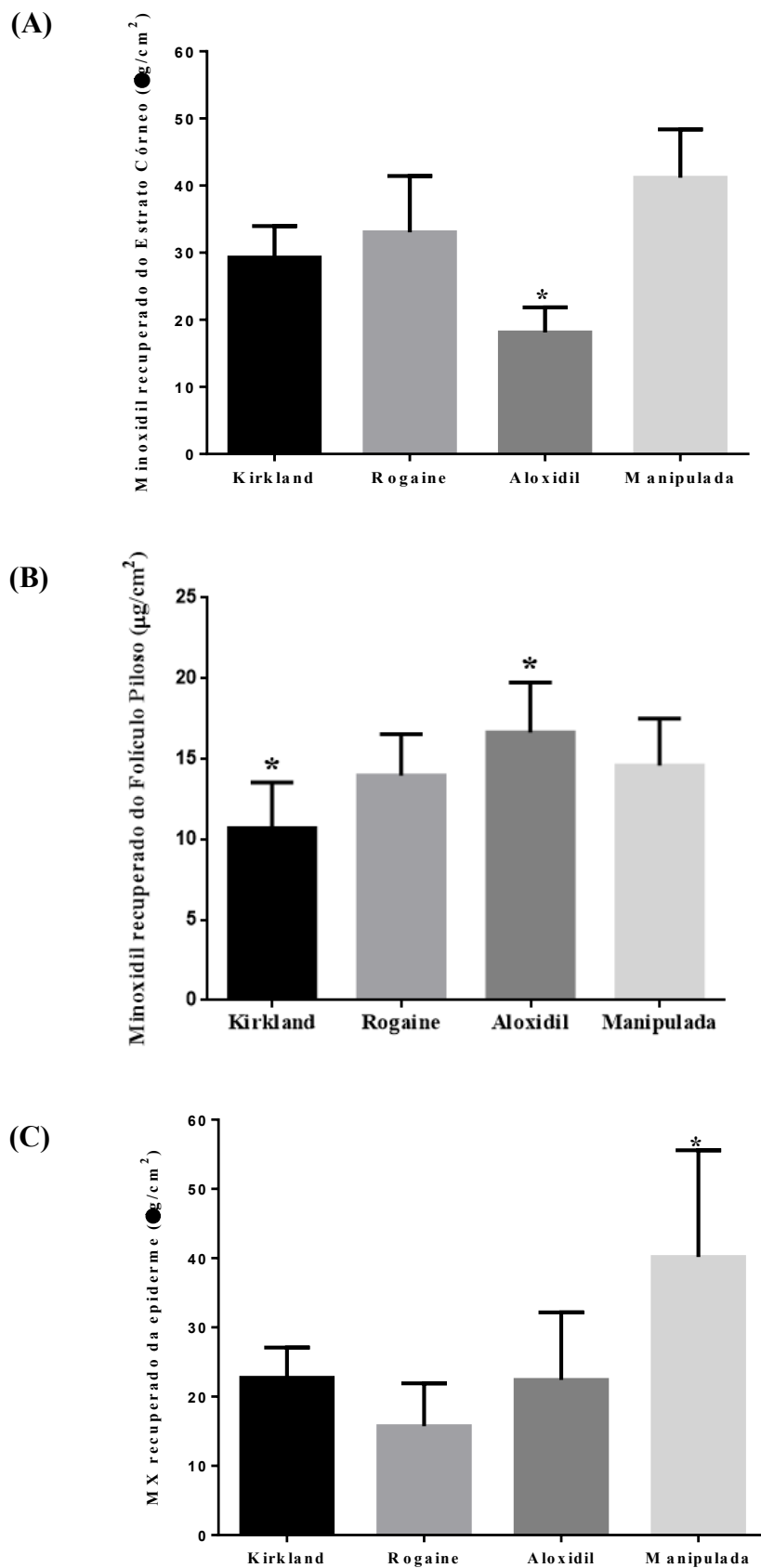


Figura 13. Quantidade de minoxidil retida no (A) estrato córneo (B) folículos pilosos e (C) pele remanescente a partir das formulações Kirkland[®], Rogaine[®], Aloxidil[®] e manipulada. As barras representam a média \pm desvio padrão da média.

O Aloxidil[®], além de ter proporcionado uma maior quantificação do MXB na solução receptora também foi a formulação que menos apresentou retenção do MXB no estrato córneo ($18,13 \pm 3,73 \mu\text{g}/\text{cm}^2$), possuindo diferenças significativas para todas as demais formulações ($p < 0,05$). Com relação a formulação manipulada, o minoxidil quantificado no estrato córneo apresentou a maior quantidade de fármaco nesta camada ($41,16 \pm 7,22 \mu\text{g}/\text{cm}^2$), porém a retenção ocorreu em quantidades significativamente diferentes apenas em relação a Kirkland[®] e Aloxidil[®] ($p < 0,05$).

Com relação à retenção de minoxidil para folículos pilosos (Figura 13B), as únicas que apresentaram diferenças significativas entre si na quantidade de fármaco recuperada dos folículos foram Aloxidil[®] e Kirkland[®] ($p < 0,05$), sendo que a quantidade de MXB recuperada dos folículos foi de $10,70 \pm 2,85 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ para o Kirkland[®] e de $16,64 \pm 3,10 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ para o Aloxidil[®].

Tento em vista que o local de ação do minoxidil na alopecia é o folículo piloso, e que essas estruturas parecem ser a principal via de penetração de micropartículas e nanopartículas, alguns estudos sugerem o desenvolvimento dessas partículas como sistemas de liberação capazes de se acumular nos folículos pilosos atuando como um reservatório de fármaco (MEIDAN et al., 2005; GELFUSO et al., 2011; GELFUSO et al., 2013). Matos et al. (2015) prepararam nanopartículas de quitosana contendo o MXS, com o objetivo de direcionar e sustentar a liberação deste fármaco na base dos folículos pilosos. Apesar da formulação nanoestruturada desenvolvida por Matos et al (2015) ter apresentado concentração de MXS no folículo cerca de 2 vezes menor do que a das formulações comerciais testadas nesse trabalho, a nanoformulação continha uma concentração de MXS 28.500 vezes menor do que a concentração presente nas formulações comerciais. Esses resultados demonstram a efetividade de nanoformulações no tratamento de patologias relacionadas ao folículo piloso, como alopecia e acne (GELFUSO et al., 2011).

O perfil de retenção do minoxidil na pele remanescente a partir de todas as formulações após um período 6 horas pode ser verificado na Figura 13C. A quantidade de fármaco na epiderme para a formulação manipulada foi de $40,16 \pm 15,43 \mu\text{g}/\text{cm}^2$, sendo essa a formulação que proporcionou maior retenção do minoxidil na pele remanescente. Esta diferença foi diferente estatisticamente de todas as demais ($p < 0,05$).

Como descrito anteriormente a formulação manipulada é composta por 5% de MXS, 10% de propilenoglicol e QSP 100% de álcool cereais. O álcool cereais é um álcool etílico obtido a partir de cereais (milho, arroz, trigo e etc.) sendo muito usado na manipulação farmacêutica por possuir alto grau de pureza (EMFAL, 2015). Portanto, a formulação manipulada é composta por 85% de álcool etílico. Grice et. al. (2010) já avaliaram a permeação cutânea de formulações de minoxidil obtidas a partir de diferentes proporções de etanol, propilenoglicol e água, e evidenciaram que as formulações com etanol resultavam em uma maior quantidade de minoxidil recuperado das camadas da pele se comparado com a formulação obtida apenas com água e propilenoglicol. O etanol promove a permeação cutânea por atuar como solvente aumentando a solubilidade do fármaco e, além disso, ao permear o estrato córneo ele altera as propriedades de solubilidade do tecido desestruturando o arranjo da camada lipídica e consequentemente melhorando a partição do fármaco (WILLIAMS e BARRY, 2004). O etanol, no entanto, é agressivo para a pele, principalmente se pensarmos em seu uso contínuo.

De acordo com o exposto, o fato da formulação manipulada ter sido absorvida em grandes quantidades no estrato córneo, na epiderme e no permeado pode ser justificado por seu alto teor de etanol. Contudo, isso não fez com que essa formulação promovesse direcionamento do fármaco para os folículos pilosos em quantidade significativamente maior que as demais formulações, além de se correr o risco de causar uma irritação cutânea com o uso contínuo do produto.

A Anvisa ainda não dispõe de mecanismos eficientes para avaliar a bioequivalência de medicamentos tópicos cópia em relação ao medicamento referência. No Brasil, medicamentos tópicos similares ou genéricos são bioisentos pela RDC 37/2011, ou seja, não há obrigatoriedade de estudos de bioequivalência que comprovem sua segurança e eficácia para fins de registro. Os medicamentos tópicos cópias devem apenas conter o mesmo fármaco, na mesma concentração, excipientes de mesma função em relação ao medicamento de referência e apresentar estudo de equivalência farmacêutica, o qual avalia apenas os parâmetros físico-químicos e microbiológicos estabelecidos em farmacopeias (ANVISA, 2011).

Soares et al. (2015) realizaram um levantamento de todos os medicamentos tópicos registrados no Brasil até o ano de 2013 e dos respectivos estudos necessários para o seu registro nacional comparando com os estudos exigidos para o registro em outros países. O estudo evidenciou uma maior flexibilização das exigências regulatórias no âmbito nacional resultando na existência de um maior número de cópias de medicamentos tópicos no mercado brasileiro. A principal consequência é a ausência da garantia de bioequivalência entre as diferentes formulações.

Testes de permeação cutânea são considerados um dos principais métodos *in vitro* para determinação da biodisponibilidade/bioequivalência de medicamentos tópicos (LEAL et al., 2017). A partir dos testes de permeação cutânea realizados no presente estudo com formulações tópicas de minoxidil disponíveis do mercado (Aloxidil[®], Rogaine[®], Kirkland[®] e manipulada) foi possível quantificar e diferenciar a quantidade de fármaco que atingiu as diferentes camadas da pele bem como o folículo piloso - local de ação do minoxidil na alopecia. Desse modo, esse estudo espera poder contribuir como uma possível referência para validação de estudos *in vitro* de permeação cutânea para avaliação de biodisponibilidade e bioequivalência de produtos tópicos.

Tabela 1. Resumo da evidência de equivalência farmacêutica entre a formulação referência Aloxidil e as formulações Kirkland, Rogaine e Manipulada.

	Rogaine[®]	Kirkland[®]	Manipulada
Teor	-	-	+
pH	-	-	+
Retenção no Estrato Córneo	-	-	+
Retenção no Folículo Piloso	-	+	-
Retenção na Epiderme	-	-	+
+ houve diferença	- não houve diferença		

A Tabela 1 faz comparações entre todas as formulações de acordo com os critérios avaliados nesse trabalho. O medicamento de referência para liberação tópica de minoxidil no Brasil é o Aloxidil[®]. Portanto, de acordo com os dados de teor e pH obtidos, as formulações Kirkland[®] e Rogaine[®] são farmacêuticamente equivalentes ao medicamento referência, ao passo que a formulação manipulada não apresenta equivalência farmacêutica com o medicamento referência. Com relação à biodisponibilidade, a formulação Kirkland[®] apresentou baixa biodisponibilidade tópica no folículo piloso ao ser comparada com o medicamento de referência Aloxidil[®], enquanto as demais formulações se apresentaram biodisponíveis no folículo piloso não possuindo diferenças significativas com Aloxidil[®].

6. CONCLUSÕES

Os estudos realizados com o medicamento referência Aloxidil[®] confirmaram sua concentração de 50 mg/mL. O seu comportamento nos estudos de permeação *in vitro* mostrou um bom direcionamento do MXB para o folículo piloso e obteve menor retenção no estrato córneo com relação as demais formulações.

Rogaine[®] e Kirkland[®] apresentaram um perfil de permeação semelhante e não apresentaram diferenças significativas entre si em nenhuma análise. Em comparação com o medicamento referência eles possuem o mesmo teor e valores de pH próximos e, sendo assim, podem ser considerados equivalentes farmacêuticos. Rogaine[®] apresentou um direcionamento para os folículos pilosos semelhante ao do Aloxidil[®]. Já o direcionamento de fármaco para o folículo piloso a partir Kirkland[®] foi significativamente inferior do que em Aloxidil[®], o que implica em uma biodisponibilidade tópica diferente entre eles.

A formulação manipulada apresentou grandes diferenças. O teor foi superior às demais numa razão de 32% e o valor do pH foi aproximadamente 2 vezes menor que os valores de pH das formulações industrializadas, não sendo portanto equivalente ao medicamento referência. Nos estudos de permeação *in vitro*, a formulação manipulada apresentou uma ampla distribuição do MXS pelas camadas da pele e não apresentou diferenças significativas no direcionamento do fármaco para o folículo piloso.

Os estudos *in vitro* de permeação cutânea podem contribuir para a avaliação da biodisponibilidade tópica e bioequivalência de produtos tópicos. Esses estudos, sendo devidamente delineados para cada medicamento, proporcionariam maior confiabilidade na equivalência de medicamentos tópicos genéricos e similares com os seus respectivos medicamentos de referência.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANVISA. Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), RE N° 899, 2003.

ANVISA. Guia para isenção e substituição de estudos de biodisponibilidade relativa/bioequivalência. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), RDC N° 37, 2011.

AKHTAR, N. Vesicles: a recently developed novel carrier for enhanced topical drug delivery. *Current drug delivery*, v. 11, n. 1, p. 87-97, 2014.

ALEXANDER, A.; DWIVEDIB, S.; AJAZUDDINA; GIRIB, T. K.; SARAF, S.; TRIPATHIP, D. K. Approaches for breaking the barriers of drug permeation through transdermal drug delivery. *J Control Release*, v. 164, p. 26-40, 2012.

ALOXIDIL[®]: minoxidil. São Paulo: Theraskin Farmacêutica Farm. Resp.: Dra. Rosa Maria Scavarelli - CRF-SP n° 6.015. Bula de remédio, 2013. Disponível em: <http://www4.anvisa.gov.br/BularioEletronico/>.

BERNAD ALONSO, I.; LERA IMBULUZQUETA, J. M., IRARRAZAVAL ARMENDÁRIZ, I.; ESPAÑA ALONSO, A. Alopecias. *Medicine - Programa Formación Médica Continuada Acreditado*. v. 11, n. 48, p. 2840–51, 2014.

BIENOVÁ, M.; KUCEROVÁ, R.; FIURASKOVÁ, M.; HAJDÚCH, M.; KOLÁR, Z. Androgenic alopecia and current methods of treatment. *Acta Dermatovenerologica Alpina*, v. 14, n. 1, p. 5-8, 2005.

BLUME-PEYTAVI, U.; MASSOUDY, L.; PATZELT, A.; LADEMANN, J.; DIETZ, E.; RASULEV, U.; BARTELS, N. G. Follicular and percutaneous penetration pathways of topically applied minoxidil foam. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, n. 76, p. 450-453, 2010.

BRASIL. Lei n. 9.787. Altera a Lei n. 6.360, de 23 de setembro de 1976, que dispõe sobre a vigilância sanitária, estabelece o medicamento genérico, dispõe sobre a utilização de

nomes genéricos em produtos farmacêuticos e dá outras providências. Diário Oficial da União, 1999.

BUHL A. E.; WALDON D.; BAKER, C. A.; JOHNSON, G. A. Minoxidil sulfate is the active metabolite that stimulates hair follicles. *Journal of Investigative Dermatology*, v. 95, n. 5, p. 533-537, 1990.

ELIAS, P. M. The skin barrier as an innate immune element. *Semin Immunopathol*, v. 29, n. 1, p. 3-14, 2007.

ELLIS, J. A.; SINCLAIR, R. D. Male pattern baldness: current treatments, future prospects. *Drug Discovery Today*, v. 13, p. 791-797, 2008.

EMFAL ESPECIALIDADES QUÍMICAS. Ficha de informação técnica: Álcool Etílico de Cereais. 2015. Disponível em: <<http://emfal.com.br/alcool/>>. Acesso em: 05 maio 2017.

GELFUSO, G. M. Desenvolvimento de sistemas de liberação para a administração tópica e passiva de iontoforese do minoxidil no tratamento da alopecia androgênica. Tese (Doutorado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2009.

GELFUSO, G. M.; GRATIERI, T.; SIMÃO, P. S.; FREITAS, L. A. P.; LOPEZ, R. F. V. Chitosan microparticles for sustaining the topical delivery of minoxidil sulphate. *Journal of Microencapsulation*, v. 28, p. 650-8, 2011.

GELFUSO, G. M.; GRATIERI, T.; DELGADO-CHARRO, M. B.; GUY, R. H.; VIANNA LOPEZ, R. F. Iontophoresis-targeted, follicular delivery of minoxidil sulfate for the treatment of alopecia. *J Pharm Sci*. v. 102, n. 5, p. 1488–94, 2013.

GORECKI, D. K. *Analytical Profiles of Drugs Substances*, v.17, p. 185, 1988.

GRATIERI, T.; GELFUSO, G. M.; LOPEZ, R. F. V. Princípios básicos e aplicação da iontoforese na penetração cutânea de fármacos. *Química Nova*, v. 31, n. 6, p. 1490-1498, 2008.

GRICE, J. E. ; CIOTTI, S. ; WEINER, N. ; LOCKWOOD, P. ; CROSS, S. E. ; ROBERTS, M. S. Relative Uptake of Minoxidil into Appendages and Stratum Corneum and Permeation through Human Skin In Vitro. *Journal of Pharmaceutical Science*, v. 99, n. 2, 2010.

HARRIS, M. I. N. C. *Pele: Estrutura, propriedades e envelhecimento*. Editora Senac, 2009.

KUDLACEK, P. E.; CLEMENS, D. L.; ANDERSON, R. J. Characterization of recombinant human liver thermolabile phenol sulfotransferase with minoxidil as the substrate. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, v. 210, n. 2, p. 363-369, 1995.

KWACK, M. H.; KANG, B. M.; KIM, M. K.; KIM, J. C.; SUNG, Y. K. Minoxidil activates β -catenin pathway in human dermal papilla cells: a possible explanation for its anagen prolongation effect. *J Dermatol Sci*. v. 62, n. 3, p.154-9, 2011.

LEAL, L. B.; ARAUJO, T. P.; CHAGAS, S. C. C.; ANDRADE, A. R. B.; BEDOR, D. C. G.; SANTANA, D. P. Registro de medicamentos genéricos tópicos dermatológicos: cenário brasileiro e estudos para demonstração de bioequivalência. *Visa em Debate*, v. 5, n. 1, 2017.

MATOS, B. N. Desenvolvimento de uma formulação tópica contendo nanopartículas de quitosana como estratégia para aumentar a penetração folicular do minoxidil sulfato no tratamento da alopecia androgênica. *Dissertação (mestrado)*. Universidade de Brasília, 2014.

MATOS, B. N.; REIS, T. A.; GRATIERI, T.; GELFUSO, G. M. Chitosan nanoparticles for targeting and sustaining minoxidil sulphate delivery to hair follicles. *Int J Biol Macromol*, v.75, p. 225–229, 2015.

MEIDAN, V. M.; BONNER, M. C.; MICHINIAK, B. B. Transfollicular drug delivery-is it a reality? *International Journal of Pharmaceutics*, v. 306, p. 1-14, 2005.

MOSER, K.; KRIWET, K.; NAIK, A.; KALIA, Y. N.; GUY, R. H. Passive skin permeation enhancement and its quantification in vitro. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, v. 52, p. 103-112, 2001.

MULINARI-BRENNER, F.; SOARES, I. F. Alopecia androgenética masculina: uma atualização. *Revista Ciências Médicas*, v. 18, n. 3, p. 153-161, 2009.

NETZ, P.A.; ORTEGA, G.G. Fundamentos de físico-química: uma abordagem conceitual para as ciências farmacêuticas. Editora Artmed, 2002.

OYAFUSO, M. H. Desenvolvimento e caracterização de sistemas micro e nanoestruturados para a administração cutânea de acetato de dexametasona. Dissertação (mestrado). Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, 2012.

PROW, T. A.; GRICE, J. E. LIN, L. L.; FAYE, R.; BUTLER, M.; BECKER, W.; WURM, E. M. T.; YOONG, C.; ROBERTSON, T. A.; SOYER, H. P.; ROBERTS, M. S. Nanoparticles and microparticles for skin drug delivery. *Advanced Drug Delivery Reviews*, v. 63, p. 470-491, 2011.

RIVITTI, E. A. Manual de dermatologia clínica de Sampaio e Rivitti. Editora Artes Médicas, 2014.

ROUSSO, D. E.; KIM, S. W. A review of medical and surgical treatment options for androgenetic alopecia. *JAMA Facial Plast Surg*, v. 16, n. 6, p.44–50, 2014

SHORTER, K. ; FARJO, N. P. ; PICKSLEY, S. M. ; RANDALL, V. A. Human hair follicles contain two forms of ATPsensitive potassium channels, only one of which is sensitive to minoxidil. *The Journal of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, v. 22, p. 1725-1726, 2008.

SINCLAIR, R. Male pattern androgenic alopecia. *British Medical Journal*, n. 9, p. 317-865, 2004.

SOARES, K. C.C.; SANTOS, G.M.L., GELFUSO, G.M.; GRATIERI, T. An update of the Brazilian regulatory bioequivalence recommendations for approval of generic topical dermatological drug products. *AAPS J.* v. 17, p. 1517-8, 2015.

STORPIRTIS, S.; GAI,M.N.; CAMPOS,D.R.; GONÇALVES, J.E.; *Farmacocinética básica e aplicada.* Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2011.

THE MERCK INDEX. 12nd ed., Merck & Company, Rathway, 1987.

WILLIAMS, A.C; BARRY, B.W. Permeations Enhancers. *Advanced Drug Delivery Reviews*, v.64, p. 603-618, 2004.

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