

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E DE TECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

ESTRATÉGIAS PARA A DETERMINAÇÃO DE MINOXIDIL

Rogério Adelino de Sousa*

Tese apresentada como parte dos requisitos para
obtenção do Título de DOUTOR em
CIÊNCIAS, área de concentração QUÍMICA
ANALÍTICA

Orientador: Prof. Dr. Éder Tadeu Gomes Cavalheiro

*Bolsista CNPq

SÃO CARLOS – SP

2009

**Ficha catalográfica elaborada pelo DePT da
Biblioteca Comunitária/UFSCar**

S725em

Sousa, Rogério Adelino de.

Estratégias para a determinação de minoxidil / Rogério Adelino de Sousa. -- São Carlos : UFSCar, 2009.
166 f.

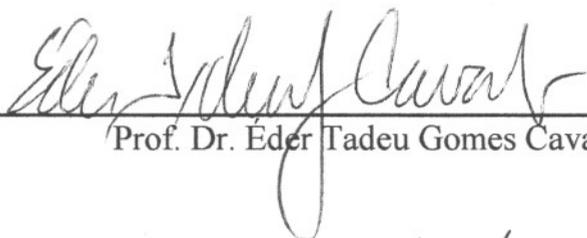
Tese (Doutorado) -- Universidade Federal de São Carlos, 2009.

1. Química analítica. 2. Minoxidil. 3. FIA (Flow Injection Analysis). 4. Eletroanalítica. 5. Cromatografia líquida de alta eficiência. 6. Ressonância magnética nuclear. I. Título.

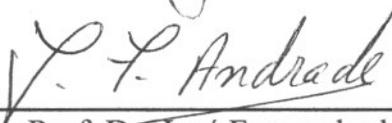
CDD: 543 (20^a)

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
Centro de Ciências Exatas e de Tecnologia
Departamento de Química
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA
Curso de Doutorado

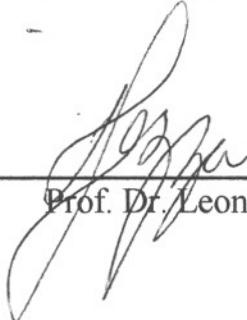
Assinaturas dos membros da banca examinadora que avaliaram e aprovaram a defesa de tese de doutorado do candidato Rogério Adelino de Sousa, realizada em 04 de setembro de 2009:



Prof. Dr. Eder Tadeu Gomes Cavalheiro



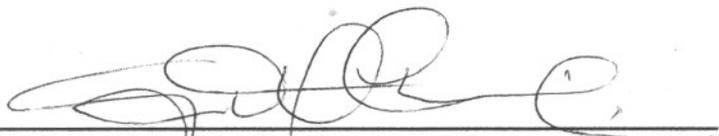
Prof. Dr. José Fernando de Andrade



Prof. Dr. Leonardo Pezza



Profa. Dra. Marisa Spirandeli Crespi



Prof. Dr. Gilberto Orivaldo Chierice

O desafio de percorrer um trajeto repleto de obstáculos torna-se mais suave quando temos apoio e incentivo de pessoas que amamos, portanto dedico esta tese aos meus pais, irmã, esposa e familiares pelo apoio e incentivo despendidos a me auxiliar nesse desafio.

*Ao Prof. Dr. Éder Tadeu Gomes Cavalheiro toda a
minha gratidão pela orientação, credibilidade,
paciência e pela grande amizade.*

AGRADECIMENTOS

- Aos meus pais e minha irmã pelo apoio, confiança e incentivo.
- À minha esposa, Raquel, pelo incentivo, confiança, amparo e paciência.
- Ao Prof. Dr. Christopher M. A. Brett, pela orientação durante o estágio PDEE realizado no laboratório de eletroquímica da Universidade de Coimbra, Coimbra, Portugal.
- Ao Prof. Dr. Antônio Gilberto Ferreira (DQ-UFSCar) pelo auxílio nos experimentos de ressonância magnética, pelas discussões científicas, comentários críticos e pela amizade.
- Aos membros da banca examinadora; Profa. Dra. Marisa Spirandeli Crespi (IQ/UNESP; Araraquara), Prof. Dr. Leonardo Pezza (IQ/UNESP; Araraquara), José Fernando de Andrade (FFCLRP/USP; Ribeirão Preto) e Prof. Dr. Gilberto Orivaldo Chierice (IQSC/USP; São Carlos).
- Ao amigo Glimaldo Marino pela grande amizade, pelos conselhos, comentários críticos e apoio.
- Ao amigo Prof. Dr. Gilberto Orivaldo Chierice pela amizade, pelos comentários críticos.
- Ao amigo Luiz Antônio Ramos, por toda ajuda e pela amizade.
- Aos meus grandes amigos Yuri, Igor e Vitor, pela amizade e pelo apoio.
- Aos amigos Carla, Madalina, Madi, Rasa, Ricardo e Edilson por todo auxílio prestado em Coimbra.
- Ao amigo Salvador pela amizade e pelo fornecimento da poliuretana.
- Aos amigos do LATEQS e GQATP (em especial ao Felipe, Toni, Rita, Sidney (Puff), Ivana, Gilbert (Grawby), Juliana (la tête rouge) e Rafael)
- Aos inúmeros amigos do DQ-UFSCar
- Ao PPGQ-UFSCar
- Às meninas do PPGQ-UFSCar, Ariane, Cristina e Luciane, por toda ajuda.
- Aos amigos do IQSC-USP.
- Ao IQSC / USP.

APRESENTAÇÃO

Esse trabalho propõe estratégias para determinação de minoxidil (3-óxido-2,4-diamino-6-pipedinopirimidina), um poderoso vasodilatador usado nos tratamentos da *Hipertensão Arterial* e da *Alopécia Areata*. As estratégias para a determinação de minoxidil propostas aqui envolvem procedimentos de análise em fluxo com detecção espectrofotométrica, determinações eletroanalíticas e cromatográficas. Também são apresentados os resultados da caracterização da estrutura do produto da oxidação química do minoxidil.

O texto é apresentado em capítulos, ordenados por assuntos e divididos em seções e subseções descritos a seguir.

A Introdução, Capítulo 1, apresenta as considerações sobre as propriedades do analito e suas aplicações nos tratamentos da *Hipertensão Arterial* e *Alopécia Areata*, e uma revisão bibliográfica. No Capítulo 2 são apresentados os objetivos desse trabalho.

O Capítulo 3 descreve a Parte Experimental, a qual consiste nos reagentes e soluções, equipamentos usados nesse trabalho, descrição do procedimento de confecção dos eletrodos compósitos de grafite-poliuretana e grafite-borracha de silicone e, finalmente, o método comparativo.

Nos Resultados e Discussão, Capítulo 4, são apresentadas três propostas de determinação de minoxidil usando dois procedimentos de análise em fluxo com detecção espectrofotométrica, com duas configurações distintas, eletroanalítica utilizando os eletrodos compósitos de grafite-poliuretana e grafite-borracha de silicone e um procedimento cromatográfico, usando HPLC com detecção na região do ultravioleta. Também é descrita nesse capítulo, a caracterização do produto de oxidação química do minoxidil.

Finalmente, são apresentados, nos Capítulos 5 e 6, as Considerações Finais e as Referências Bibliográficas citadas ao longo do texto, respectivamente.

RESUMO

ESTRATÉGIAS PARA A DETERMINAÇÃO DE MINOXIDIL

No presente trabalho, são apresentados métodos para a determinação minoxidil (MX) em amostras comerciais e eletrólitos de plasma e urina sintéticos. O MX é um fármaco que, devido à sua propriedade vasodilatadora, é usado no tratamento da *Hipertensão Arterial* e no tratamento da *Alopécia Areata* (calvice). Foram analisadas três amostras comerciais, *Regaine*[®] (Pharmacia, EUA), formulação de uso tópico manipulada pela Farmácia de Manipulação Porto Bianco (São Carlos, Brasil) e o *Loniten*[®] (Rhodia, Brasil), sendo o primeiro e o segundo soluções de uso tópico contendo 2 % (20 mg mL⁻¹ m/v) e 5 % (50 mg mL⁻¹ m/V) de MX, respectivamente; o terceiro medicamento é apresentado em forma de comprimidos contendo 10 mg de minoxidil, o qual é utilizado no tratamento da *hipertensão arterial*. Também foram analisados os teores de MX contido nos eletrólitos do plasma e da urina artificiais. Nesse trabalho foram propostas três metodologias para a determinação do MX nas amostras.

O primeiro procedimento foi a determinação de MX nas amostras usando análise em fluxo com detecção espectrofotométrica em duas configurações diferentes, as quais monitoraram a formação de um produto amarelado formado a partir da reação entre MX e HNO₂ formado *in situ*. A primeira configuração foi de linha única, com detecção no comprimento de onda de 400 nm, na qual foi possível quantificar o MX presente nas amostras, com recuperações de 99,7 e 104,8 % para o *Loniten*[®] e o *Regaine*[®], respectivamente, e 102,5 % para a amostra manipulada. Na segunda configuração, de zonas coalescentes e detecção 345 nm, o MX foi determinado nas amostras com recuperação entre 101,3 % para o *Loniten*[®], 99,8 % para o *Regaine*[®] e 103,7 % para o *Manipulado*. Observou-se, para ambas as configurações, que todos os resultados do método de análise em fluxo concordam com os valores rotulados das amostras analisadas e com os resultados do método cromatográfico (método comparativo), em 95 % de confiança (teste t-Student).

No segundo método, é descrita a determinação eletroanalítica de MX usando dois eletrodos compósitos de grafite-poliuretana (GPUE) e grafite-borracha de silicone (GSRE). Foi usada voltametria cíclica para a obtenção da área eletroativa dos eletrodos (GPUE = 0,093 cm²; GSRE = 0,089 cm²), do coeficiente difusão do MX (na ordem de 8,0x10⁻⁶ cm² s⁻¹) e para estudo do mecanismo da eletro-oxidação da MX, que é de um elétron por próton. Com o auxílio das curvas analíticas, foram determinados os teores de MX contidos nas amostras por diferentes técnicas voltamétricas, voltametria cíclica (CV), voltametria de onda quadrada (SWV) e voltametria de pulso diferencial (DPV), usando ambos os eletrodos. Os valores de recuperação estão no intervalo entre 96,0 e 110 %, dependendo da amostra e da técnica voltamétrica. A

espectroscopia de impedância eletroquímica descreveu qual o circuito elétrico foi equivalente à eletro-oxidação do minoxidil e, ainda, mostrou que há adsorção fraca e reversível para ambos os eletrodos.

O terceiro método descreve a determinação de MX e furosemida (FR), usando cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) com detecção espectrofotométrica. Os comprimentos de onda de detecção foram 275 e 285 nm para a FR e o MX, respectivamente. A fase móvel usada foi metanol/trietilamina (99:1; V/V) na vazão de 0,5 mL min⁻¹. A coluna usada foi uma C18 da *Supelco*[®]. As recuperações foram 97,7 e 102,4 % para o *Loniten*[®] e o *Furosem*[®], respectivamente.

Finalmente, é apresentada a caracterização do produto de oxidação do MX. Para a caracterização, foi usada a espectroscopia de infravermelho e as informações obtidas foram comparadas com os resultados obtidos na ressonância magnética nuclear de prótons. Foram propostas, através das técnicas IR e RMN, duas estruturas resultantes da reação redox entre o MX e o KMnO₄, o desoximinoxidil e uma outra estrutura, inédita na literatura o 3,5-dióxido-2,4-dinitro-6-piperidinopirimidina.

ABSTRACT

STRATEGIES FOR THE DETERMINATION OF MINOXIDIL

In this work methods for determining minoxidil (MX) in commercial samples and electrolytes of synthetic plasma and urine are presented. The minoxidil is a pharmaceutical whose blood vessel dilation property is used in the treatment of the *Arterial Hypertension* and in the treatment of the *Alopécia Areata*. Three commercial samples were analyzed, the *Regaine*[®] (Pharmacia, USA) and the magistral formulation (Porto Bianco, Brazil) both are topical use solutions, in a mixture of ethanol and propilenoglicol as vehicle, containing 2 % (20 mg mL⁻¹) and 5 % of minoxidil (50 mg mL⁻¹) respectively, and *Loniten*[®] (Rhodia, Brasil) containing 10 mg of MX per tablet. Three proposals for the determination of minoxidil in commercial samples and electrolytes of synthetic plasma and urine were considered.

The first procedure was the determination of MX in the samples using flow injection analysis with spectrophotometric detection in two setups. For the setup procedure using single line with a wavelength of 400 nm, which can quantify the MX present in samples, showing recovery values of 99.7 and 104.8 % for *Loniten*[®] and the *Regaine*[®] respectively, and 102.5 % for the magistral sample. In merging-zones setup, the detection was in 345 nm, the MX was determined in the samples with recovery 101.3 % for *Loniten*[®] and 99.8 % to *Regaine*[®] and 103.7 % for the magistral. For both configurations, all the results from flow agree with the labeled values and the results from the chromatographic method (comparative method) in 95 % confidence (t-Student test).

In the second procedure, an electroanalytical determination of MX is described using two composite electrodes, the graphite-polyurethane (GPUE) and graphite-silicone rubber (GSRE). Cyclic voltammetry was used to study the electroactive area of electrodes (GPUE = 0.093 cm²; GSRE = 0.089 cm²), the diffusion coefficient of MX (in order of 8.0 x10⁻⁶ cm² s⁻¹) and to study the mechanism of electro-oxidation of MX of which involves one electron per proton. With the support of analytical curves were determined the levels of MX in the samples by different voltammetric techniques; cyclic voltammetry (CV), square wave voltammetry (SWV) and differential pulse voltammetry (DPV). The recovery values are in the range between 96.0 and 110 %, depending on the sample and the voltammetric technique. The electrochemical impedance spectroscopy showed that the mass transport is controlled by diffusion and also there is a weak and reversible adsorption that for both the electrodes.

The third method describes the determination of MX and furosemide (FR) using high performance liquid chromatography (HPLC) with spectrophotometric detection. The wavelengths of 275 and 285 nm were for the detection of FR and MX respectively. The mobile phase used was methanol/triethylamine (99:1, V/V) in the flow rate of 0.5 mL min⁻¹. The column

used was a C18 *Supelco*[®]. The recoveries were 97.7 and 102.4 % for *Loniten*[®] and *Lasix*[®] respectively.

Finally is presented the characterization of the product of oxidation of MX. The informations obtained from infrared spectroscopy technique, were compared with results obtained by nuclear proton magnetic resonance. Two structures were proposed as product of redox reaction between the MX and KMnO_4 , the desoximinoxidil and another new structure.

LISTA DE TABELAS

TABELA 1.1.: Características farmacocinéticas e dosagem oral de MX.....	3
TABELA 1.2: Incidência de <i>HA</i> na população norte americana	6
TABELA 1.3: Classificação clínica quanto ao nível da pressão arterial (PA)	7
TABELA 1.4: Indicação de tratamento de acordo com o grupo de risco e o nível de PA	8
TABELA 1.5: Distribuição das referências, no período de 1983 a 2009, em função do método de determinação de minoxidil, pesquisa atualizada até meados de 2009	11
TABELA 3.6: Constituintes para o preparo das soluções dos eletrólitos do plasma e urina artificiais	24
TABELA 3.7: Soluções utilizadas para o controle do pH nos estudos eletroanalíticos do minoxidil.....	27
TABELA 3.8: Valores obtidos pelo método comparativo e valores dos rótulos das amostras comerciais, dados em mg mL^{-1}	29
TABELA 4.9: Níveis usados para cada variável, no planejamento fatorial, para otimizar o sistema FIA	41
TABELA 4.10: Arranjo dos níveis em relação às variáveis	41
TABELA 4.11: Resultados obtidos nos experimento usando o planejamento fatorial 2^2 experimentos.....	43
TABELA 4.12: Resultados da segunda bateria de experimentos	44
TABELA 4.13: Parâmetros definidos para a análise por injeção em fluxo.....	46
TABELA 4.14: Resultados da análise das amostras comerciais e dos eletrólitos do plasma e urina artificiais usando o método proposto	48
TABELA 4.15: Níveis usados para cada variável, no planejamento fatorial, para otimizar o sistema FIA	50
TABELA 4.16: Planejamento fatorial dos 32 experimentos	51
TABELA 4.17: Combinação dos experimentos gerando os efeitos de diferentes ordens: A – vazão; B – alça de amostragem (MX); C – alça de reagente (NaNO_2); D – reator helicoidal e E – percurso analítico	52

TABELA 4.18: Valores obtidos para cada ordem e a média das absorbâncias..	53
TABELA 4.19: Valores necessários para a obtenção da superfície de resposta	55
TABELA 4.20: Valor dos parâmetros para a melhor configuração do sistema FIA.....	56
TABELA 4.21: Resultados da análise das amostras.....	58
TABELA 4.22: Comparação entre alguns parâmetros obtidos para os métodos propostos	60
TABELA 4.23: Comparação dos valores da sensibilidade, limites de detecção e quantificação em cada ciclo voltamétrico registrado	73
TABELA 4.24: Resultados da análise das amostras utilizando CV	76
TABELA 4.25: Parâmetros estudados para a determinação de minoxidil por SWV	76
TABELA 4.26: Resultados do estudo dos parâmetros da SWV para a determinação de minoxidil	78
TABELA 4.27: Resultados obtidos na análise das amostras usando SWV.....	81
TABELA 4.28: Parâmetros estudados na otimização da DPV	82
TABELA 4.29: Parâmetros experimentais estudados para a determinação de MX usandoDPV	83
TABELA 4.30: Resultados das análises das amostras usando DPV	85
TABELA 4.31: Resultados das análises das amostras usando CV.....	100
TABELA 4.32: Valores de $I_{p,a}$ e de $W_{1/2}$ obtidos a partir dos estudos dos parâmetros da SWV.....	102
TABELA 4.33: Resultados das análises das amostras usando SWV	105
TABELA 4.34: Valores de amplitude, incremento de potencial e velocidade de varredura para a definição dos parâmetros da DPV	106
TABELA 4.35: Parâmetros experimentais estudados para a determinação de MX por DPV	108
TABELA 4.36: Resultados obtidos nas análises das amostras usando DPV ...	110
TABELA 4.37: Comparação de algumas figuras de mérito para os GPUE e GSRE em três técnicas na determinação de MX	119

TABELA 4.38: Valores de concentração de furosemida encontrados pelo método comparativo.....	133
TABELA 4.39: Resultados das análises individuais de MX e FR nas amostras comerciais.....	133
TABELA 4.40: Resultados das análises simultâneas de MX e FR contidos nas amostras comerciais	133
TABELA 4.41: Atribuições dos picos situados nas regiões A,B,C e D do espectro do MX	138
TABELA 4.42: Deslocamento químico δ (ppm) de ^1H , ^{13}C e ^{15}N para os compostos: material de partida (MX), 1 e 2 em DMSO-d ₆	139
TABELA 4.43: Deslocamento químico δ (ppm) de ^1H , e ^{13}C para os compostos: material de partida, 1 e 2 em DMSO-d ₆	140
TABELA 4.44: Deslocamento químico δ (ppm) de ^1H , e ^{15}N para os compostos: material de partida, 1 e 2 em DMSO-d ₆	141

LISTA DE FIGURAS

- FIGURA 4.1: Espectros das soluções de NaNO_2 na ordem de $10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$, MX a $5,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ diluído em HCl 10% V/V e do produto de reação com uma das bandas em 345 nm. 39
- FIGURA 4.2: Representação do sistema FIA de linha única usado na determinação de MX. 40
- FIGURA 4.3: Superfície de resposta para a otimização da alça de amostragem e do reator helicoidal. 45
- FIGURA 4.4: Sinais transientes referentes à variação de concentração de minoxidil, considerando o sinal do branco: bco – branco (HCl/ NaNO_2); A – $1,00 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$; B – $5,00 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$; C – $1,00 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$; D – $2,50 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$; E – $7,50 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$; F – $1,00 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$. Demais considerações são descritas na Tabela 4.13. 46
- FIGURA 4.5: Curva analítica com seis concentrações diferentes de MX com o desconto do valor da absorbância do branco. Os pontos representam a média de três determinações. 47
- FIGURA 4.6: Sistema de zonas coalescentes usada para a determinação de MX. 49
- FIGURA 4.7: Distribuição estatística dos valores para as diferentes ordens calculadas. 54
- FIGURA 4.8: Representação da superfície de resposta da combinação entre vazão e alça de amostragem de MX. 55
- FIGURA 4.9: Sinais transientes referentes à variação de concentração de minoxidil, considerando o sinal do branco: bco – branco; A – $1,00 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$; B – $5,00 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$; C – $1,00 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$; D – $2,50 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$; E – $5,00 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$; F – $7,50 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ 57
- FIGURA 4.10: Curva analítica com seis concentrações diferentes de MX com o desconto do valor da absorbância do branco. Os pontos representam o valor médio de 3 determinações. 58
- FIGURA 4.11: Voltamogramas cíclicos do $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ $5,00 \text{ mmol L}^{-1}$ em KCl $0,5 \text{ mol L}^{-1}$, com os sinais dos brancos (KCl $0,5 \text{ mol L}^{-1}$) descontados sob diferentes velocidades de varredura. 66
- FIGURA 4.12: Registros dos voltamogramas obtidos no estudo do efeito do pH no potencial de pico anódico do MX. 67

- FIGURA 4.13: Estudo do efeito do pH no potencial de oxidação do MX no intervalo de pH 1,97 a 4,96 o comportamento é “Nernstiano”..... 68
- FIGURA 4.14: Efeito da velocidade de varredura na corrente de pico anódico do MX; eletrólito HCl/KCl pH 2,5; $E_{p,a} = 840$ mV; intervalo de potenciais +300 a +1100 mV..... 70
- FIGURA 4.15: Influência da $v^{1/2}$ na $I_{p,a}$ indicando que transferência de carga é controlada por difusão; eletrólito HCl/KCl pH 2,5; $E_{p,a} = 840$ mV; intervalo de potenciais +300 a +1100 mV. 71
- FIGURA 4.16: Estudo do efeito da variação do intervalo potencial na $I_{p,a}$; eletrólito HCl/KCl pH 2,5; $E_{p,a} = 840$ mV; intervalo de potenciais +300 a +1100 mV; $[MX] = 6,65 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹, no detalhe o intervalo escolhido..... 72
- FIGURA 4.17: Comparação entre os 3 ciclos voltamétricos, $[MX] = 6,65 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹; eletrólito HCl/KCl pH 2,5; intervalo de potenciais +500 a +1100 mV; $E_{p,a} = 840$ mV..... 73
- FIGURA 4.18: Voltamogramas cíclicos relativos à adição de alíquotas de MX no intervalo de concentração entre $6,62 \times 10^{-6}$ a $3,15 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹; eletrólito HCl/KCl pH 2,5; intervalo de potenciais +500 a +1100mV; $E_{p,a} = 840$ mV..... 74
- FIGURA 4.19: Curva analítica para a determinação de MX usando voltametria cíclica; eletrólito HCl/KCl pH 2,5; janela +500 a +1100 mV; $E_{p,a} = 840$ mV. .. 75
- FIGURA 4.20: Voltamogramas cíclicos referentes ao estudo do efeito da variação dos valores dos parâmetros para a determinação de MX por SWV; eletrólito HCl/KCl pH 2,5; $[MX] = 3,23 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹. 77
- FIGURA 4.21: Estudo do efeito da variação do intervalo potencial na $I_{p,a}$; eletrólito HCl/KCl pH 2,5; $[MX] = 3,23 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹; $E_{p,a} = 840$ mV. Em detalhe, o intervalo selecionado. 79
- FIGURA 4.22: Voltamogramas relativos à adição de alíquotas de MX. Amplitude 50 mV; incremento de potencial 5 mV; frequência 25 Hz; eletrólito HCl/KCl pH 2,5; $E_{p,a} = 840$ mV; intervalo de potenciais +500 a +950mV..... 80
- FIGURA 4.23: Curva analítica do MX usando SWV. Amplitude 50 mV; incremento de potencial 5 mV; frequência 25 Hz; eletrólito HCl/KCl pH 2,5; $E_{p,a} = 840$ mV; intervalo de potenciais +500 a +950 mV. 81
- FIGURA 4.24: Voltamogramas de pulso diferencial com adição de alíquotas de MX. Amplitude 100 mV; incremento de potencial 20 mV; $v = 50$ mV s⁻¹; eletrólito HCl/KCl pH 2,5; $E_{p,a} = 720$ mV; janela de +550 a +1000 mV. 84

- FIGURA 4.25: Curva analítica do MX usando DPV: Amplitude 100 mV; incremento de potencial 20 mV; velocidade de varredura 50 mV s⁻¹; eletrólito HCl/KCl pH 2,5; $E_{p,a} = 720$ mV; intervalo de potenciais +550 a +1000 mV..... 85
- FIGURA 4.26: Registros dos espectros de impedância eletroquímica nos cinco potenciais estudados; OCP = 300 mV; [MX]= 6,25x10⁻⁴ mol L⁻¹; 1 – branco (HCl/KCl pH 2,5); 2 – [MX] = 6,25x10⁻⁴ mol L⁻¹ 87
- FIGURA 4.27: Circuito representa a interface da superfície do eletrodo e a dupla camada, segundo os estudos de impedância. 88
- FIGURA 4.28: Estudo do efeito da adsorção de MX pela superfície do GPUE usando impedância eletroquímica antes e depois da avaliação por voltametria cíclica; [MX] = 6,62x10⁻⁴ mol L⁻¹ 89
- FIGURA 4.29: Avaliação do efeito da adsorção de MX na superfície do GPUE usando CV; eletrólito HCl/KCl pH 2,46; $E_{p,a} = 840$ mV; intervalo de potenciais de +500 a +1100 mV; $\nu = 25$ mV s⁻¹; [MX] = 6,62x10⁻⁴ mol L⁻¹ 90
- FIGURA 4.30: Voltamogramas cíclicos da solução de K₃Fe(CN)₆ 5,00 mmol L⁻¹ em KCl 0,5 mol L⁻¹, em diferentes velocidades de varredura, com o sinal do branco (KCl 0,5 mol L⁻¹) descontado..... 92
- FIGURA 4.31: Registros da CV relativos ao estudo do efeito do pH no $E_{p,a}$ do MX; $\nu = 50$ mV s⁻¹; janela de +300 a +1100 mV; [MX] = 6,25 x 10⁻⁴ mol L⁻¹... 93
- FIGURA 4.32: Estudo da influência do pH no $E_{p,a}$ do MX; $\nu = 50$ mV s⁻¹; intervalo de potenciais de +300 a +1100 mV; [MX] = 6,25 x 10⁻⁴ mol L⁻¹ 94
- FIGURA 4.33: Voltamogramas cíclicos em pH 6,98: A) Intervalo de potenciais de +750 a +1100 mV no sentido positivo; B) Intervalo de potenciais de +300 a +1100 mV sentido negativo. 95
- FIGURA 4.34: Deconvolução da curva voltamétrica em pH 6,98 usado na avaliação do 1º processo e do 2º processo; no detalhe o voltamograma como foi obtido. Condições: $\nu = 50$ mV s⁻¹, [MX] = 6,25 x 10⁻⁴ mol L⁻¹, pH 6,98, janela entre +300 a +1100 mV..... 96
- FIGURA 4.35: Influência da $\nu^{1/2}$ na $I_{p,a}$ indicando que transferência de massa é controlada por difusão; eletrólito HCl/KCl pH 2,0; intervalo de potenciais de +300 a +1100 mV; $E_{p,a} = 860$ mV..... 97
- FIGURA 4.36: Estudo do efeito da variação do intervalo potencial na $I_{p,a}$; Eletrólito HCl/KCl pH 2,0; [MX] = 6,25 x 10⁻⁴ mol L⁻¹; $E_{p,a} = 860$ mV. Em detalhe, o voltamograma no intervalo +600 a +1100 mV. 98

- FIGURA 4.37: Estudo do efeito da variação da concentração de MX nos valores de $I_{p,a}$; em HCl/KCl pH 2,0; janela de +600 a +1100 mV; $E_{p,a} = 860$ mV. 99
- FIGURA 4.38: Curva analítica para a determinação de MX usando CV; em HCl/KCl pH 2,0; janela de +600 a +1100mV; $E_{p,a} = 860$ mV..... 100
- FIGURA 4.39: Voltamogramas de onda quadrada obtidos a partir do estudo da variação da amplitude, do incremento de potencial e da frequência; em HCl/KCl pH 2,0; janela de +300 a 1100 mV; $[MX] = 6,65 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹..... 101
- FIGURA 4.40: Estudo do efeito da variação do intervalo potencial na $I_{p,a}$; eletrólito HCl/KCl pH 2,0 $[MX] = 6,65 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹; $E_{p,a} = 860$ mV. No detalhe, o intervalo escolhido..... 103
- FIGURA 4.41: Estudo do efeito da adição sucessiva de alíquotas de solução estoque de MX nos valores de $I_{p,a}$; eletrólito HCl/KCl pH 2,0; intervalo de potenciais +600 a +1100 mV; $\nu = 50$ mV s⁻¹; $E_{p,a} = 860$ mV. No detalhe a deconvolução da curva SWV na concentração de MX = $1,14 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹... 104
- FIGURA 4.42: Curva analítica Estudo do MX; eletrólito HCl/KCl pH 2,0; intervalo de potenciais +600 a +1100 mV; $\nu = 50$ mV s⁻¹; $E_{p,a} = 860$ mV; no detalhe, a curva analítica. 105
- FIGURA 4.43: Voltamogramas referentes à avaliação da amplitude, do incremento de potencial e da velocidade de varredura para a determinação de MX por DPV; eletrólito HCl/KCl pH 2,0; $[MX] = 3,23 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹. 107
- FIGURA 4.44: Estudo do efeito da variação da concentração de MX nos valores de $I_{p,a}$. Amplitude = 100 mV; incremento de potencial = 20 mV; $\nu = 50$ mV s⁻¹; eletrólito HCl/KCl pH 2,0; $E_{p,a} = 795$ mV. 109
- FIGURA 4.45: Curva analítica do MX; Amplitude = 100 mV; incremento de potencial = 20 mV; $\nu = 50$ mV s⁻¹; eletrólito HCl/KCl pH 2,0; $E_{p,a} = 795$ mV. No detalhe, a curva analítica. 110
- FIGURA 4.46: Registros dos espectros de impedância eletroquímica nos cinco potenciais estudados; OCP = 175 mV; $[MX] = 6,25 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹; 1 – branco; 2 – $[MX] = 6,25 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹..... 112
- FIGURA 4.47: Circuito referente à interface da superfície do eletrodo e a dupla camada segundo estudos de impedância. 113
- FIGURA 4.48: Avaliação do efeito da adsorção de MX na superfície do GSRE usando CV (50 ciclos voltamétricos); em HCl/KCl pH 2,0; $E_{p,a} = 860$ mV; janela de +600 a +1100 mV; $\nu = 50$ mV s⁻¹, $[MX] = 6,25 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹. 114

- FIGURA 4.49: Avaliação do efeito da adsorção de MX na superfície do GSRE usando CV (50 ciclos voltamétricos) na ausência de MX na célula; em HCl/KCl pH 2,0; janela de +600 a +1100 mV; $\nu = 50 \text{ mV s}^{-1}$ 115
- FIGURA 4.50: Avaliação da variação $I_{p,a}$ provocada pela adsorção de MX na superfície do GSRE usando CV (50 ciclos voltamétricos); em HCl/KCl pH 2,0; $E_{p,a} = 860 \text{ mV}$; intervalo de potenciais +600 a +1100 mV; $\nu = 50 \text{ mV s}^{-1}$; $[\text{MX}] = 6,25 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ 116
- FIGURA 4.51: Avaliação da variação $I_{p,a}$ provocada pela adsorção de MX na superfície do GSRE usando CV (15 ciclos voltamétricos); em HCl/KCl pH 2,0; $E_{p,a} = 860 \text{ mV}$; intervalo de potenciais +600 a +1100 mV; $\nu = 50 \text{ mV s}^{-1}$; $[\text{MX}] = 6,62 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ 117
- FIGURA 4.52: Estudo do efeito da adsorção de MX pela superfície do GSRE usando impedância eletroquímica antes e depois da avaliação por CV. Condições: $[\text{MX}] = 6,62 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$, em KCl/HCl pH 2,10, $E_{p,a} = 860 \text{ mV}$. 118
- FIGURA 4.53: Espectros de absorção do MX e da FR, ambos diluídos em metanol/trietilamina (99:1V/V) em concentrações iguais de $5,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$. 125
- FIGURA 4.54: Cromatogramas obtidos na determinação simultânea de MX e furosemida nos comprimentos de onda 275 e 285 nm. 126
- FIGURA 4.55: Estudo do efeito da adição de 1% de trietilamina na fase móvel na resolução dos picos cromatográficos. Pico 1 – FR; Pico 2 – MX. 128
- FIGURA 4.56: Efeito da vazão na determinação simultânea de MX e FR. 129
- FIGURA 4.57: Avaliação da resolução e da seletividade em função do estudo do efeito da vazão de fase móvel. 130
- FIGURA 4.58: Curvas analíticas para a determinação simultânea de MX (B) e FR (A). 132
- FIGURA 4.59: Espectros de infravermelho do MX e do seu produto de oxidação. 137

SUMÁRIO

1. Introdução.....	1
1.1. Considerações gerais	2
1.1.1. Considerações sobre a Hipertensão Arterial	4
1.1.1.1. Classificação da Hipertensão Arterial.....	6
1.1.2. Considerações sobre a Alopecia Areata.....	8
1.2. Revisão bibliográfica.....	10
2. Objetivos	19
3. Parte experimental.....	21
3.1. Reagentes e soluções	22
3.2. Confecção dos eletrodos compósitos grafite poliuretana e grafite-borracha de silicone.....	24
3.3. Equipamentos	25
3.4. Método comparativo	29
4. Resultados e discussão	31
4.1. Determinação de MX em formulações farmacêuticas e fluídos biológicos sintéticos usando análise por injeção em fluxo com detecção espectrofotométrica	33
4.1.1. Considerações sobre Análise em fluxo	34
4.1.2. Otimização do sistema FIA	38
4.1.2.1. Determinação de MX usando FIA com detecção espectrofotométrica na região do visível	40
4.1.2.2. Planejamento fatorial.....	40
4.1.2.3. Curva analítica, figuras de mérito e determinação do MX	45
4.1.2.4. Teste de adição e recuperação.....	48
4.1.3. Determinação de MX usando FIA com detecção espectrofotométrica na região do UV	49

4.1.3.1. Planejamento fatorial.....	50
4.1.3.2. Curva analítica, figuras de mérito e determinação de MX	56
4.1.3.3. Teste de adição e recuperação.....	59
4.1.4. Conclusões.....	59
4.2. Estudo eletroanalítico de MX usando eletrodos compósitos de grafite-poliuretana e grafite-borracha de silicone	61
4.2.1. Considerações sobre eletrodos compósitos.....	62
4.2.2. Considerações sobre voltametria.....	63
4.2.3. Considerações sobre espectroscopia de impedância eletroquímica.....	64
4.2.4. Eletrodo compósito de grafite-poliuretana (GPUE).....	65
4.2.4.1. Medida da superfície eletroativa do eletrodo de GPUE e coeficiente de difusão do minoxidil.....	65
4.2.4.2. Determinação de MX usando CV	67
4.2.4.3. Determinação de MX Usando Voltametria de Onda Quadrada (SWV).....	76
4.2.4.4. Determinação de MX Usando Voltametria de Pulso Diferencial (DPV)	82
4.2.4.5. Estudos de Impedância Eletroquímica.....	86
4.2.4.6. Avaliação do efeito da adsorção de MX na superfície do GPUE.....	88
4.2.5. Eletrodo Compósito de Grafite-Borracha de Silicone	91
4.2.5.1. Medida da superfície eletroativa do eletrodo de GSRE e coeficiente de difusão do minoxidil.....	91
4.2.5.2. Determinação de MX usando CV	92
4.2.5.3. Determinação de MX Usando Voltametria de Onda Quadrada (SWV).....	101
4.2.5.4. Determinação de MX Usando Voltametria de Pulso Diferencial (DPV)	106
4.2.5.5. Estudos de Impedância Eletroquímica.....	111

4.2.5.6. Avaliação do efeito da adsorção de MX pela superfície do GSRE	113
4.2.6. Conclusões.....	118
4.3. Determinação de MX e FR em amostras comerciais usando cromatografia de alta eficiência (HPLC).....	121
4.3.1. Considerações sobre a furosemida	122
4.3.2. Justificativa.....	123
4.3.3. Espectros de absorção do MX e da FR na região do UV.....	125
4.3.4. Estudo do efeito da adição de trietilamina a fase móvel.....	127
4.3.5. Estudo do efeito da vazão da fase móvel nos picos cromatográficos do MX e da furosemida	129
4.3.6.. Curva analítica e análise das amostras	131
4.3.7. Conclusões.....	134
4.4. Caracterização da estrutura do produto de oxidação química do minoxidil	135
5. Considerações finais e perspectivas de trabalhos futuros	143
6. Referências	145
ANEXO I.....	153
ANEXO II	161

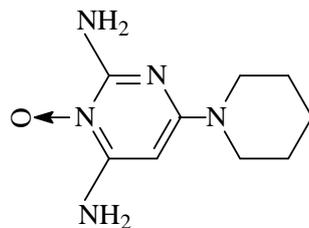
Lista de abreviações e símbolos

A	Área eletroativa
Abs	Absorbância
CPE	Elemento de fase constante
CV	Voltametria Cíclica
D_0	Coefficiente de difusão
DPV	Voltametria de Pulso Diferencial
$E_{p,a}$	Potencial de pico anódico
FIA	Análise por injeção em fluxo
FR	Furosemida
GPUE	Eletrodo compósito de grafite-poliuretana
GSRE	Eletrodo compósito de grafite-borracha de silicone
HÁ	Hipertensão arterial
HPLC	Cromatografia de alta eficiência
$I_{p,a}$	Corrente de anódico
$I_{p,c}$	Corrente de catódico
L	Litro
mL	Mililitro
MX	Minoxidil
[MX]	Concentração molar de minoxidil
N	Número de elétrons
OCP	Potencial de circuito aberto
[Ox]	Concentração de equilíbrio da espécie oxidada
QSP	Quantidade suficiente para
R_{ct}	Resistência ôhmica da transferência de carga
R_s	Resistência ôhmica da solução eletrolítica
SCE	Eletrodo de calomelano saturado
SWV	Voltametria de Onda Quadrada
UV	Ultravioleta
V	Volume
N	Velocidade de varredura
V/V	Volume/volume
$W_{1/2}$	Largura do pico à meia altura
Z_w	Impedância de <i>Warburg</i>
Λ	Comprimento de onda
Ω	Resistência

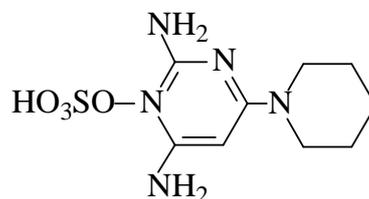
1.1. Considerações gerais

Este trabalho apresenta estudos sobre a determinação de minoxidil em formulações farmacêuticas, elucidação do seu produto de oxidação química e a aplicação de dois eletrodos compósitos sólidos no estudo eletroanalítico do MX.

O minoxidil, 3-óxido-2,4-diamino-6-piperidinopirimidina (MX), cuja fórmula estrutural é apresentada abaixo, é um pó cristalino branco, inodoro, insolúvel em água, acetona ou soluções alcalinas; pouco solúvel em alcoóis e bastante solúvel em soluções aquosas ácidas. Seu ponto de fusão é 188,43 °C, massa molar de 209,25 g mol⁻¹ e apresenta pK_a 4,61 (Budavari *et al.*, 2001; Po-Chang *et al.*, 2006).



O MX é um fármaco classificado como vasodilatador periférico, muito eficaz quando administrado oralmente na redução da pressão arterial (PA). Atua como uma pró-droga, a qual, quando ingerida, é metabolizada nos rins transformando-se na molécula ativa sulfato de minoxidil, cuja fórmula estrutural é representada abaixo. Cerca de 20% da dose ingerida de minoxidil é excretada pela urina sem modificação. (Anderson, Knoblen e Troutman, 2002).



O sulfato de minoxidil causa relaxamento da musculatura lisa dos vasos por ativação dos canais de potássio, permitindo fluxo intracelular deste íon, causando hiperpolarização celular. A droga dilata as artérias, mas não veias, ou seja, produz apenas vasodilatação arteriolar, causando ativação simpática

reflexa, taquicardia e retenção hidrossalina, devendo também ser usada sempre em conjunto com diuréticos e bloqueadores simpáticos (Anderson, Knoben e Troutman, 2002; Katzung, 2004; Nobre e Lima, 2000; Mano, 2009; Hipertension Arterial, 2005).

Para os casos de hipertensão severa, que não respondam às demais drogas, é prescrito o tratamento com MX. A dose inicial, administrada oralmente, é de 1,25 mg dia⁻¹ e deve ser aumentada gradativamente para, até, 40 mg dia⁻¹. As características farmacocinéticas do MX são apresentadas na Tabela 1.1 (Anderson, Knoben e Troutman, 2002; Katzung, 2004; Nobre; Lima, 2000; Mano, 2009; Hipertension Arterial, 2005).

TABELA 1.1.: Características farmacocinéticas e dosagem oral de MX (Katzung, 2004)

Fármaco	T_{1/2}**	Biodisponibilidade	Dose inicial*	Dose de manutenção
Minoxidil	3,1±0,6 h	90 %	5–10 mg/dia	40 mg/dia

*Ajuste posológico quando a droga causa diminuição da liberação de *creatinina* pela urina. O valor aceitável de liberação de *creatinina* é 30 mL min⁻¹;

**T_{1/2} = tempo de meia vida.

Alguns sintomas adversos surgem quando se administram doses orais inadequadas de MX, o paciente pode apresentar o quadro de taquicardia, palpitações, angina e edema. Cefaléia, sudorese e hirsutismo são sintomas adversos apresentados mais comumente em mulheres tratadas com MX (Katzung, 2004).

O hirsutismo causado pela propriedade vasodilatadora do MX propicia seu uso no tratamento da *Alopécia Areata*, conhecida como pelada, uma forma de calvície, que é uma doença que ocasiona a queda de pelos e cabelos em pontos distintos do corpo. O medicamento, na forma de solução tópica, é aplicado sobre a pele, diretamente no local em que ocorreu a queda de pelos ou cabelos (Ruiz-Medina *et al.*, 1999; Han *et al.*, 2004).

1.1.1. Considerações sobre a Hipertensão Arterial

O termo *Hipertensão Arterial* refere-se ao fluxo de sangue pelas artérias com uma pressão arterial superior àquela considerada como ideal. O conceito médico mais moderno sobre a *Hipertensão Arterial (HA)* define essa moléstia não mais como uma condição clínica, que apresenta valores tencionais acima de valores preestabelecidos, mas, sim, como uma síndrome, que engloba alterações hemodinâmicas, tróficas e metabólicas. As alterações hemodinâmicas, tróficas e metabólicas, causam o aumento da pressão sanguínea, resistência insulínica, microalbuminúria, dispilidemias, obesidade, aumento da atividade dos fatores de coagulação e hipertrofia da função diastólica, movimento de dilatação do coração, após a fase de contração, do ventrículo esquerdo (Nobre; Lima, 2000; Mano, 2009; Hipertension Arterial, 2005).

Alguns sintomas da *Hipertensão Arterial* são tonturas, dores de cabeça e sangramento pelo nariz. Entretanto, na maioria dos casos, a *Hipertensão Arterial* é uma doença silenciosa, isto é, ocorre sem provocar qualquer tipo de sintoma a não ser o aumento da pressão arterial. Anualmente, a maioria das mortes provocadas pela hipertensão arterial são atribuídas à disfunção do sistema cardiovascular e do sistema renal (Hipertension Arterial, 2005).

A *Hipertensão Arterial* pode levar seu portador aos quadros clínicos descritos abaixo (Hipertension Arterial, 2005):

- a. Arteriosclerose:** é o aumento do diâmetro das artérias, tornando-as menos flexíveis, permitindo o acúmulo de placas de gordura em suas paredes, obstruindo-as. A obstrução arterial faz com que os rins liberem um hormônio chamado *renina*, que ocasiona o aumento da pressão arterial.
- b. Cardiopatia hipertensiva:** é a ação da *arteriosclerose* sobre os vasos coronários que suprem o músculo cardíaco, miocárdio, com sangue. A *cardiopatia hipertensiva* aumenta a atividade coronária para manter o

fluxo sanguíneo. O aumento da atividade coronária resulta na dilatação do coração e na hipertrofia do miocárdio, tornando o coração mais rígido e resultando no acúmulo de líquido pelo corpo todo, devido ao bombeamento ineficaz.

- c. Enfermidades renais:** 20% do sangue bombeado se encontram nos rins, cuja função é filtrar e manter a concentração adequada de sais, ácidos e água. Como descrito no item **a**, se o fluxo de sangue é inadequado, os rins liberam a *renina*, que provoca a vasoconstrição por todo o corpo, gerando um ciclo vicioso que pode levar à falência da função renal.
- d. ICTUS:** palavra originária do latim, que se refere a todos os acidentes vasculares cerebrais (AVC). Refere-se ao ataque da arteriosclerose nos vasos cerebrais, causando obstrução dos vasos devido ao estreitamento, coágulo (trombose cerebral) ou ruptura do vaso (derrame cerebral).

Os quadros clínicos descritos acima podem ser amenizados com o tratamento adequado da hipertensão arterial.

Fatores de risco cardiovascular independentes são provocados pelos componentes desta síndrome. Os índices de morbidez e mortalidade não eram reduzidos com as propostas terapêuticas antigas, mesmo sendo elas eficazes no abaixamento significativo dos níveis de pressão arterial. Tratamentos modernos necessitam prever o impacto causado em todos os fatores da síndrome, isto é, não devem se resumir apenas à redução dos níveis de pressão arterial.

Constatou-se que nos Estados Unidos a incidência de *Hipertensão Arterial* é diretamente proporcional ao aumento da idade dos indivíduos, de ambos os sexos, da população. A maior incidência da *Hipertensão Arterial* é na população de indivíduos da raça negra em qualquer idade. A incidência da *HA* nos Estados Unidos considera faixas distintas de idade como apresentado na Tabela 1.2.

No Brasil, as estatísticas oficiais são difusas. Elas indicam que há uma prevalência média de 15 % da população adulta. Dependendo da região, essa prevalência varia de 9 a 30 %, sendo os pobres os mais atingidos pela *Hipertensão Arterial* e por acidentes cardiovasculares (Latufo e Lolio, 1996).

TABELA 1.2: Incidência de HA na população norte americana (Kaplan, 2001)

Faixas de idade*	Incidência de HA / %
Até 40 anos	10
de 41 a 60 anos	20
de 61 a 70 anos	40
Acima de 70 anos	60

* *Referente à população dos EUA*

As estatísticas são influenciadas pela migração, diferentes origens raciais e, também, pelos hábitos sociais e profissionais. A população urbana é mais sensível à *Hipertensão Arterial* que a população rural. Em 1995 foram atribuídas à *Hipertensão Arterial* 45% dos óbitos ocorridos no Brasil (Latufo e Lolio, 1996).

O desenvolvimento da *Hipertensão Arterial* é dependente da inter-relação entre a predisposição genética e os fatores ambientais. Todavia, o mecanismo desta interação não é exatamente conhecido. A *Hipertensão Arterial* é acompanhada por disfunção endotelial e alterações funcionais do sistema nervoso simpático, dos rins, da angiotensina e de outros mecanismos humorais.

1.1.1.1. Classificação da Hipertensão Arterial

A *Hipertensão Arterial* sistêmica é classificada pelo nível de pressão arterial (PA), associada a uma estratificação do risco (Mano, 2009). A Tabela 1.3 apresenta a classificação da *Hipertensão Arterial* com relação à pressão arterial.

TABELA 1.3: Classificação clínica quanto ao nível da pressão arterial (PA) (Mano, 2009)

Nível de PA / mmHg		Classificação
<i>Sistólica</i>	<i>Diastólica</i>	
< 120	< 80	Ideal
< 130	< 85	Normal
130 – 139	86 – 89	Normal alta
140 – 159	90 – 99	Hipertensão estágio 1
160 – 179	100 – 109	Hipertensão estágio 2
> 180	> 110	Hipertensão estágio 3

Dois aspectos são envolvidos na estratificação de risco:

- 1 – Fatores de risco maiores: tabagismo, dislipidemia, *Diabetes mellitus*, idade acima de 60 anos, sexo masculino, mulheres pós-menopausa e histórico familiar;
- 2 – Lesão de órgão-alvo: doenças cardíacas, hipertrofia do ventrículo esquerdo, angina, revascularização miocárdica, insuficiência cardíaca, nefropatia, doença arterial periférica e retinopatia diabética.

A estratificação de risco permite estabelecer três grupos de risco:

A – nenhum fator de risco

B – pelo menos um fator de risco

C – presença de lesão de órgão alvo ou de *Diabetes mellitus*.

O tratamento da *Hipertensão Arterial* é indicado com base na associação entre o nível da pressão arterial e o enquadramento em cada um dos grupos de risco acima. A Tabela 1.4 indica as normas de tratamento da hipertensão arterial, segundo VII Relatório Internacional do Joint National Committee (Manual de hipertensão arterial, 2003).

O tratamento não medicamentoso envolve mudança no estilo de vida referente aos hábitos alimentares e comportamentais. Tais mudanças envolvem redução de peso, redução da ingestão de sódio, aumento da ingestão de potássio, dieta rica em frutas e vegetais, menos alimentos com alto teor de

gordura, diminuição ou abolição do álcool e prática de atividade física (Appel, 2000).

TABELA 1.4: Indicação de tratamento de acordo com o grupo de risco e o nível de PA (Manual de hipertensão arterial, 2003)

Grupo de Risco	Classificação da PA	Tratamento adotado
<i>Grupo A</i> ¹	Normal – alta	Mudança de estilo de vida
	Estágio 1	Mudança de estilo de vida por até 12 meses
	Estágio 2 e 3	Tratamento medicamentoso
<i>Grupo B</i> ²	Normal	Mudança de estilo de vida
	Estágio 1	Mudança de estilo de vida por até 6 meses
	Estágio 2 e 3	Tratamento medicamentoso
<i>Grupo C</i> ³	Qualquer estágio	Tratamento medicamentoso

¹**A** – nenhum fator de risco; ²**B** – pelo menos um fator de risco; ³**C** – presença de lesão de órgão alvo ou de *Diabetes mellitus*.

Quando as medidas preventivas não são suficientes para o controle da PA, o tratamento medicamentoso deve ser adotado nos pacientes dos Grupos A e B com hipertensão no estágio 1 e imediatamente após diagnóstico no Grupo C em qualquer grau de Hipertensão Arterial. Recomenda-se que o tratamento não farmacológico seja mantido paralelamente (Manual de hipertensão arterial, 2003).

1.1.2. Considerações sobre a Alopécia Areata

A *Alopécia Areata* é uma doença caracterizada pela queda rápida e repentina de cabelos do couro cabeludo e/ou de qualquer outro lugar do corpo (barba, púbis, sobrancelhas, axilas, etc.). Esta doença atinge cerca 1,7% da população mundial. Até então, considerava-se que a *Alopécia Areata* era causada por processos infecciosos; entretanto, a *Alopécia Areata* foi descrita

como um problema de autoimunidade adquirido geneticamente e desencadeado por tensão emocional. A literatura descreve casos típicos de crianças, cujos pais se separaram, que desenvolveram casos muito graves da *Alopécia Areata* (Olsen *et al.*, 2004; Lenane *et al.*, 2005).

A hereditariedade é um fator crucial. Estima-se que 20% das pessoas que desenvolveram a *Alopécia Areata* tinham alguém na família com a doença. O indivíduo que desenvolve a doença com idade superior aos 30 anos, no entanto, reduz a probabilidade de seus descendentes apresentarem os sintomas (Olsen *et al.*, 2004; Lenane *et al.*, 2005).

A *Alopécia Areata* costuma se desenvolver em indivíduos que são descendentes de famílias cujos integrantes desenvolveram doenças autoimunes como asma, artrite reumatóide, lupus e vitiligo. Essa patologia também é comum em indivíduos portadores de Síndrome de Down (Sinclair; Dawber, 2004).

Na *Alopécia Areata*, os folículos capilares são atacados por engano pelo próprio sistema imunológico do indivíduo, resultando na interrupção do crescimento dos fios de cabelo. Geralmente inicia-se com pequenas falhas no couro cabeludo que diminuem espontaneamente em poucos meses. Em alguns casos, há progressão da queda de cabelos não só no couro cabeludo, mas também por todo corpo (Sinclair e Dawber, 2004).

A perda de cabelos não é o único sintoma da *Alopécia Areata*, também é comum ocorrer vários tipos de deformação nas unhas. Em alguns casos, as unhas ficam estriadas como se tivessem sido arranhadas por um alfinete ou ainda apresentam pontos em baixo relevo como se fosse um dedal. Nenhuma outra parte do corpo é afetada pela doença, a não ser unhas e cabelos (Lenane *et al.*, 2005; Sinclair e Dawber, 2004).

O tratamento mais conhecido é a aplicação de solução tópica de minoxidil, um vasodilatador de uso local com ação sobre os receptores androgênicos do pelo, ou seja, que ajuda a bloquear os derivados da testosterona. Se a queda for acentuada, pode-se prescrever a versão mais

concentrada, já que existem dois tipos de preparação: uma mais concentrada e outra mais diluída.

É preciso tomar cuidado porque nem tudo o que apresenta bons resultados para os homens pode ser indicado para as mulheres, uma vez que nelas os efeitos colaterais podem ser desagradáveis. Depois de aplicar o remédio no couro cabeludo, algumas mulheres desenvolveram barba na face e pelos nos braços, pernas, etc. (Olsen *et al.*, 2004; Lenane *et al.*, 2005; Sinclair e Dawber, 2004; Trüeb, 2002).

1.2. Revisão bibliográfica

Neste capítulo são apresentados 20 trabalhos sobre a determinação de MX usando diversos métodos, tais como métodos cromatográficos, eletroquímicos, espectrofotométricos, FIA e titulométricos. Os resumos estão ordenados em ordem cronológica decrescente (por ano de publicação).

Os artigos apresentados foram levantados continuamente ao longo dos trabalhos, junto às bases de dados *Web of Science* (Web of science, 2009) e *Scielo* (Scielo, 2009), as palavras-chave utilizadas na pesquisa de busca foram “*minoxidil and determination*”.

Trabalhos que discutem a aplicação do MX em tratamentos de doenças ou síndromes não foram considerados na pesquisa bibliográfica apresentada neste capítulo.

A Tabela 1.5 apresenta a distribuição dos trabalhos em função dos métodos utilizados para a determinação do fármaco. Pode-se considerar que foi encontrado um número pequeno de trabalhos sobre a determinação de MX, o que reforça a importância do presente trabalho e sua proposta de desenvolver métodos alternativos para a determinação desse fármaco.

TABELA 1.5: Distribuição das referências, no período de 1983 a 2009, em função do método de determinação de minoxidil, pesquisa atualizada até meados de 2009

Métodos para determinação de minoxidil	Número de artigos publicados
Cromatográficos	7
Espectrofotométricos	6
Eletroquímicos	3
Titulométricos	1
Análise em fluxo (FIA)*	1
Eletroforese	2
Total	20

*Detecção espectrofotométrica

Bordbar *et al.* (2009) desenvolveram um método espectrofotométrico para a determinação simultânea de MX e tretinoína, usando quimiometria (PLS e HPSAM) na otimização do sistema. O MX e a tretinoína foram determinados simultaneamente com relação de concentrações variando entre 2:1 a 1:33, respectivamente. Os autores também propuseram um método usando mínimos quadrados parciais para a calibração multivariada, para a análise de misturas binárias de tretinoína e MX. O erro relativo encontrado foi de 2,59 %, aplicando o método PLS em onze amostras no intervalo de concentração 0-10 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de tretinoína e 0-32 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de MX. Ambos os métodos quimiométricos propostos (PLS e HPSAM) foram aplicados na determinação de MX e tretinoína em amostras comerciais.

Attaran e Parham (2008) sugeriram um método espectrofotométrico para a determinação de MX, usando par iônico minoxidil-orange-II. Esse par iônico foi extraído quantitativamente em meio ácido usando diclorometano e a sua absorvância foi medida em 482 nm, sob temperatura ambiente. O efeito de diferentes variáveis tais como tipo de solvente, volume de solvente na extração, volume de reagente aniônico, pH, força iônica, tempo de extração e agitação foram investigados e otimizados para o maior desempenho da extração quantitativa de MX. A curva analítica é linear ao longo do intervalo de concentração de MX 0,3-6,0 mg mL^{-1} e $R = 0,9974$. O desvio padrão e erro

relativo, para 8 replicatas, foram respectivamente de $3,0 \mu\text{g mL}^{-1}$ e 3,54 %. O limite de detecção de MX foi de $43,2 \text{ mg mL}^{-1}$.

De Orsi *et al.* (2008) desenvolveram um método para determinação de MX em cosméticos usando cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC). Os detectores usados para determinação de minoxidil, progesterona, estrona, espirolactona, canrenona, hidrocortisona, triancinolona e acetona em produtos cosméticos foram os de fotodíodos (diode array) na região do UV (UV-DAD) e de espectroscopia de massa por ionização de *electrospray* (ESI-MS). A presença dessas substâncias em produtos cosméticos comerciais é proibida. Os compostos foram separados por cromatografia de fase reversa com água (0,1% de ácido trifluoroacético) e acetonitrila, em gradiente de eluição, e detectados por UV-DAD a 230, 254 e 280 nm, e por ESI-MS com ionização no modo positivo. A linearidade foi estudada usando os detectores UV-DAD no intervalo de concentração entre $1,50\text{-}1000 \mu\text{g mL}^{-1}$ ou $\mu\text{g g}^{-1}$ e o ESI-MS no intervalo de concentração de $50\text{-}1000 \text{ ng mL}^{-1}$ ou ng g^{-1} , dependendo do tipo e dos compostos e da preparação de cosméticos. Coeficientes de correlação de $r = 0,99$ foram obtidos tanto com ultravioleta (UV), quanto com ESI-MS. As recuperações para ambos os detectores (UV-DAD e ESI-MS) foram sempre superiores a 90% para os diferentes analitos. Este método foi aplicado com sucesso na determinação de substâncias ilegalmente adicionadas em loções e cremes cosméticos, vendidos pela Internet para evitar queda de cabelo e outras doenças cutâneas hormônio-dependente, como acne e hirsutismo.

Pfaffen e Ortiz (2006) investigaram o comportamento eletroquímico e propuseram um sistema para a quantificação amperométrica de MX, usando eletrodo de carbono vítreo em fluxo (FIA). O procedimento é baseado na oxidação eletroquímica do MX a $0,800 \text{ V}$ (*vs.* $\text{Ag/AgCl/NaCl } 3 \text{ mol L}^{-1}$) em uma solução tampão fosfato. A curva analítica se apresentou linear no intervalo de concentração de $1,0 \times 10^{-7}$ a $1,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$. As condições

otimizadas foram: $E_{p,a} = 0,800$ V; vazão de $0,74$ mL min^{-1} em pH 7,0 com frequência analítica de 120 injeções por hora.

Sousa e colaboradores (2005) propuseram um procedimento espectrofotométrico em fluxo contínuo baseado na reação de óxido-redução entre KMnO_4 e MX. Os melhores resultados na titulação foram obtidos usando concentrações de permanganato de $3,20 \times 10^{-4}$ mol L^{-1} e minoxidil, usado como titulante, da ordem de $1,00 \times 10^{-3}$ mol L^{-1} . Vazão de 17 mL min^{-1} foi fixada para as leituras fotométricas contínuas e o titulante foi adicionado em alíquotas de 500 μL , enquanto as mudanças de cor foram monitoradas em 550 nm. Recuperações da ordem de $97,6$ a $102,8$ % foram observadas, dependendo da amostra analisada. O método foi aplicado em amostras comerciais contendo MX e os resultados comparados com aqueles obtidos a partir de procedimentos cromatográficos, com erros relativos da ordem de $3,5$ a $4,0$ %.

Huang e colaboradores (2005) propuseram uma metodologia analítica baseada em cromatografia líquida com detecção eletroquímica (LC/CE), para a determinação de traço de MX contidos em folículos e pele de “hamster” após a administração tópica do fármaco. O MX acumulado nas glândulas sebáceas de orelhas dos animais foi extraído da pele e dos folículos em diferentes camadas e tratado com ácido tricloroacético aquoso seguido por acetonitrila. O sobrenadante foi injetado diretamente no sistema CL/CE e o MX foi detectado pela oxidação a 800 mV (*vs.* Ag/AgCl), usando um eletrodo de carbono vítreo. Recuperações entre $94,4$ e $103,1$ %, foram relatadas com linearidade até 250 $\mu\text{g mL}^{-1}$, com um coeficiente de regressão $r = 0,9988$.

Ruiz-Medina *et al.* (1999) desenvolveram um método para a determinação de MX usando um procedimento em fluxo, acoplado a um reator em fase sólida, com detecção espectrofotométrica. O analito foi concentrado em um reator com trocador iônico SP-Sephadex C25 empacotado e, após eluição, detectado em 282 nm. A solução transportadora foi HCl ($1,0 \times 10^{-2}$ mol L^{-1})/NaCl ($5,0 \times 10^{-2}$ mol L^{-1}). Observou-se um intervalo linear de concentração de MX de

0,05 a 7 $\mu\text{g mL}^{-1}$ com limite de detecção de 60 ng mL^{-1} . Os resultados do método proposto foram comparados com um método cromatográfico (HPLC) comparativo.

Zarghi *et al.* (1998) desenvolveram um método para a determinação de MX em plasma usando HPLC. O método proposto permite a quantificação de MX no monitoramento terapêutico, com um limite de detecção 0,5 ng mL^{-1} . A separação foi realizada em coluna C-18 (150 x 4,6 mm) após a devida extração do analito da matriz. O comprimento de onda foi fixado em 281 nm e a fase móvel foi uma mistura de acetonitrila e tampão fosfato 0,01 mol L^{-1} (60:40, V/V), contendo dodecil sulfato de sódio 2,5 mmol L^{-1} com pH ajustado para 3,5 e a vazão foi de 1 mL min^{-1} . A temperatura da coluna foi fixada em 50°C. A curva analítica apresentou um intervalo linear de 2 a 100 ng mL^{-1} .

Mahrous *et al.* (1992) desenvolveram um método espectrofotométrico para a quantificação simultânea de MX e tretinoína pelo método da primeira derivada. O método é baseado nos sinais obtidos do MX e tretinoína em 290 e 351 nm, respectivamente, sendo aplicada a primeira derivada (D1) nas curvas contendo os espectros dos analitos. O método D1 minimiza a interferência entre os sinais dos analitos ou qualquer outro tipo de interferência. A Lei de Beer foi obedecida no intervalo de concentração 2 a 10 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de MX e 0,25 a 1,25 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de tretinoína. O método proposto foi aplicado na determinação dos analitos em algumas formulações farmacêuticas manipuladas. O desvio padrão relativo para o método proposto para ambos os fármacos foram inferiores a 0,95 %.

Fanali *et al.* (1992) apresentaram considerações teóricas para justificar o efeito do campo elétrico aplicado sobre o tempo e migração, quer alterando a tensão e/ou o comprimento do capilar na determinação de MX em formulações farmacêuticas.

Arcos *et al.* (1991) desenvolveram dois métodos para investigar o equilíbrio ácido-base do MX. Os métodos propostos foram o polarográfico (redução) e o espectrofotométrico. O intervalo útil de concentração de MX foi de 1×10^{-5} a 5×10^{-4} mol L⁻¹, ambos os estudos foram realizados em diferentes pH e os valores dos pK_a foram calculados utilizando os resultados obtidos em ambas as técnicas.

Gagliardi *et al.* (1991) propuseram um método baseado em HPLC, usando fase reversa, para determinação simultânea de MX e tretinoína. Os limites de detecção foram 10 ng para o MX e 5 ng para a tretinoína com detecção em 283 e 367 nm, respectivamente. O método proposto foi aplicado para a análise dos analitos em formulações farmacêuticas e cosméticas comerciais.

Mahrous (1991) apresentou três métodos para a quantificação de minoxidil em um único trabalho: O primeiro método é baseado na formação do complexo tris *o*-fenantrolina de ferro (II) após a reação do MX com ferro (III)-*o*-fenantrolina em meio ácido. O complexo de ferroína foi medido colorimetricamente em 510 nm. O segundo método é baseado na interação de minoxidil, elétron doador, com o iodo, elétron receptor, gerando um composto molecular o qual pode ser detectado em 285 nm. O terceiro método foi baseado na interação de MX e cloranil em dioxano, levando à formação de complexos de transferência de carga quaternizado, sendo detectado em 610 nm. A Lei de Beer foi obedecida dentro do intervalo de concentração de 0,08 a 0,4 mg L⁻¹; 0,1 a 0,5 mg L⁻¹ e 5 a 25 mg L⁻¹, respectivamente.

Sastry e colaboradores (1991) desenvolveram um método para a determinação de MX usando 3-metil-2-benzotazolinona hidrazona (MBTH) e Fe (III) como o agente colorimétrico detectado em 500 nm. O método permitiu a determinação de 0,5 a 4,5 mg mL⁻¹ de MX. A exatidão e a precisão do método foram verificadas por HPLC.

Bonazzi *et al.* (1990) desenvolveram um método espectrofotométrico para a determinação seletiva e rápida de MX em

formulações farmacêuticas. O método baseia-se nas modificações características do espectro UV do MX induzida pela mudança de pH; a quantificação seletiva do MX se dá pela diferença do espectro, a qual pode ser obtida pela diferença de absorvância dada por $A = (A_{282,8} - A_{259,2})$. Como uma alternativa, um método usando a segunda derivada do espectro foi desenvolvido. Os métodos espectrofotométricos foram aplicados no controle de qualidade de formas farmacêuticas comerciais contendo MX e os resultados foram comparados com os obtidos por um método comparativo cromatográfico, HPLC.

Plakogiannis *et al.* (1989) avaliaram o melhor solvente, ou mistura de solventes, para extração do MX dos comprimidos de *Loniten*[®]. Os solventes estudados foram etanol, propilenoglicol, água e veículo/N – disponível comercialmente. Um total de vinte e cinco comprimidos de *Loniten*[®] contendo 10 mg de MX foram pulverizados para os testes de extração. A massa equivalente a um comprimido foi dispersa no solvente e agitada por dez minutos. A dispersão foi filtrada a vácuo e o resíduo sólido foi lavado duas vezes para obter um volume fixo do filtrado. A concentração de MX em cada sistema solvente foi determinada espectrofotometricamente em 280 e 282 nm, dependendo do solvente. A quantidade de MX extraída de cada amostra foi calculada utilizando uma curva padrão construída para cada solvente. A partir dos resultados obtidos, concluiu-se que o veículo/N é o melhor solvente para a extração, na ordem de 99% de rendimento.

Golden e Zoutendam (1987) usaram uma coluna de troca iônica de fase reversa usando detecção amperométrica para a determinação de MX livre em soro humano. A droga foi isolada do soro por extração em fase sólida, usando um cartucho descartável contendo coluna (C2) de etilsilano. A média absoluta de recuperação de MX no soro foi de 85%. Após a retirada do soro, a separação foi realizada por HPLC usando uma coluna Spherisorb-C 8. O método apresentou comportamento linear de 0,3 a 100 ng mL⁻¹ em amostras de soro às

quais uma quantidade conhecida de MX foi adicionada. Utilizando uma amostra de 1 ml de soro, o limite de detecção foi de 0,3 ng mL⁻¹.

Fanali, Cristalli e Catellani (1987) desenvolveram um método usando isotacoforese capilar com detecção no UV, para a quantificação de MX em amostras farmacêuticas. A curva analítica apresentou intervalo linear de concentração de MX de $1,0 \times 10^{-9}$ a $1,5 \times 10^{-8}$ mol L⁻¹, com coeficiente de correlação de 0,9997. As amostras comerciais usadas neste trabalho foram *Loniten*[®], *Prexidil*[®], ambos contendo 5 mg de MX por comprimido e uma solução tópica de concentração 20 mg mL⁻¹. O teste de recuperação apresentou valores no intervalo de 99 a 103%, dependendo da amostra comercial usada.

Asmus *et al.* (1984) descreveram um método de cromatografia líquida com detecção UV usando emparelhamento iônico para a determinação de MX em formulações farmacêuticas. O sistema cromatográfico era constituído por uma coluna microparticulada de octadecilsílica e a fase móvel era composta de dioctilsulfosuccinato de sódio aquoso em metanol (pH 3). A recuperação de MX foi de 99,1%.

Amankwa *et al.* (1983) propuseram um método eletroquímico, baseado em polarografia de pulso diferencial (DPP), para a análise de MX em formulações farmacêuticas. O MX foi extraído com metanol e o eletrólito suporte foi H₂SO₄ 0,50 mol L⁻¹. Foi obtida uma relação linear entre a concentração e a altura do pico, com um coeficiente de correlação de 0,9999 na região linear da curva analítica. Não houve interferência dos excipientes contidos no comprimido. Em solução ácida, foi proposto um mecanismo de redução em -1,2 V que envolve quatro elétrons transferidos, bem como a desidratação e a perda de uma amina descrita em duas etapas.

2. Objetivos

Este trabalho teve como objetivo central o desenvolvimento de estratégias para determinação de minoxidil usando diferentes técnicas analíticas.

Durante os trabalhos, surgiu a necessidade de caracterizar o produto de oxidação de MX em meio ácido, o que se tornou outro objetivo desse trabalho.

Para atingir esses objetivos foi necessário:

Isolar e caracterizar o produto de oxidação do MX usando-se espectroscopia de massas, espectroscopia na região do infravermelho e ressonância magnética;

Estudar o perfil voltamétrico do MX e determiná-lo, por voltametria cíclica (CV), de onda quadrada (SWV) e de pulso diferencial (DPV), usando eletrodos compósitos à base de grafite-poliuretana (GPUE) e grafite-borracha de silicone (GSRE);

Determinar o MX por análise por injeção em fluxo (FIA) com detecção espectrofotométrica;

Determinar o MX utilizando cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC).

3. Parte experimental

3.1. Reagentes e soluções

Os reagentes usados neste trabalho foram de grau analítico, PA ou de grau cromatográfico, dependendo da aplicação desejada. Nos dois casos os reagentes foram usados sem purificação prévia.

Todas as soluções foram preparadas com água purificada em um sistema Millipore Milli-Q (resistividade < 18 MΩ cm).

O MX utilizado como padrão foi adquirido junto à *Natural Pharma Produtos Farmacêuticos Ltda.* Segundo o laudo de análise emitido pelo fornecedor, o MX apresenta uma faixa de pureza de 99,0 a 99,5 %.

As soluções de HCl foram preparadas pela diluição direta do ácido (Mallinckrodt, México) estoque em água. A solução de NaNO₂ foi preparada pela dissolução direta do sal (Sinth, Brasil) em água. As soluções de etanol foram preparadas pela diluição direta de uma alíquota de etanol (Tedia, Brasil) em água. A fase móvel usada no procedimento cromatográfico foi preparada pela diluição de 1 % de trietilamina (Vetec, Brasil) em 99 % de metanol grau HPLC (Tedia, Brasil).

As amostras comerciais analisadas foram:

Regaine[®]: Medicamento, aplicado no tratamento de *Alopécias*, apresentado na forma de solução tópica contendo 2 % de MX (20 mg mL⁻¹), 5 % de propileno glicol e etanol QSP. A bula com os componentes de cada comprimido é apresentada no Anexo I. O *Regaine*[®] é fabricado nos Estados Unidos da América pelo laboratório Pharmacia e seu uso foi descrito por Zhong e colaboradores (Zhong *et al.*, 1998a; Zhong *et al.*, 1998b).

Solução tópica manipulada: medicamento apresentado na forma de solução tópica, aplicada no tratamento de *Alopécias*, contendo 5 % de MX (50 mg mL⁻¹), 5 % (V/V) de propileno glicol e etanol QSP, este medicamento foi preparado na Farmácia de Manipulação Porto Bianco, São Carlos/SP.

Loniten[®]: medicamento utilizado no tratamento da *Hipertensão Arterial*, é apresentado na forma de comprimidos contendo 10 mg de MX por

comprimido. O *Loniten*[®] é fabricado no Brasil pela *Rhodia Pharma* e a bula é apresentada no AnexoII.

O preparo de amostra para aplicação dos métodos propostos para quantificação de MX contido no *Loniten*[®] foi feito pesando-se individualmente dez comprimidos, a partir do que se determinou a massa média de cada comprimido. Após a pesagem, os 10 comprimidos foram pulverizados em almofariz e pistilo de porcelana. Então, à massa relativa a um comprimido, foram adicionados 25,00 mL de etanol (PA), a mistura ficou sob agitação mecânica durante duas horas, em seguida, decantaram-se os produtos não solúveis e filtrou-se a amostra. Da solução etélica filtrada de MX foi retirado um volume exato, para obtenção de uma concentração conhecida de MX, e transferido para um balão volumétrico. No balão, com o auxílio de N₂ gasoso, o etanol foi evaporado. Estes volumes variaram de acordo com o método a ser empregado nas determinações.

Para a quantificação do MX contido no *Regaine*[®] foi necessário apenas a diluição de um volume exato da solução tópica do medicamento em solução específica para cada método proposto neste trabalho.

Os métodos propostos neste trabalho também foram aplicados para a quantificação de MX contidos em soluções dos eletrólitos de plasma (Liu *et al.*, 2006) e urina sintéticos (Laube, Mohr e Hesse, 2001). Uma massa exata de MX foi dissolvida em volumes exatos de eletrólitos do plasma e de urina artificiais, totalizando a concentração final de analito em 25 $\mu\text{mol L}^{-1}$. As proporções dos sais para o preparo das soluções dos eletrólitos do plasma e urina artificiais são apresentadas na Tabela 3.6.

Os eletrólitos de plasma e urina sintéticos contendo MX não necessitaram de tratamento, apenas foram diluídos em soluções específicas ou adicionados diretamente aos sistemas de análises propostos.

Cada método proposto usou uma forma diferenciada para a dissolução do MX.

TABELA 3.6: Constituintes para o preparo das soluções dos eletrólitos do plasma e urina artificiais (Liu et al., 2006; Laube, Mohr e Hesse, 2001)

Constituintes	Quantidade dos constituintes / g L ⁻¹	
	Urina	Plasma
CaCl ₂ .2H ₂ O	1,103	
NaCl	2,925	8,036
Na ₂ SO ₄	2,25	0,072
KH ₂ PO ₄	1,40	-
KCl	1,60	-
NH ₄ Cl	1,00	-
NaHCO ₃	-	0,352
KCl	-	0,225
Na ₂ HPO ₄ .3H ₂ O	-	0,238
MgCl ₂ .6H ₂ O	-	0,311
CaCl ₂	-	0,293
pH	6,0	7,4

No método em fluxo, o MX extraído do *Loniten*[®] e as diluições de alíquotas de *Regaine*[®], e das soluções dos eletrólitos do plasma e da urina sintética contendo MX, foram dissolvidos em uma solução de HCl 0,1% (V/V).

Nos métodos eletroanalíticos, o MX padrão, o MX extraído do *Loniten*[®] e as diluições de alíquotas de *Regaine*[®] e das soluções dos eletrólitos do plasma e da urina sintética contendo MX, foram dissolvidos em uma solução etanol/água 1:1 (V/V).

Para o método cromatográfico, o MX padrão, o MX extraído do *Loniten*[®] e as diluições de alíquotas de *Regaine*[®] foram dissolvidos em metanol/trietilamina 99:1 (V/V), usado com fase móvel.

3.2. Confeção dos eletrodos compósitos grafite poliuretana e grafite-borracha de silicone

O eletrodo compósito grafite-poliuretana foi construído seguindo a seguinte sequência: preparou-se a resina poliuretana (PU) misturando-se pré-polímero A-249 e polioliol B-471 (0,85/1 m/m), ambos da Poliquil (Araraquara/SP, Brasil). Em seguida, misturou-se resina de poliuretana em quantidades

adequadas de pó de grafite, 1-2 μm (Aldrich), visando a atingir 60% de grafite (m/m); homogeneizou-se a mistura grafite/PU com o auxílio de um almofariz e pistilo de vidro durante 10 minutos. Após a homogeneização, o material foi compactado e extrusado (diâmetro de 3,6 mm) com o auxílio de uma prensa; a cura do compósito ocorre após 24 horas à temperatura ambiente, então o material foi cortado em tarugos de 50 mm de comprimento. O contato elétrico foi estabelecido com auxílio de cola de epóxido de prata em hastes de cobre, sendo o conjunto compósito haste de cobre selado em tubo de vidro (diâmetro de 5 mm) com resina epóxi não condutora. A superfície do eletrodo foi polida em uma politriz (Arotec, APL 2000) em lixa 600 e α -alumina 1 μm (Arotec) (Mendes, Claro Neto, S.; Cavalheiro, 2002; Mendes, Cervini e Cavalheiro, 2006).

A construção do eletrodo compósito grafite-borracha de silicone foi feita conforme descrita inicialmente por Oliveira *et al.* (2008): misturaram-se quantidades adequadas de pó de grafite, 1-2 μm (Aldrich) à borracha de silicone (BS) comercial (Pulvitec[®]) na proporção de 70 % de grafite (m/m); em seguida, homogeneizou-se a mistura grafite-BS em almofariz e pistilo de vidro por 10 minutos; a mistura foi inserida num tubo vidro de 3,0 mm de diâmetro. O compósito foi compactado com o auxílio de haste de cobre, de mesmo diâmetro do tubo de vidro, em uma prensa hidráulica com pressão na ordem de 5 Kgf durante 24 horas. Então, o contato elétrico foi estabelecido, colando-se o compósito prensado na haste de cobre com cola de epóxido de prata. A superfície do eletrodo GSRE foi polida em lixa 600 e α -alumina 1 μm (Arotec), com o auxílio de uma politriz (Arotec, APL 2000).

3.3. Equipamentos

Análise em fluxo

Para a propulsão das soluções, foi utilizada uma bomba peristáltica Ismatec IPC – 8 canais. Usaram-se tubos de tygon e de polietileno com 0,8 mm

de diâmetro interno (Fiotubos), para a condução das soluções e dos reagentes. Com o auxílio de um espectrofotômetro Genesis 20 (Spectronics), foram executadas as medidas dos sinais espectrofotométricos na região do visível e para as medidas na região do UV foi utilizado um espectrofotômetro Multspec 1500 (Shimadzu). Os experimentos foram realizados à temperatura ambiente (na ordem de 25°C).

Procedimento eletroanalítico

Para os estudos voltamétricos, foi usado um potenciostato/galvanostato μ -Autolab Type II gerenciado pelo programa GPES 4.9 (Eco Chemie). As medidas de espectroscopia de impedância eletroquímica foram realizadas em um Solartron 1250 Frequency Response Analyser, acoplado a um Solartron 1286 Electrochemical (Solartron Analytical, Reino Unido), gerenciado pelo programa ZPlot 2.4.

A célula eletroquímica foi formada por três eletrodos, sendo o eletrodo de referência de calomelano saturado (SCE), o contraeletrodo uma placa de platina de 1,0 cm² e os eletrodos de trabalho eram os eletrodos compósito grafite-poliuretana (GPUE) e o compósito grafite-borracha de silicone (GSRE). Na célula, foram adicionados 15,00 mL de eletrólito.

As soluções usadas nos estudos de pH foram preparadas seguindo as formulações apresentadas na Tabela 3.7. O maior valor de pH estudado foi 8,0 devido à baixa solubilidade do MX em soluções alcalinas.

TABELA 3.7: Soluções utilizadas para o controle do pH nos estudos eletroanalíticos do minoxidil

Parte A ^{a,b}	Parte B ^{a,b}	pH _{medido}
25,0 mL KCl	6,5 mL HCl	2,00
25,0 mL KCl	3,20 mL HCl	2,50
3,7 mL NaAc	46,3 mL HAc	3,30
13,2 mL NaAc	36,8 mL HAc	4,00
41,2 mL NaAc	8,80 mL HAc	5,30
6,15 mL Na ₂ HPO ₄	43,9 mL NaH ₂ PO ₄	5,80
30,5 mL Na ₂ HPO ₄	19,5 mL NaH ₂ PO ₄	6,90
42,4 mL Na ₂ HPO ₄	2,65 mL NaH ₂ PO ₄	8,00

a – A concentração das soluções usadas no preparo foi 0, 200 mol L⁻¹

b – Parte A + Parte B + diluição para 100 mL.

Procedimento cromatográfico

As medidas dos espectros de absorção do MX e da FR foram obtidos em um espectrofotômetro MultSpec 1500 (Shimadzu). O equipamento cromatográfico usado nas quantificações do MX e da FR foi um sistema de cromatografia de alta eficiência HPLC LC 6AD Shimadzu, com coluna cromatográfica C-18 58230-U (150 x 4,9 mm, 5 µm) (Supelco[®]) e detector UV SPD-10A VP (Shimadzu), gerenciado pelo software CLASS VP (Shimadzu).

Caracterização do produto de oxidação do MX

As medidas de espectroscopia de infravermelho foram realizadas em um Espectrômetro de Infravermelho com Transformada de Furrier (FTIR) da 5SXC (Nicolet), as pastilhas contendo os analitos foram preparadas usando KBr anidro (Baker) como suporte na proporção de 1:100 $m_{\text{analito}}/m_{\text{KBr}}$ e foram prensadas a 7 ton cm⁻² com o auxílio de uma prensa hidráulica.

Todas as medidas de ressonância magnética nuclear de próton foram realizadas em um equipamento de 9,4 T (400 MHz para frequência do hidrogênio), utilizando-se as sondas BBI (detecção inversa) e BBO (detecção direta) de 5mm de diâmetro interno, mantendo-se a temperatura constante 303 K durante todo o experimento, utilizando-se DMSO-d₆ como solvente e TMS como referência interna.

Os espectros de hidrogênio foram obtidos utilizando-se um tempo de aquisição (AQ) de 7,4 s, tempo de espera entre o pulso (d1) 1,0 s, janela espectral (SWH) de 4433 Hz, sendo processados sem o emprego de nenhuma função de apodização e *zero-filling*.

Os mapas de contorno gCOSY foram obtidos utilizando-se um tempo de espera (AQ) de 1,0 s, tempo de aquisição (AQ) de 0,46 s e janela espectral (SWH) de 4433 Hz nas duas dimensões. No processamento, utilizou-se 1 K de pontos para as duas dimensões (SIF1 e SIF2) e em ambas utilizaram-se as funções de apodização *seno*, sendo o parâmetro lb =1 Hz para F2 e lb = 0,3 Hz, gb = 0,1 Hz para F1.

Os mapas de contorno gHSQC foram obtidos utilizando-se um tempo de espera (d1) de 1,0 s, tempo de aquisição (AQ) de 0,46s e janelas espectrais (SWH) de 4433 e 20161 Hz para F2 e F1, respectivamente. Os espectros foram processados empregando-se 1K de pontos em ambas as dimensões e usando as funções de apodização *seno* quadrado (*qsine*) com os parâmetros lb =1,0 e 0,3 Hz, gb = 0,0 e 0,3 Hz e ssb = 2,0 e 2,0 Hz para as dimensões F2 e F1, respectivamente.

Os mapas de contorno ^1H - ^{13}C gHMBC foram obtidos utilizando-se um tempo de espera (d1) de 1,0 s, tempo de aquisição (AQ) de 0,46 s e janelas espectrais (SWH) de 4433 e 20161 Hz para F2 e F1, respectivamente. Os espectros foram processados utilizando-se 1K de pontos em ambas as dimensões e usando as funções de apodização *seno* quadrado (*qsine*) com os parâmetros lb =1,0 e 0,3 Hz, gb = 0,0 e 0,3 Hz e ssb = 2,0 e 2,0 Hz para as dimensões F2 e F1, respectivamente. Para a observação de constantes de acoplamento a longa distância (d8), foi utilizado um tempo de espera de 1,7 ms, correspondente a uma constante de acoplamento de 8 Hz.

Os mapas de contorno ^1H - ^{15}N gHMBC foram obtidos utilizando-se um tempo de espera (d1) de 2,0s, tempo de aquisição (AQ) de 0,44s e janelas espectrais (SWH) de 4708 e 20243 Hz para F2 e F1, respectivamente. Os

espectros foram processados utilizando-se 2K e 512 de pontos e usando, em ambas, as funções de apodização *seno* quadrado (*qsine*) com os parâmetros $ssb = 2,0$ e $2,0$ Hz para as dimensões F2 e F1, respectivamente. Para a observação de constantes de acoplamento a longa distância (d8), foi utilizado um tempo de espera de 0,67 ms, correspondente a uma constante de acoplamento de 15.

3.4. Método comparativo

Todas as amostras comerciais usadas neste trabalho foram submetidas a um método comparativo para determinação da concentração de MX. O método usado foi o descrito por Zarghi *et al.* (1998), o qual consiste em um procedimento de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC).

Seguindo as recomendações daqueles autores, as condições usadas foram: detecção no comprimento de onda de 254 nm, fase móvel metanol / água (80:20), vazão de $1,3 \text{ mL min}^{-1}$, coluna C-18 (150 x 3,9 mm, 4 mm) (Supelco®). O sistema cromatográfico foi um HPLC LC-6AD (Shimadzu) com detector espectrofotométrico SPD-10A VP (Shimadzu).

Os valores de concentração de MX contido nas amostras comerciais, obtidos no método comparativo, são apresentados na Tabela 3.8.

TABELA 3.8: Valores obtidos pelo método comparativo e valores dos rótulos das amostras comerciais, dados em mg mL^{-1}

Amostra	Rótulo	Comparativo*
<i>Loniten</i> ®	10	$10,1 \pm 0,3$
<i>Regaine</i> ®	20	$21,1 \pm 0,8$
<i>Manipulado</i>	50	$52,7 \pm 0,1$

* n = 3 (valores médios)

4. Resultados e discussão

4.1. Determinação de MX em formulações farmacêuticas e fluídos biológicos sintéticos, usando análise por injeção em fluxo com detecção espectrofotométrica

4.1.1. Considerações sobre Análise em fluxo

O conceito da análise por injeção em fluxo (FIA) foi desenvolvido originalmente por Ruzicka e Hansen e envolve a injeção de um volume de amostra em uma linha de solução transportadora com fluxo contínuo (Ruzicka e Hansen, 1975). A amostra se dispersa no reagente carregador, formando um produto, que é monitorado continuamente. Desde o desenvolvimento do conceito original, muitas variações neste método básico foram desenvolvidas (Ruzicka e Hansen, 1979, 1986; Nóbrega *et al.*, 1991; Rocha e Nóbrega, 1997).

De acordo com o tipo de fluxo usado na análise, os procedimentos são classificados como fluxo contínuo, fluxo segmentado e *stoped-flow*.

A diferença essencial entre os sistemas envolvendo fluxo contínuo e os de fluxo segmentado fundamenta-se no fato de que, no último caso, a solução transportadora é intercalada com bolhas de ar. Tal diferença não é meramente operacional, pois os resultados obtidos nos sistemas contínuos e segmentados apresentam características físicas e químicas diferenciadas.

O termo *stoped-flow* é aplicado aos métodos em que o fluxo é interrompido por um certo intervalo de tempo, indicado a sistemas reacionais que necessitam de um tempo maior para as reações, ou seja, para reações com baixa velocidade com aplicação no acompanhamento de cinética de reação, entre outras. (Espinosa-Mansilla, Munoz De La Pena e Salinas, 1993).

Basicamente, um sistema FIA é composto por um dispositivo de propulsão, um injetor/comutador e um detector. O dispositivo da propulsão deve permitir um fluxo laminar e contínuo, sem pulsação. Geralmente é utilizada uma bomba peristáltica, porém a força da gravidade também é uma forma de propulsão. O injetor/comutador é usado para introduzir de forma rápida e precisa quantidades discretas de amostras na linha do reagente carregador. Finalmente, o detector monitora o sinal analítico gerado pelo(s) produto(s) da reação ou pelo próprio analito. Dependendo da natureza do sinal do analito, o monitoramento pode ser espectroscópico, potenciométrico ou amperométrico.

Tubos conectam todas as partes do sistema FIA e transportam os reagentes ao longo do *percurso analítico*, o qual é definido como a distância percorrida pela amostra entre o injetor/comutador e o detector. Portanto, diversos arranjos podem ser usados a fim de se alcançar o melhor desempenho analítico em termos de sensibilidade, limites de detecção e quantificação, estequiometria da reação, etc.

Entre os mais variados arranjos descritos para a análise em fluxo, os arranjos de linha única e de zonas coalescentes são os mais utilizados. O arranjo de linha única é o mais simples para sistemas FIA, tal arranjo consiste na injeção da amostra na linha da solução transportadora (reagente carregador), gerando um sinal transiente, que é monitorado por um detector. (Ruzicka e Hansen, 1975; 1979 e 1986; Semaan *et al.*, 2005).

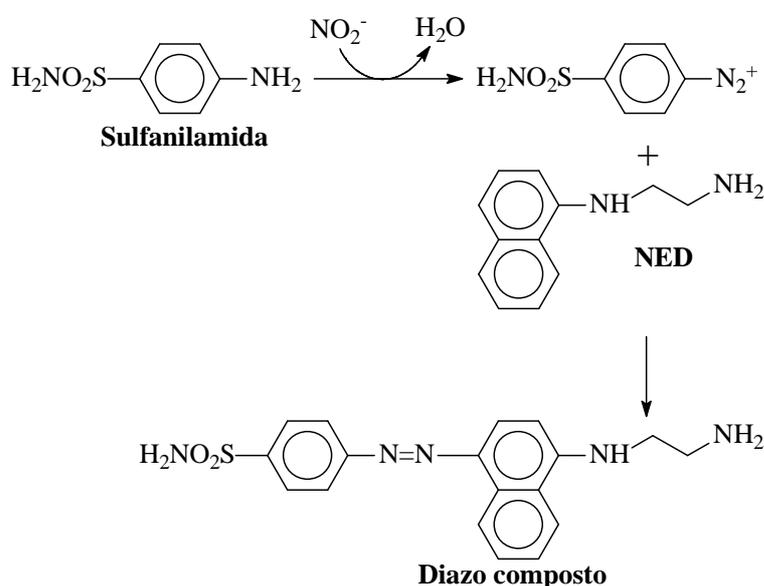
O arranjo de zonas coalescentes consiste em duas alças para injeção de amostras ou reagentes. Todos os experimentos podem ser executados utilizando um sistema FIA com zonas coalescentes (Rocha *et al.*, 2000). Estes sistemas foram inicialmente propostos para reduzir o consumo de reagentes e, conseqüentemente, o custo das análises e a geração de resíduos tóxicos. Posteriormente, foram utilizados para efetuar neutralização de amostras com elevada acidez (Reis *et al.*, 1989), determinações simultâneas (Reis, 1996), implementação da técnica de adições de padrão (Rocha *et al.*, 2000).

Os princípios e aplicações de análise por injeção em fluxo são amplamente discutidos na literatura (Reis *et al.*, 1989; Reis, 1996; Rocha *et al.*, 2000) e fogem aos objetivos desta introdução.

O método oficial para determinação do nitrito é conhecido como método de Griess (Ramos, Cavalheiro e Cavalheiro, 2006) e envolve, geralmente, os procedimentos nos quais o nitrito reage com a sulfanilamida em meio ácido. O diazo composto formado reage com o cloridrato de N-(1-naftil) etilenodiamina (NED), gerando um composto de coloração vermelha intensa, de

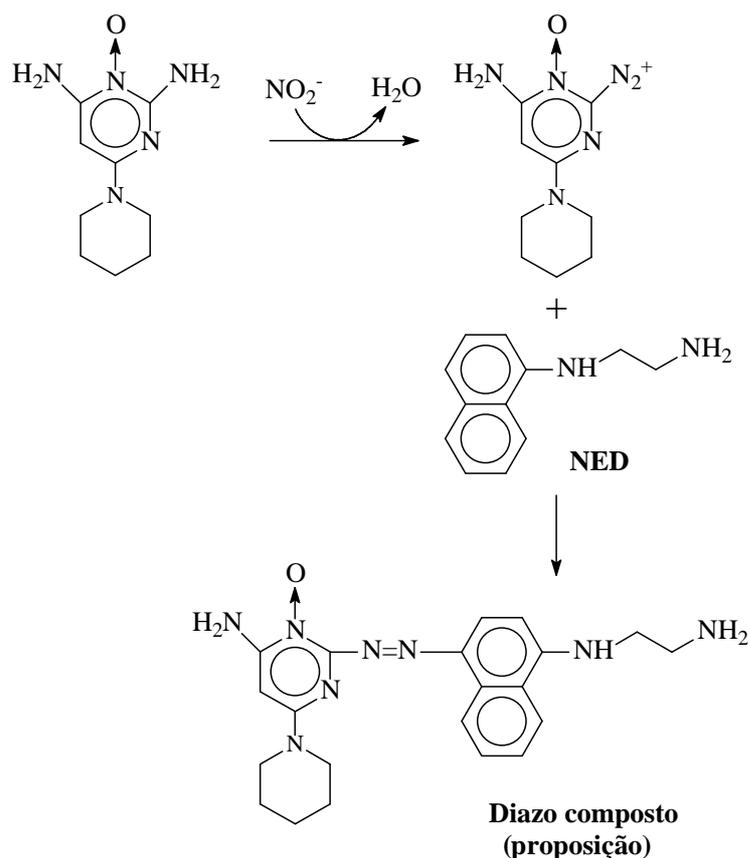
acordo a Equação 1. A reação é controlada pelo tempo, e o produto deve ser determinado entre 10 min e 2 h após a mistura dos reagentes.

A Equação 1 representa um mecanismo de reação usada no método de Griess, que foi proposto por Sawicki *et al.* após investigarem 52 sistemas diferentes (Ramos, Cavalheiro e Cavalheiro, 2006). Recentemente, um exemplo didático do uso da reação de Griess para a determinação de nitritos foi apresentado por Ramos, L. A.; Cavalheiro, C. C. S.; Cavalheiro, E. T. G. (2006).



Equação 1

Neste trabalho a proposta inicial era a substituição da sulfanilamida pelo MX, o qual se complexaria com NED formando o diazo composto colorido (Equação 2).



Equação 2

Nessa fase do trabalho, propôs-se o uso da reação de Greiss aproveitando a presença das aminas primárias aromáticas na molécula do MX para gerar o composto colorido que seria determinado espectrofotometricamente.

Todavia, observou-se que, ao se adicionar MX em meio de HCl à solução de NaNO_2 , havia a formação de um composto de coloração amarelada, mesmo antes de adicionar o NED. O produto da reação entre o MX e o NaNO_2 em meio de HCl apresentava variação da absorvância em função da variação da concentração de MX. Sendo assim, a seguir serão discutidos os resultados de dois métodos propostos para quantificação de MX usando FIA, com detecção espectrofotométrica na região do visível e na região do UV, monitorando-se o produto dessa reação.

A adição do NED ao sistema amarelado provoca a formação de uma coloração vermelha intensa, porém sem variação de absorvância em função da concentração de MX.

Portanto, foi feito um estudo da possibilidade de determinar MX apenas na presença de NaNO_2 (sem a adição de NED), usando detecção no UV (mais sensível) e no visível (menos sensível).

O propósito de se utilizar duas configurações para a determinação de MX usando FIA com detecção espectrofotométrica (detecção na região do visível e o na região do UV), era explorar as diferenças de sensibilidade nos dois comprimentos de onda e a interferência do HNO_2 no UV. Como alternativa, pode-se usar um sistema mais sensível em baixas concentrações e um menos sensível em concentrações mais elevadas.

4.1.2. Otimização do sistema FIA

Inicialmente, foram obtidos espectros do NaNO_2 , MX em meio de HCl 10% (V/V) e da mistura reacional para definir os máximos de absorção para cada caso. Os resultados são apresentados na Figura 4.1.

O produto de reação entre o MX e o NaNO_2 (em meio ácido) apresenta uma coloração amarelada com pico de absorção em 233 nm, o qual mostrou-se pouco útil para a determinações quantitativas devido à interferência dos demais reagentes.

Entretanto, há um a banda de absorção na região de 350 nm, a qual está livre dessas interferências e foi escolhida para os estudos na região do UV.

Para estudos na região do visível, escolheu-se o λ de 400 nm, no qual se observa diferença significativa entre a absorbância dos reagentes e do produto de reação. Apesar de não representar um pico de absorção, as medidas realizadas nesse λ podem permitir o uso de equipamentos mais simples, como os fotômetros, diminuindo os custos das análises e tornando os procedimentos

úteis, por exemplo, em farmácias de manipulação, que usam concentrações relativamente mais elevadas.

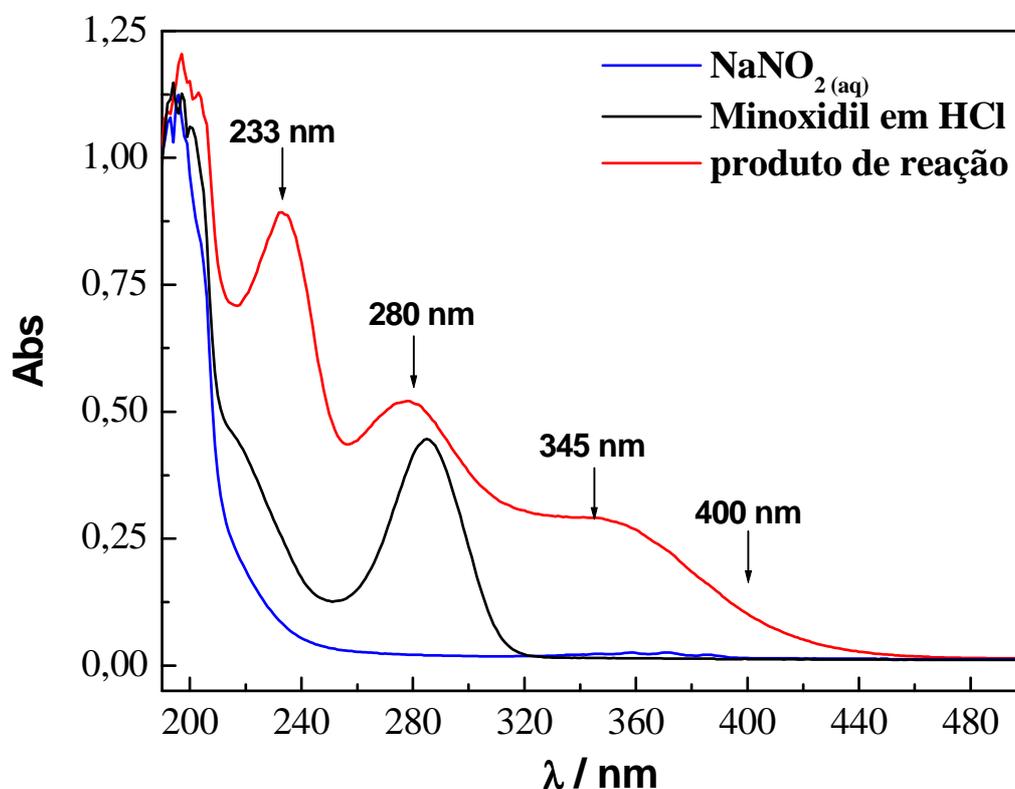


FIGURA 4.1: Espectros das soluções de NaNO_2 na ordem de $10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$, MX a $5,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ diluído em HCl 10% V/V e do produto de reação com uma das bandas em 345 nm.

Fixando-se a concentração de MX em determinados valores: $5,0 \times 10^{-7}$, $5,0 \times 10^{-6}$, $5,0 \times 10^{-5}$, $5,0 \times 10^{-4}$, $5,0 \times 10^{-3}$, $2,0 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$, (o analito foi detectado em concentrações maiores ou iguais a $5,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$); buscaram-se as concentrações de HCl e NaNO_2 que resultassem na melhor sensibilidade, com menor consumo de reagentes, para o uso no sistema FIA.

Os melhores resultados foram obtidos usando-se HCl 0,1% (V/V) e $1,0 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$ de NaNO_2 .

4.1.2.1. Determinação de MX usando FIA com detecção espectrofotométrica na região do visível

A proposta de determinação de MX usando FIA na região do visível consistiu no uso de um sistema em fluxo com configuração de linha única, usando solução transportadora de NaNO_2 , injetor/comutador em acrílico e detecção em 400 nm (Figura 4.2). Considerando o número de variáveis e a possibilidade de interferência múltipla a otimização foi feita usando um planejamento fatorial $2^n \rightarrow n=3$.

O procedimento proposto mede a variação de absorbância provocada pela reação entre o MX em meio de HCl e o NaNO_2 em temperatura ambiente. A solução de NaNO_2 foi utilizada como a solução transportadora em concentração de $1,0 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$ sendo a sua absorbância ajustada para zero, como linha base.

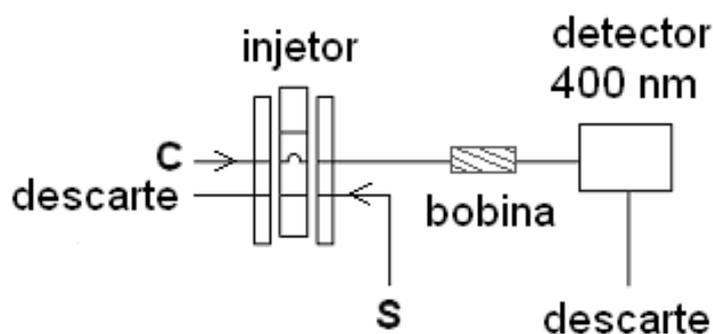


FIGURA 4.2: Representação do sistema FIA de linha única usado na determinação de MX.

4.1.2.2. Planejamento fatorial (Semaan et al., 2004; Sousa 2007)

O planejamento fatorial permite análise simultânea de variáveis no sentido de otimizar o sistema. No procedimento proposto, a análise fatorial foi utilizada para obter os melhores valores para vazão, alça de amostragem e o comprimento do reator helicoidal. As três variáveis analisadas simultaneamente

geraram 2^3 (oito) experimentos. Os cálculos estatísticos foram realizados com o auxílio do software *Microsoft Excell*[®] e as superfícies de respostas foram obtidas com auxílio do *WinSurf*[®]. As três variáveis foram avaliadas em relação aos níveis máximo e mínimo, de acordo com o planejamento fatorial apresentado na Tabela 4.9.

TABELA 4.9: Níveis usados para cada variável, no planejamento fatorial, para otimizar o sistema FIA

Variáveis	Níveis	
	Mínimo (-)	Máximo (+)
Alça de amostragem / cm	10,0	50,0
Vazão / mL min ⁻¹	1,38	5,54
Reator helicoidal / cm	50,0	200

Com o planejamento das variáveis a serem estudadas e os seus níveis definidos, procederam-se os estudos simultâneos, os quais foram executados no sentido de esclarecer os efeitos provocados pelas combinações das variáveis e seus níveis no sistema FIA (Tabela 4.10).

TABELA 4.10: Arranjo dos níveis em relação às variáveis

Experimentos	A	B	C	AB	AC	BC	ABC	Média
1	+	+	+	+	+	+	+	0,612
2	+	+	-	+	-	-	-	-0,0967
3	+	-	+	-	+	-	-	-0,152
4	+	-	-	-	-	+	+	-0,143
5	-	+	+	-	-	+	-	0,0428
6	-	+	-	-	+	+	-	0,0517
7	-	-	+	+	-	-	+	-0,0633
8	-	-	-	+	+	+	-	-0,115

A – alça de amostragem, **B** – reator helicoidal e **C** – vazão.

A partir da Tabela 4.10, são montadas equações para se avaliar quais efeitos e suas respectivas ordens são mais relevantes.

Os efeitos de primeira ordem foram calculados pelas Equações 3, 4 e 5, levando em consideração apenas uma variável com seus respectivos níveis e apresentaram as seguintes influências.

A) alça de amostragem: efeito bem pronunciado no sentido do nível maior (+);

B) reator helicoidal: efeito bem pronunciado no sentido do nível menor (-);

C) vazão: efeito pouco pronunciado.

$$A = (0,612 + 0,677 + 1,06 + 1,00 - 0,299 - 0,362 - 0,147 - 0,270) / 4 = 0,568 \quad \text{Equação 3}$$

$$B = (0,612 + 0,677 - 1,06 - 1,00 + 0,299 + 0,362 - 0,147 - 0,270) / 4 = -0,133 \quad \text{Equação 4}$$

$$C = (0,612 - 0,677 + 1,06 - 1,00 + 0,299 - 0,362 + 0,147 - 0,270) / 4 = -0,046 \quad \text{Equação 5}$$

Os efeitos de segunda ordem, calculados pelas Equações 6, 7 e 8, as quais levam em consideração a multiplicação entre duas variáveis (AB, AC, BC) e as respectivas multiplicações de seus níveis.

AB) alça de amostragem x reator helicoidal: efeito pronunciado no sentido do nível menor (-);

AC) alça de amostragem x vazão: efeito pronunciado no sentido do nível menor (-);

BC) reator helicoidal x vazão: efeito pronunciado no sentido do nível maior (+).

$$AB = (0,612 + 0,677 - 1,064 - 1,00 - 0,299 - 0,362 + 0,147 + 0,270) / 4 = -0,133 \quad \text{Equação 6}$$

$$AC = (0,612 - 0,677 + 1,06 - 1,00 - 0,299 + 0,362 - 0,147 + 0,270) / 4 = -0,016 \quad \text{Equação 7}$$

$$BC = (0,612 - 0,677 - 1,06 + 1,00 + 0,299 - 0,362 - 0,147 + 0,270) / 4 = 0,047 \quad \text{Equação 8}$$

O efeito de terceira ordem, calculado pela Equação 9, levou em consideração a multiplicação das três variáveis (ABC) e a resultante da multiplicação dos seus níveis.

(ABC) alça de amostragem x reator helicoidal x vazão – efeito pronunciado no sentido do nível maior (+).

$$ABC = (0,612 - 0,677 - 1,06 + 1,00 - 0,299 + 0,362 + 0,147 - 0,270) / 4 = 0,045 \quad \text{Equação 9}$$

Considerando-se os efeitos exercidos pelas variáveis sobre o desempenho do sistema proposto, apresentados nas Equações de 3 a 9, notou-se que o efeito direto da vazão sobre o sistema foi muito pouco pronunciado no sentido negativo, ou seja, a diminuição da vazão acarretará num incremento de sinal relativamente pequeno, porém com prejuízo na frequência analítica. Também foi observado que os valores resultantes obtidos pelas equações dos efeitos de 2ª ordem AC e BC e de 3ª ordem ABC, são diretamente influenciados pelo baixo valor do efeito da vazão, portanto, a influência da vazão, nesse caso, pode ser desconsiderada, sem prejuízo do desempenho analítico na determinação de MX.

Desta forma, foi proposto um novo planejamento fatorial de $2^2 = 4$ experimentos, considerando apenas os efeitos da alça de amostragem (A) e do reator helicoidal (B). A Tabela 4.11 apresenta os valores de absorvância encontrados nos experimentos executados seguindo o novo planejamento fatorial.

TABELA 4.11: Resultados obtidos nos experimento usando o planejamento fatorial 2^2 experimentos

Experimento	A	B	AB	Média
1	+0,508	+0,508	+0,508	+0,508
2	+0,131	-0,131	-0,131	-0,0438
3	-0,271	-0,271	+0,271	-0,0902
4	-0,583	+0,583	-0,583	-0,194
Σ	-0,214	+0,689	+0,0645	
<i>Média geral dos sinais</i>				0,0449

A = alça de amostragem; B = reator helicoidal.

Considerando apenas uma variável, as Equações se tornam:

$$A = (0,508 + 0,271 - 0,583 - 0,214) / 2 = -0,107 \quad \text{Equação 10}$$

$$B = (0,508 - 0,271 + 0,583 - 0,214) / 2 = 0,345 \quad \text{Equação 11}$$

e os efeitos de primeira são pronunciados da seguinte forma:

A) alça de amostragem: efeito bem pronunciado no sentido do nível menor (-)

B) reator helicoidal: efeito bem pronunciado no sentido do nível maior (+).

Considerando a combinação entre duas variáveis, nesse caso AB e seus respectivos níveis, tem-se:

$$AB = (0,508 - 0,271 - 0,583 + 0,214) / 2 = 0,0322 \quad \text{Equação 12}$$

Os efeitos de segunda ordem geraram:

AB) alça de amostragem x reator helicoidal: influência no sentido de menor nível (+);

A partir dos resultados obtidos nos novos experimentos, foi construída a Tabela 4.12, na qual são apresentados os resultados obtidos nas análises dos efeitos de primeira e segunda ordem. Considerando-se a fórmula apresentada na Equação 13, substituíram-se os valores apresentados na Tabela 4.12 nas respectivas incógnitas desta Equação, obtendo-se a Equação 14.

TABELA 4.12: Resultados da segunda bateria de experimentos

	A	B	AB
<i>Efeito</i>	-0,107	+0,345	+0,0322
Σ	-0,214	+0,689	+0,0645
<i>Efeito / 2</i>	-0,0535	+0,172	+0,0161

$$\text{Abs} = \text{média geral} + [(\text{efeitoA})/2].A + [(\text{efeitoB})/2].B + [(\text{efeitoAB})/2].AB \quad \text{Equação 13}$$

$$\text{Abs} = (0,0449 - 0,0535.A + 0,172B + 0,0161.AB) \quad \text{Equação 14}$$

Utilizando a Equação 14, construiu-se a superfície de reposta apresentada na Figura 4.3, a partir da qual se observou a variação da absorvância em função da combinação da variação dos valores da alça de amostragem e do reator helicoidal.

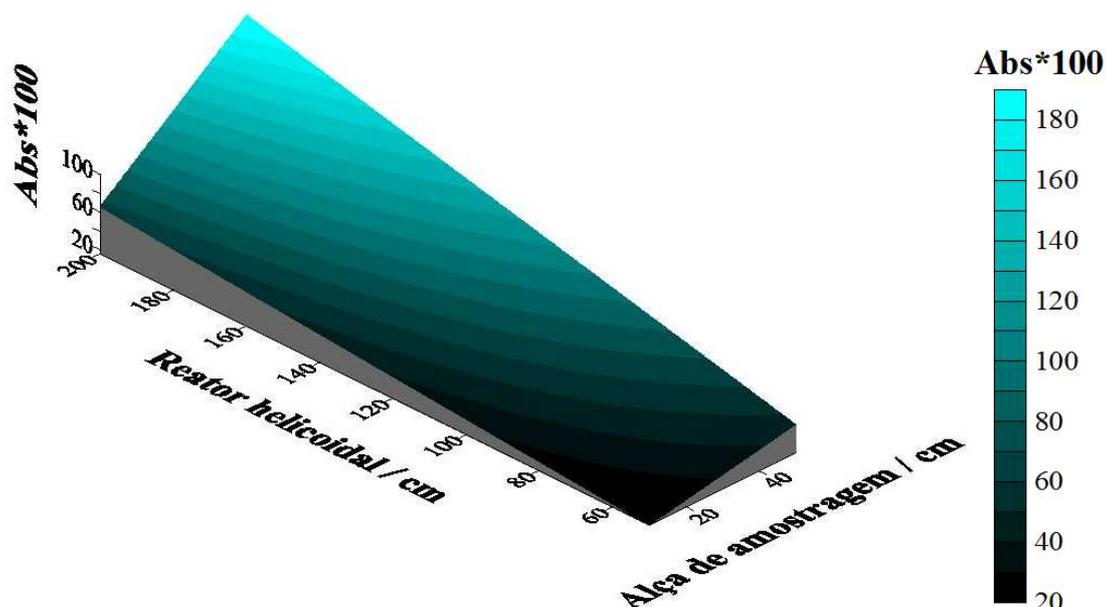


FIGURA 4.3: Superfície de resposta para a otimização da alça de amostragem e do reator helicoidal.

Em conformidade com o valor do efeito obtido na Equação 12, a superfície de resposta apresentou um acréscimo de sinal com o aumento dos valores da alça de amostragem e do reator helicoidal. Há uma grande região na superfície de resposta na qual a absorbância se apresenta no valor unitário. Entretanto, os valores da alça de amostragem e do reator helicoidal foram selecionados tomando-se precauções com relação à dispersão da amostra no reator; portanto, os valores selecionados foram 50 cm para alça de amostragem e 100 cm para o reator helicoidal.

A vazão, mesmo não tendo efeito tão pronunciado, tem papel importante na limpeza da linha do sistema, na frequência analítica e no consumo de reagentes. O fluxo deve proporcionar uma limpeza rápida da linha, boa frequência analítica e baixo consumo de reagentes. Tendo isso em conta foi selecionado o valor de $5,0 \text{ mL min}^{-1}$ para a vazão.

4.1.2.3. Curva analítica, figuras de mérito e determinação do MX

Uma vez otimizados os parâmetros do sistema FIA (Tabela 4.13), construiu-se uma curva analítica, ao mesmo tempo em que se procedeu à análise

do MX em amostras comerciais. Os sinais transientes registrados sob tais condições são apresentados na Figura 4.4.

TABELA 4.13: Parâmetros definidos para a análise por injeção em fluxo

Parâmetros	Valores
<i>Alça de amostragem / cm</i>	50,0
<i>Reator helicoidal / cm</i>	100
<i>Vazão / mL min⁻¹</i>	5,00
<i>λ / nm</i>	400

As concentrações de MX usadas na construção da curva analítica (Figura 4.5) foram: $1,00 \times 10^{-5}$; $5,00 \times 10^{-5}$; $1,00 \times 10^{-4}$; $2,50 \times 10^{-4}$; $7,50 \times 10^{-4}$ e $1,00 \times 10^{-3}$ mol L⁻¹. Observou-se que, para valores de concentração de MX menores que $1,00 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹, o valor da absorvância foi três vezes menor que o desvio padrão do sinal da solução de NaNO₂ 0,02 mol L⁻¹/HCl 0,1% (branco).

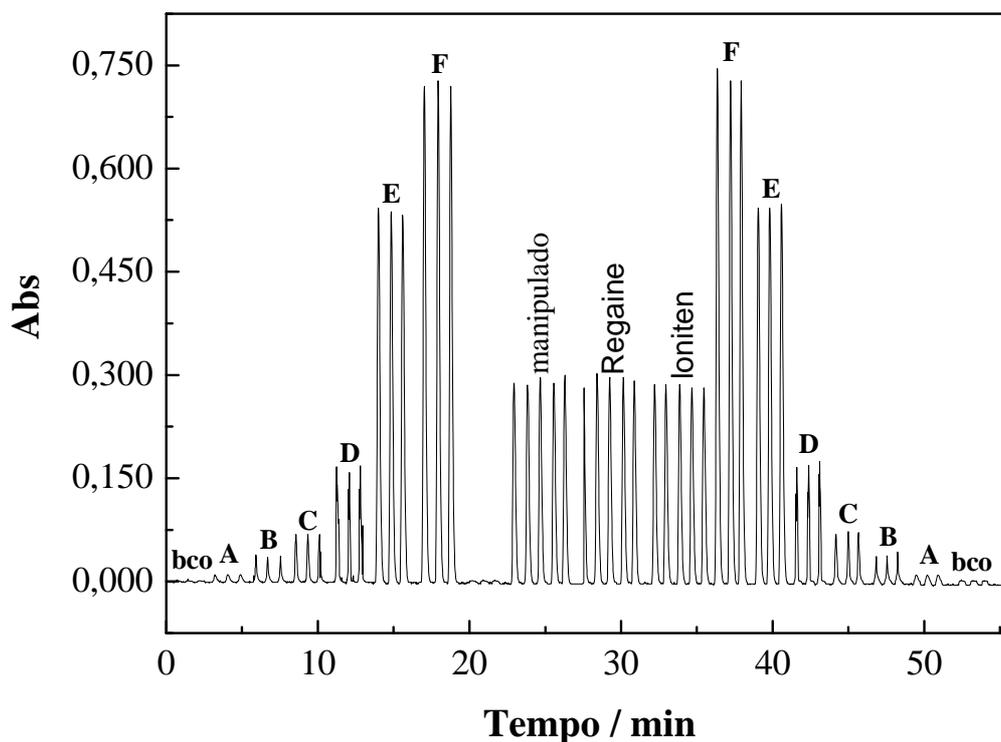


FIGURA 4.4: Sinais transientes referentes à variação de concentração de minoxidil, considerando o sinal do branco: bco – branco (HCl/NaNO₂); A – $1,00 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹; B – $5,00 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹; C – $1,00 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹; D – $2,50 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹; E – $7,50 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹; F – $1,00 \times 10^{-3}$ mol L⁻¹. Demais considerações são descritas na Tabela 4.13.

Os sinais transientes apresentados na Figura 4.4 não mostram a tendência de efeito de memória ao se mudar de concentração, mesmo quando se parte de uma concentração maior para uma concentração menor de MX.

Com os resultados da Figura 4.4 estimou-se a frequência analítica como sendo de 70 determinações por hora e construiu-se a curva analítica apresentada na Figura 4.5, na qual cada ponto representa a média das três medidas de concentração na ordem crescente.

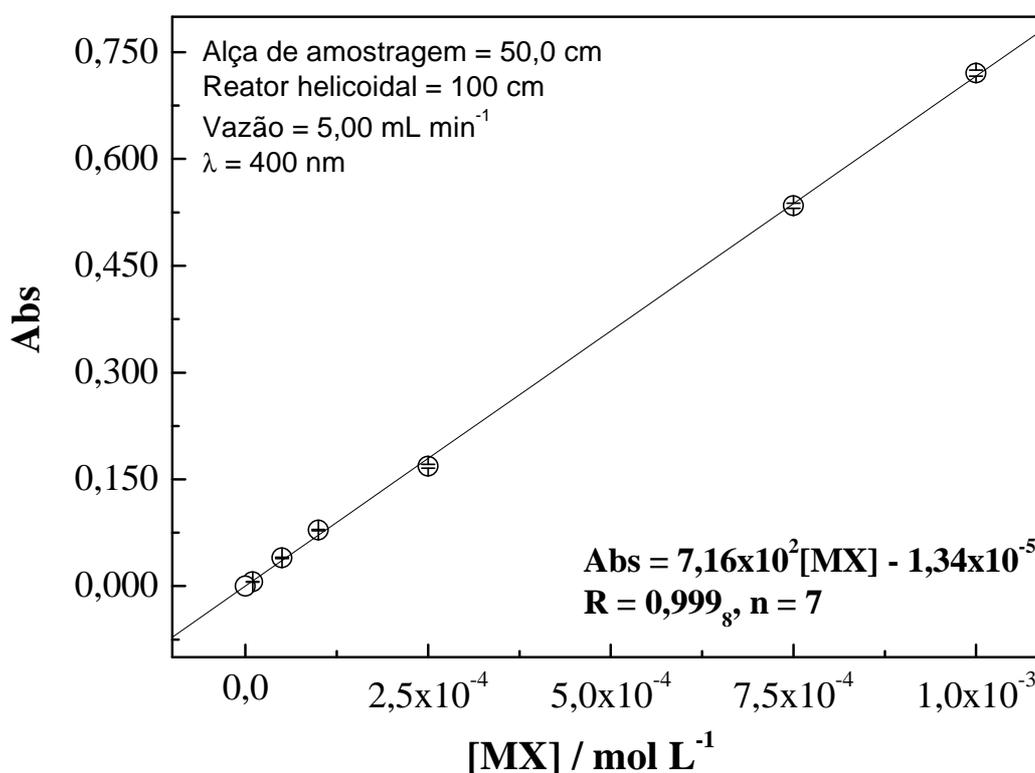


FIGURA 4.5: Curva analítica com seis concentrações diferentes de MX com o desconto do valor da absorbância do branco. Os pontos representam a média de três determinações.

Os limites de detecção e quantificação foram calculados usando as Equações 15 e 16. Para o cálculo foi usado o desvio padrão da média dos valores de absorbância do branco em dez injeções sucessivas. Os valores encontrados para os limites de detecção e quantificação são $9,57 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹ e $3,20 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹ respectivamente.

$$LD = 3SD_{\text{branco}} / b \quad \text{Equação 15}$$

$$LQ = 10SD_{\text{branco}} / b \quad \text{Equação 16}$$

O SD das Equações de LD e LQ (Equações 15 e 16) representa o desvio padrão da média dos sinais dos brancos e b é sensibilidade, definida pela inclinação da reta que representa a curva analítica (Equações 17).

$$\text{Abs} = 7,16 \times 10^2 \cdot [\text{MX}] - 1,34 \times 10^{-5}, R = 0,999_8, n = 7 \quad \text{Equação 17}$$

Com o auxílio da Equação 17, foram calculados os teores de MX contidos nas amostras comerciais e nos eletrólitos de urina e plasma artificiais. A Tabela 4.14 apresenta os valores de MX encontrados pelo método proposto e os erros relativos ao rótulo e ao método comparativo descrito na seção 3.4.

TABELA 4.14: Resultados da análise das amostras comerciais e dos eletrólitos do plasma e urina artificiais usando o método proposto

Amostras	Rótulo	Comparativo ^a	FIA ^a	Erro 1 / % ^b	Erro 2 / % ^c
<i>Loniten</i> [®] /MG comp. ⁻¹	10,0	10,1 ± 0,3	9,95±0,00 ₃	-0,500	-1,49
<i>Regaine</i> [®] /mg mL ⁻¹	20,0	21,1 ± 0,8	20,77±0,00 ₄	+3,85	-1,56
<i>Manipulado</i> /mg mL ⁻¹	50,0	52,7 ± 0,1	53,01±0,00 ₅	+6,02	+0,588
<i>Urina</i> /μmol L ⁻¹	25,0		25,78±0,00 ₇	+3,12	---
<i>Plasma</i> /μmol L ⁻¹	25,0		24,21±0,00 ₂	-3,16	---

a – concentração ± desvio padrão, n=5

b – erro relativo ao rótulo: [(FIA-rótulado)/rotulado]x100

c – erro relativo ao método comparativo: [(FIA-comparativo)/comparativo]x100

Os resultados do método proposto apresentados na Tabela 4.14 se mostraram coerentes com os valores rotulados das amostras comerciais e com o método comparativo. Apesar do erro relativo maior na amostra *Manipulada*, há concordância entre os resultados do procedimento FIA e o método comparativo, com 95% de confiança de acordo com o teste t-Student.

4.1.2.4. Teste de adição e recuperação

A exatidão do método proposto foi avaliada pelo teste de adição e recuperação, observando-se recuperações da ordem de 99,7% para o *Loniten*[®],

104,8% para o *Regaine*[®] e 102,5% para o *Manipulado* (n = 5), na determinação de MX nas formulações farmacêuticas. O teste de recuperação não foi aplicado aos eletrólitos de plasma e urina artificiais, pois a essas amostras foram adicionadas alíquotas de concentrações conhecidas de uma solução padrão de MX, levando a concentração final de $25,00 \mu\text{mol L}^{-1}$ do fármaco.

O teste de adição e recuperação obedeceu aos parâmetros otimizados para esse método, adicionou-se quantidade de solução padrão de MX à solução contendo o volume necessário de solução tópica, de modo a totalizar a concentração de $2,5 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ de MX.

4.1.3. Determinação de MX usando FIA com detecção espectrofotométrica na região do UV

Este método propõe a determinação quantitativa de MX usando um sistema em fluxo com configuração de zonas coalescentes e detecção na região do UV em 345 nm. A configuração de zonas coalescentes foi proposta para minimizar as interferências dos reagentes nos registros dos sinais transientes, o esquema da configuração proposta é apresentada na Figura 4.6.

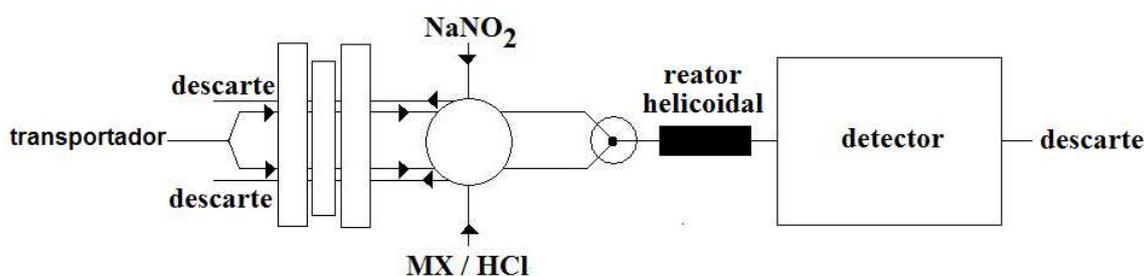


FIGURA 4.6: Sistema de zonas coalescentes usada para a determinação de MX.

Os sinais transientes obtidos da reação entre o MX e NaNO_2 $1,0 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$ em HCl 0,1% (V/V) foram medidos em 345 nm. Água tratada em sistema Mili-Q foi usada como fluido transportador. As alíquotas de MX e de NaNO_2 foram inseridas simultaneamente no sistema por um injetor

comutador fabricado em acrílico. As medidas foram feitas em temperatura ambiente, na ordem de 25°C.

4.1.3.1. Planejamento fatorial (Semaan et al., 2004; Sousa 2007)

No procedimento proposto, foi utilizada a análise fatorial para obter os melhores valores para vazão, alça de amostragem (MX), alça de reagente (NaNO₂), comprimento do reator helicoidal e do percurso analítico. As cinco variáveis analisadas simultaneamente geraram $2^n \rightarrow n=5$ (trinta e dois) experimentos. As cinco variáveis foram avaliadas com relação aos níveis máximo e mínimo, de acordo com o planejamento apresentado na Tabela 4.15.

TABELA 4.15: Níveis usados para cada variável, no planejamento fatorial, para otimizar o sistema FIA

Variáveis	Níveis	
	Mínimo (-)	Máximo (+)
Vazão / mL min ⁻¹	4,00	20,0
Alça de amostragem MX / cm	15,0	60,0
Alça de reagente NaNO ₂ / cm	15,0	60,0
Reator helicoidal / cm	0	200
Percurso analítico / cm	50,0	230

A Tabela 4.16 apresenta a combinação entre os níveis máximos e mínimos para cada variável, utilizando-se o planejamento fatorial de 32 experimentos para a otimização do sistema FIA.

A combinação dos valores da absorbância obtidos nas combinações descritas na Tabela 4.16 levam a arranjos de equações, considerando desde efeitos das variáveis isoladas até efeitos da combinação de todas as variáveis, efeitos de 1ª a 5ª ordem, arranjos conforme os grupos da Tabela 4.17.

TABELA 4.16: Planejamento fatorial dos 32 experimentos

Experimentos	Vazão	Alça MX	Alça NaNO ₂	Reator helicoidal	Percurso analítico
1	+	+	+	+	+
2	+	+	+	+	-
3	+	+	+	-	-
4	+	+	-	-	-
5	+	-	+	+	+
6	+	-	-	+	+
7	+	-	-	-	+
8	+	+	-	+	+
9	+	+	-	-	+
10	+	+	-	+	-
11	+	-	+	-	+
12	+	-	-	+	-
13	+	-	+	-	-
14	+	-	+	+	-
15	+	+	+	-	+
16	+	-	-	-	-
17	-	-	-	-	-
18	-	-	-	-	+
19	-	-	-	+	+
20	-	-	+	+	+
21	-	+	+	+	+
22	-	+	-	-	+
23	-	+	-	-	-
24	-	+	+	-	-
25	-	+	+	+	-
26	-	-	+	+	-
27	-	+	+	-	+
28	-	-	-	+	-
29	-	+	-	+	-
30	-	-	+	-	+
31	-	-	+	-	-
32	-	+	-	+	+

TABELA 4.17: Combinação dos experimentos gerando os efeitos de diferentes ordens: A – vazão; B – alça de amostragem (MX); C – alça de reagente (NaNO_2); D – reator helicoidal e E – percurso analítico

Efeitos				
1ª ordem	2ª ordem	3ª ordem	4ª ordem	5ª ordem
A; B; C; D e E	AB; AC; AD; AE; BC; BD; BE; CD; CE e DE	ABC; ABD; ABE; ACD; ACE; ADE; BCD; BCE; BDE e CDE	ABCD; ABDE; ACDE e BCDE	ABCD

Os efeitos gerados pelas ordens de combinação são calculados através da Equação 18, que traz a somatória das absorvâncias obtidas em cada experimento isolado, conforme a combinação entre os níveis apresentada na Tabela 4.17, dividido por $2^n/2$. A Equação 18 sugere a forma genérica para o cálculo dos efeitos para cada ordem de combinação.

$$\text{Efeito de ordem X} = \Sigma \text{ Abs para cada ordem} / 2^n/2 \quad \text{Equação 18}$$

Os resultados calculados dos efeitos, para cada ordem de combinação são apresentados na Tabela 4.18.

TABELA 4.18: Valores obtidos para cada ordem e a média das absorvâncias

Efeitos de 1ª ordem	A	-0,243
	B	0,419
	C	0,116
	D	0,129
	E	-0,0652
Efeitos de 2ª ordem	AB	-0,163
	AC	-0,0351
	AD	0,154
	AE	-0,0246
	BC	0,0727
	BD	0,0786
	BE	-0,125
	CD	0,0292
	CE	-0,0566
	DE	-0,0122
Efeitos de 3ª ordem	ABC	0,050625
	ABD	0,0621
	ABE	-0,0298
	ACD	0,0621
	ACE	0,00100
	ADE	0,0828
	BCD	-0,0542
	BCE	-0,00462
	BDE	0,0805
	CDE	0,0371
Efeitos de 4ª ordem	ABCD	0,00712
	ABDE	0,0563
	ACDE	-0,00925
	BCDE	0,0198
Efeito de 5ª ordem	ABCDE	-0,00350

A Figura 4.7 apresenta uma distribuição estatística na forma de histograma para cada um dos efeitos, comparando suas influências no desempenho do sistema FIA.

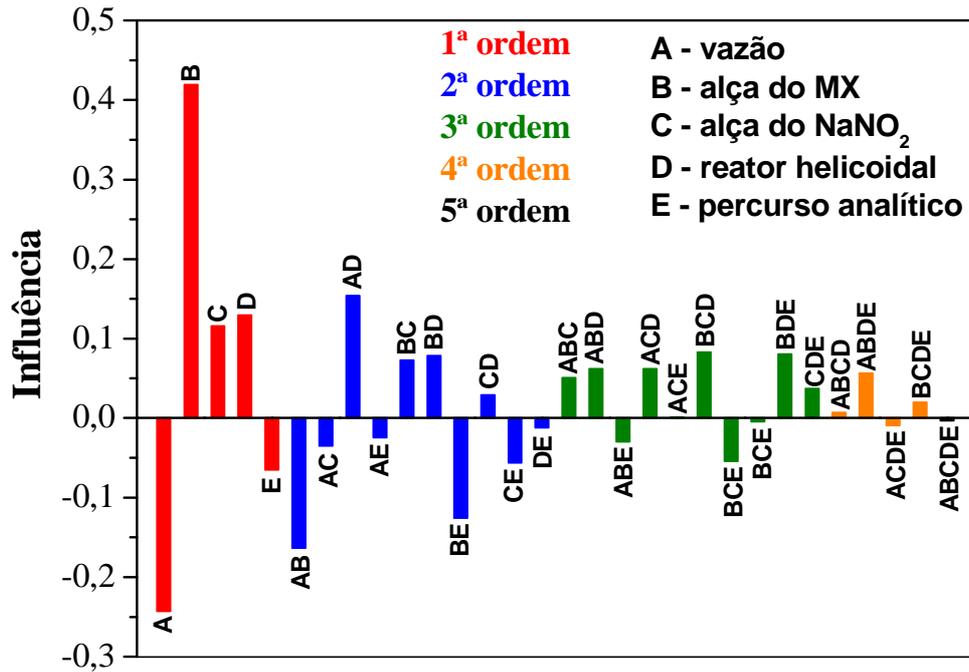


FIGURA 4.7: Distribuição estatística dos valores para as diferentes ordens calculadas.

A partir desse dado, observou-se que todos os efeitos de 1ª ordem são bem pronunciados, ou seja, todas variáveis estudadas tem grande influência sobre o desempenho analítico do sistema FIA proposto. Sendo assim, os efeitos de cada variável foram levados em consideração.

Os efeitos mais pronunciados foram relativos à vazão (influência negativa – sinal inversamente proporcional ao aumento da vazão) e à capacidade da alça de amostragem de MX (influência positiva – sinal diretamente proporcional ao aumento do comprimento da alça de amostragem de MX). Portanto, considerando a importância das influências da vazão e da alça de amostragem, obteve-se uma superfície de resposta para avaliar o sinal obtido ao se combinar ambas as influências. A Tabela 4.19 apresenta os valores das influências necessários para a construção da superfície de resposta, a qual foi construída com o auxílio da Equação 19 e cuja representação é feita pela Figura 4.8.

TABELA 4.19: Valores necessários para a obtenção da superfície de resposta

Efeito	A	B	AB
Σ	-0,486	0,838	-0,170
Efeito	-0,243	0,419	-0,163
Efeito / 2	-0,121	0,209	-0,0815
Média geral = 0,0102			

$$\text{Abs} = (0,0102 - 0,121.A + 0,209.B - 0,0815.AB)$$

Equação 19

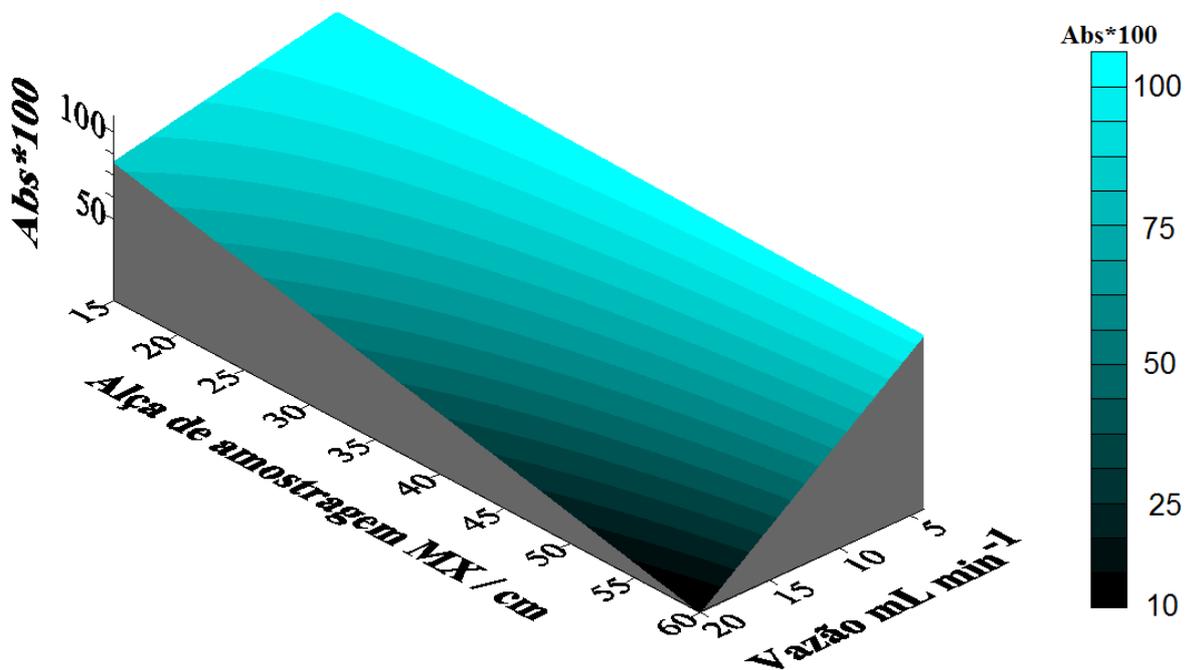


FIGURA 4.8: Representação da superfície de resposta da combinação entre vazão e alça de amostragem de MX.

Considerando os estudos acima, os valores para os parâmetros usados no sistema FIA foram selecionados. A vazão e alça de amostragem de MX tiveram seus valores selecionados a partir da superfície de resposta apresentada na Figura 4.8. Entretanto, os valores da alça do reagente, reator helicoidal e percurso analítico foram selecionados levando em consideração as influências de cada um sem alcançar os valores usados nos níveis máximos

(influência positiva) e mínimos (influência negativa). Os valores para cada parâmetro de estudo são apresentados na Tabela 4.20.

TABELA 4.20: Valor dos parâmetros para a melhor configuração do sistema FIA

Parâmetros	Valores otimizados
Vazão / mL min ⁻¹	4,00
Alça de amostragem MX / cm	45,0
Alça do reagente NaNO ₂ / cm	45,0
Reator helicoidal / cm	200
Percurso analítico / cm	50,0
λ / nm	345

4.1.3.2. Curva analítica, figuras de mérito e determinação de MX

Uma vez otimizados os parâmetros para o procedimento em fluxo com detecção na região do UV, foram obtidos os sinais transientes para diferentes concentrações de padrão de MX e três amostras comerciais, os quais são apresentados na Figura 4.9. As amostras comerciais foram o *Regaine*[®], *Loniten*[®] e uma formulação manipulada, como descritas anteriormente.

As concentrações de MX usadas para a construção da curva analítica foram: $1,00 \times 10^{-5}$; $5,00 \times 10^{-5}$; $1,00 \times 10^{-4}$; $2,50 \times 10^{-4}$; $5,00 \times 10^{-4}$ e $7,50 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹. Para valores de concentração menores que $1,00 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹, o valor da absorvância foi menor de três vezes que o desvio padrão do sinal do branco, NaNO₂ 0,01 mol L⁻¹ em meio de HCl 0,1%, não sendo possível medi-los.

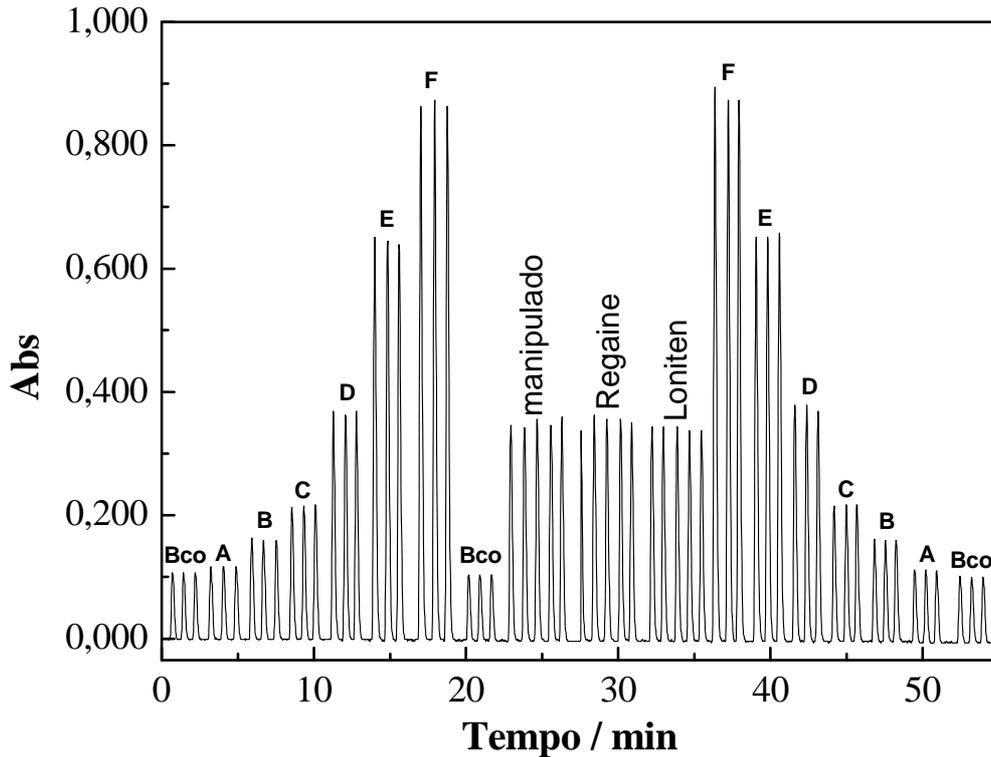


FIGURA 4.9: Sinais transientes referentes à variação de concentração de minoxidil, considerando o sinal do branco: bco – branco; A – $1,00 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$; B – $5,00 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$; C – $1,00 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$; D – $2,50 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$; E – $5,00 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$; F – $7,50 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$.

Os sinais transientes apresentados na Figura 4.9 se mostraram isentos do efeito de memória ao se mudar de concentração, mesmo quando se parte de uma concentração maior para uma concentração menor de MX. A frequência analítica foi calculada com o auxílio dos resultados apresentados na Figura 4.9 sendo da ordem de 72 determinações por hora.

A Figura 4.10 apresenta a curva analítica já com o desconto do sinal do branco. Os limites de detecção e quantificação foram calculados usando as Equações 15 e 16, conforme descrito anteriormente na seção 4.1.2.3. Os valores encontrados para os limites de detecção e quantificação foram $7,44 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ e $2,48 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$, respectivamente. Os pontos representam a média de três determinações nas medidas de concentração crescente.

A Equação 20 apresenta a equação da reta da curva analítica.

$$\text{Abs} = 1,12 \times 10^3 [\text{MX}] + 1,16 \times 10^{-5}; R = 0,999_6; n = 7 \quad \text{Equação 20}$$

Com o auxílio da Equação 20, foram calculados os teores de MX contidos nas amostras comerciais e nos eletrólitos de urina e plasma artificiais. A Tabela 4.21 apresenta os valores de MX encontrados pelo método proposto e os erros relativos ao rótulo e ao método comparativo.

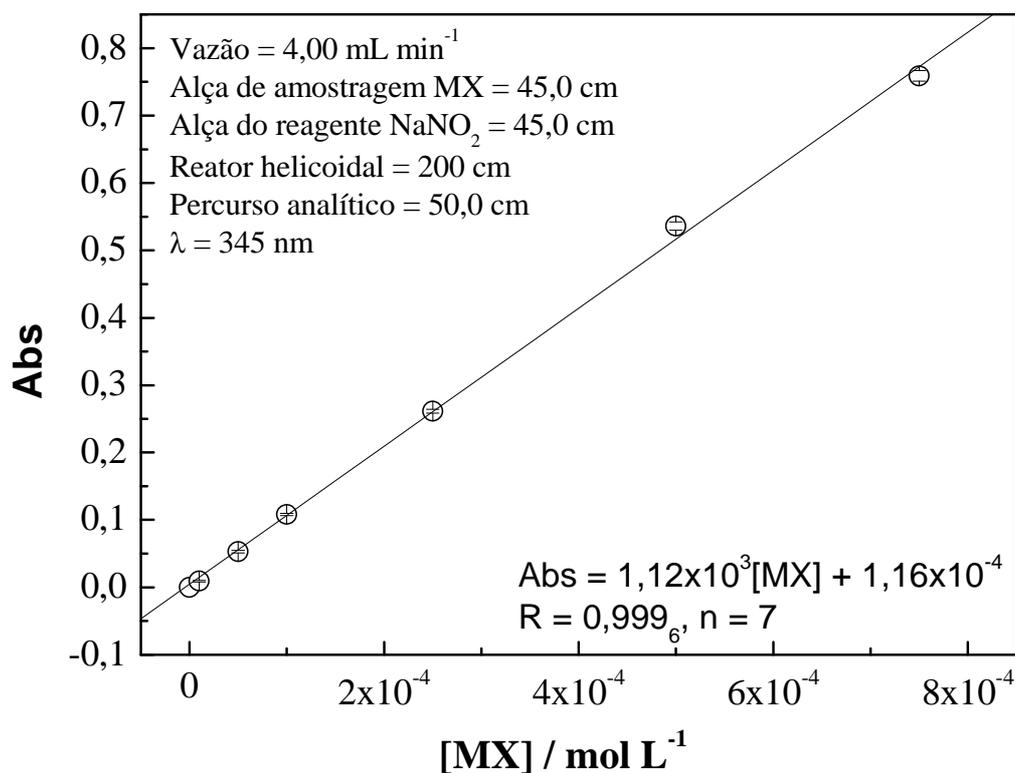


FIGURA 4.10: Curva analítica com seis concentrações diferentes de MX com o desconto do valor da absorbância do branco. Os pontos representam o valor médio de 3 determinações.

TABELA 4.21: Resultados da análise das amostras

Amostras	Rótulo	Comparativo ^a	FIA ^a	Erro 1/% ^b	Erro 2/% ^c
Loniten [®] /mg comp. ⁻¹	10,0	10,1 ± 0,3	9,9 ± 0,1	-1,00	-1,31
Regaine [®] /mg mL ⁻¹	20,0	21,1 ± 0,8	20,6 ± 0,6	+2,98	-2,39
Manipulado /mg mL ⁻¹	50,0	52,7 ± 0,1	51 ± 1	-3,04	-2,96
Urina /μmol L ⁻¹	25,0		24,65 ± 0,00 ₇	-1,40	---
Plasma /μmol L ⁻¹	25,0		25,43 ± 0,00 ₂	+1,72	---

a – concentração ± desvio padrão, n=5

b – erro relativo ao rótulo: [(FIA-rotulado)/rotulado]x100

c – erro relativo ao método comparativo: [(FIA-comparativo)/comparativo]x100

Os resultados obtidos na análise das amostras usando o método proposto (Tabela 4.21) são coerentes com os valores rotulados das amostras comerciais e com o método comparativo e, ainda, com os valores teóricos de concentração de MX contido nos eletrólitos do plasma e urina sintéticos. Usando o teste t-Student (Harris, 2001), observou-se que todos os resultados do método proposto concordam com os valores rotulados das amostras analisadas e com os resultados do método cromatográfico (método comparativo) em 95% de confiança.

4.1.3.3. *Teste de adição e recuperação*

A exatidão do método proposto foi avaliada pelo teste de adição e recuperação, observando-se recuperação entre 101,3 % para o *Loniten*[®], 99,8 % para o *Regaine*[®] e 103,7% para o *Manipulado* (n = 5), na determinação de minoxidil, nas amostras comerciais. O teste de adição e recuperação obedeceu aos parâmetros otimizados para esse método, para o qual adicionou-se quantidade de solução padrão de MX à solução contendo o volume necessário de solução tópica de modo a totalizar a concentração de $2,5 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹ de MX.

O teste de recuperação não foi aplicado aos eletrólitos do plasma e urina artificiais, devido à adição de uma alíquota da solução padrão de MX.

4.1.4. *Conclusões*

Os métodos propostos utilizando análise por injeção em fluxo (FIA), com detecção nas regiões do visível e do UV, para a determinação de MX em formulações farmacêuticas, foram eficientes, exatos e precisos. Os valores de concentração de MX obtidos pelos métodos propostos foram concordantes com os rótulos de cada medicamento e com os valores obtidos no método comparativo e ainda com os valores de concentração de MX contidos nos eletrólitos do plasma e da urina artificiais. A Tabela 4.22 apresenta as principais características de cada método proposto neste capítulo.

TABELA 4.22: Comparação entre alguns parâmetros obtidos para os métodos propostos

	Detecção no visível	Detecção no UV
λ / nm	400	345
<i>Sensibilidade</i> / $L mol^{-1}$	$7,16 \times 10^2$	$1,12 \times 10^3$
<i>LD</i> / $mol L^{-1}$	$9,57 \times 10^{-6}$	$7,44 \times 10^{-6}$
<i>LQ</i> / $mol L^{-1}$	$3,20 \times 10^{-5}$	$2,48 \times 10^{-5}$
<i>Configuração FIA</i>	Linha única	Zonas coalescentes
<i>Vazão</i> / $mL min^{-1}$	5,00	4,00
<i>Intervalo linear</i> / $mol L^{-1}$	$1,00 \times 10^{-5}$ a $1,00 \times 10^{-3}$	$1,00 \times 10^{-5}$ a $7,5 \times 10^{-4}$
<i>Frequência analítica / determinações</i> h^{-1}	70	72

Pode-se afirmar que ambos os métodos apresentam figuras de mérito semelhantes quanto ao LD e LQ. A sensibilidade para detecção em 345 nm foi ligeiramente superior, a vazão menor e o intervalo linear mais estreito quando essas figuras de mérito são comparadas às figuras de mérito para a detecção em 400 nm. Portanto, pode-se afirmar que, no geral, ambos os métodos são eficientes para a determinação de MX, sendo de linha única mais simples, mas com sensibilidade um pouco menor.

4.2. Estudo eletroanalítico de MX usando eletrodos compósitos de grafite-poliuretana e grafite-borracha de silicone

4.2.1. Considerações sobre eletrodos compósitos

Segundo Tallman e Petersen (1990), eletrodos compósitos são materiais eletródicos constituídos por uma fase condutora misturada a pelo menos uma fase isolante. Os autores classificaram os eletrodos compósitos conforme a distribuição do condutor e do isolante no material eletródico. De acordo com tal classificação, o arranjo do condutor e do isolante no material eletródico pode ser ordenado ou aleatório.

Ordenado: O condutor está confinado à superfície do isolante, ou o condutor atravessa o interior material, caso mais raro.

Aleatório: De acordo com a distribuição do condutor no material, há uma subclassificação, *dispersos* ou *consolidados*:

Dispersos: São compósitos cujas partículas condutoras estão distribuídas aleatoriamente pelo material eletródico.

Consolidados: São compósitos cujas partículas condutoras ocupam áreas específicas no material eletródico.

O uso de eletrodos compósitos não é recente. Em 1958, Adams descreveu a primeira aplicação, com o objetivo de substituir o eletrodo gotejante de mercúrio por um eletrodo compósito gotejante à base de grafite/bromofórmio, para ampliar a aplicação eletroanalítica na região anódica, na qual o eletrodo gotejante de mercúrio não se apresentava útil (Adams, 1958).

A utilização de eletrodos compósitos apresenta algumas vantagens, como a possibilidade de preparo de eletrodos com formas e tamanhos diferentes, adição de modificadores, aplicabilidade em faixas amplas de pH, bem como em meios não aquosos, baixos custos de produção, entre outras.

A aplicabilidade do compósito grafite-poliuretana começou a ser explorada em 2002 (Mendes, 2002), quando foi publicado o primeiro artigo apresentando as melhores condições de preparo e emprego deste material; sendo tal artigo seguido por algumas aplicações analíticas (Mendes, 2006; Semaan *et al.*, 2008).

A borracha de silicone, polímero com estabilidade química, isolante elétrico, alta resistência ao calor, água e agentes oxidantes, foi incorporada como agente aglutinador para a confecção de eletrodos compósito de grafite-borracha de silicone. Tal compósito foi inicialmente descrito por *Pungor e Szepesváry* (1968a, 1968b), pioneiros nesses estudos.

4.2.2. *Considerações sobre voltametria (Brett; Brett, 1996; Wang, 2006)*

A voltametria cíclica (CV) consiste na aplicação de um potencial variando continuamente com o tempo, a um eletrodo de trabalho, o que conduz à ocorrência de reações redox das espécies eletroativas contidas no meio eletrolítico. Dependendo do potencial, há adsorção de espécies atribuída a uma corrente capacitiva referente à carga da dupla camada.

Esta técnica é mais utilizada para a aquisição de informações qualitativas sobre reações eletroquímicas; isso se deve ao fato dela fornecer rapidamente informações importantes sobre a termodinâmica dos processos redox, cinética de transferência heterogênea de elétrons, reações químicas acopladas e processos de adsorção.

A CV, geralmente, é a primeira etapa realizada em um estudo eletroanalítico. Em particular, ela oferece uma localização rápida dos potenciais redox das espécies eletroativas e uma conveniente avaliação do efeito do meio eletrolítico usado no processo redox.

A voltametria de onda quadrada SWV é uma técnica muito conveniente do ponto de vista analítico. Ainda que a SWV tenha surgido em 1957 devido aos estudos de Baker, a utilização da técnica era limitada pela tecnologia eletrônica. Com os progressos da tecnologia analógica e digital, ela passou a ser incorporada nos polarógrafos a partir dos anos 80, principalmente, na sua forma de varredura rápida. Nessa forma, ela é também chamada de

voltametria de onda quadrada de Osteryoung, atribuída ao nome da pesquisadora americana que a desenvolveu.

A SWV consiste em uma onda quadrada simétrica, a qual é superposta a uma rampa de potencial em forma de degraus de tal modo que o pulso direto da onda quadrada coincida com o início do degrau da rampa. O pulso reverso da onda quadrada por sua vez coincide com a metade da etapa da rampa em degraus.

A voltametria de pulso diferencial (DPV) é uma técnica extremamente útil, devido a capacidade de determinar espécies orgânicas e inorgânicas em níveis de traço. Em DPV são aplicados pulsos fixos de potencial sobre uma rampa de potencial variando em função do tempo. A corrente é medida duas vezes, antes da aplicação do pulso e no final do pulso; o intervalo de tempo é da ordem de 40 ms. Instrumentalmente, o valor da primeira corrente é subtraído do valor da segunda, sendo esta diferença usada em função do potencial aplicado. A corrente de pico é diretamente proporcional à concentração do analito.

4.2.3. Considerações sobre espectroscopia de impedância eletroquímica (Brett; Brett, 1996; Wang, 2006)

A espectroscopia de impedância eletroquímica é uma técnica usada para estudar as características de um eletrodo e para a compreensão de uma reação de eletroquímica.

A espectroscopia de impedância envolve a aplicação de uma perturbação de pequena amplitude no sinal sinusoidal do potencial de célula eletroquímica, medindo a sua resposta. O espectro de impedância resultante corresponde à dependência dos valores imaginários (Z''), em função dos valores reais (Z'), contendo informações sobre a transferência de elétrons numa reação na interface eletrodo eletrólito. O gráfico de espectros de impedância, geralmente, apresenta uma região semicircular seguida de uma reta. O semicírculo

(frequências mais altas) corresponde ao processo de transferência de elétron, enquanto a reta (baixa frequência) representa o processo de difusão.

Tais espectros podem ser usados para estudos da cinética de transferência de elétron e de difusão. No caso de processos de transferências muito rápidas de elétron, o espectro de impedância se apresenta apenas na forma de uma reta; no entanto, quando o processo é lento, o espectro é caracterizado pela presença de uma região de semicircular grande.

O diâmetro do semicírculo corresponde à resistência elétrica para a transferência de elétron, ou seja, o ponto em que o semicírculo intercepta o eixo de Z' corresponde ao valor da resistência da solução eletrolítica (R_S).

4.2.4. Eletrodo compósito de grafite-poliuretana (GPUE)

4.2.4.1. Medida da superfície eletroativa do eletrodo de GPUE e coeficiente de difusão do minoxidil

A área da superfície eletroativa do eletrodo de GPUE foi determinada pelo método das velocidades de varredura, usando-se uma solução 5,00 mmol L⁻¹ de K₃Fe(CN)₆, em KCl 0,5 mol L⁻¹, como sonda eletroquímica. Foram obtidas as correntes de pico anódico ($I_{p,a}$) e catódico ($I_{p,c}$) em diferentes velocidades de varredura (v) (10, 25, 35, 50, 69, 75 e 100 mV s⁻¹), usando CV (Figura 4.11) (Brett; Brett, 1996).

Com o auxílio da Equação de Randles e Sevcik (Equação 21), calculou-se a área eletroativa do GPUE para cada velocidade de varredura usando as $I_{p,a}$ do K₃Fe(CN)₆ (Brett; Brett, 1996).

O valor da área eletroativa foi calculado através da média aritmética dos valores das áreas obtidas em cada velocidade de varredura estudada, sendo de $0,093 \pm 0,002$ cm².

$$I_{p,a} = 2,69 \times 10^5 \cdot n^{3/2} \cdot A \cdot D_o^{1/2} \cdot [\text{Ox}] \cdot v^{1/2} \quad \text{Equação 21}$$

As incógnitas da Equação 21 são: $I_{p,a}$ = corrente anódica/A; n = número de elétrons envolvidos = 1; A = área eletroativa/cm²; D_0 = Coeficiente de difusão do $[K_3Fe(CN)_6]$ = $7,70 \times 10^{-6}$ cm² s⁻¹; $[Ox] = [K_3Fe(CN)_6]_{célula} = 5,00$ mmol L⁻¹ e v = velocidade de varredura/V s⁻¹.

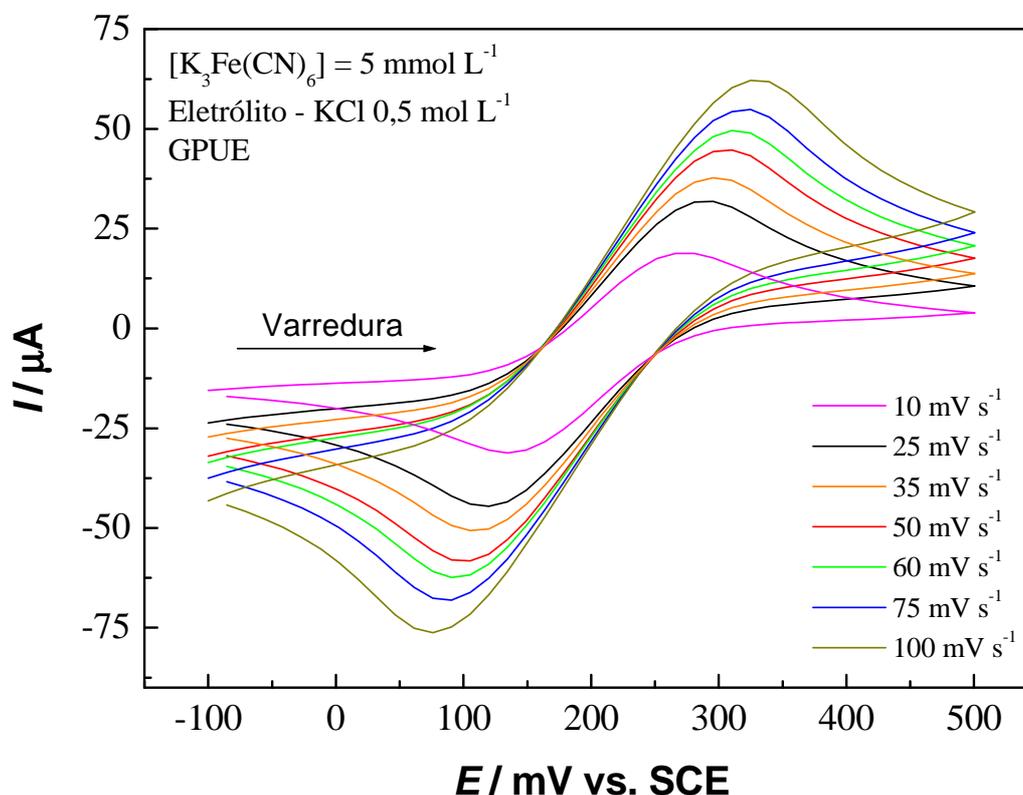


FIGURA 4.11: Voltamogramas cíclicos do $K_3Fe(CN)_6$ 5,00 mmol L⁻¹ em KCl 0,5 mol L⁻¹, com os sinais dos brancos (KCl 0,5 mol L⁻¹) descontados sob diferentes velocidades de varredura.

O coeficiente de difusão do MX foi calculado (Equações 22 e 23) pelo método das velocidades de varredura (10, 25, 35, 50, 60, 75 e 100 mV s⁻¹) utilizando a área eletroativa calculada para cada velocidade de varredura.

O MX apresentou um único pico de oxidação em 840 mV, usando eletrólito suporte HCl/KCl pH 2,5 numa concentração de $6,62 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹.

As Equações de Ilkovic para processos irreversíveis (Equação 22 e Equação 23) forneceram os valores dos coeficientes de difusão do analito para cada velocidade de varredura estudada. O valor do coeficiente de difusão do MX foi a média aritmética dos valores dos coeficientes de difusão obtidos em cada

velocidade de varredura (Brett; Brett, 1996). O valor do coeficiente de difusão do MX foi $(7,9 \pm 0,6) \times 10^{-6} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$.

$$I_{p,a} = 2,99 \times 10^5 \cdot n(\alpha_a n')^{1/2} \cdot A \cdot [\text{ox}] \cdot D_o^{1/2} \cdot v^{1/2} \quad \text{Equação 22}$$

$$[E_p - E_{p/2}] = 47,7(\alpha_a n') \quad \text{Equação 23}$$

nas quais: $A = 0,093 \text{ cm}^2$; $v^{1/2}/(\text{V s}^{-1})^{1/2}$; $n = \text{n}^\circ \text{ elétrons envolvidos} = 1$ e $[E_p - E_{p/2}]/\text{mV}$.

4.2.4.2. Determinação de MX usando CV

Estudou-se o efeito da variação do pH (Tabela 3.7, pág. 31) do eletrólito suporte no intervalo de 2,00 a 8,00, no potencial de pico anódico do MX. O intervalo de potenciais usado nesse estudo foi de +300 a +1100 mV, a velocidade de varredura foi 25 mV s^{-1} e a concentração de MX na célula foi $6,25 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ (Figura 4.12).

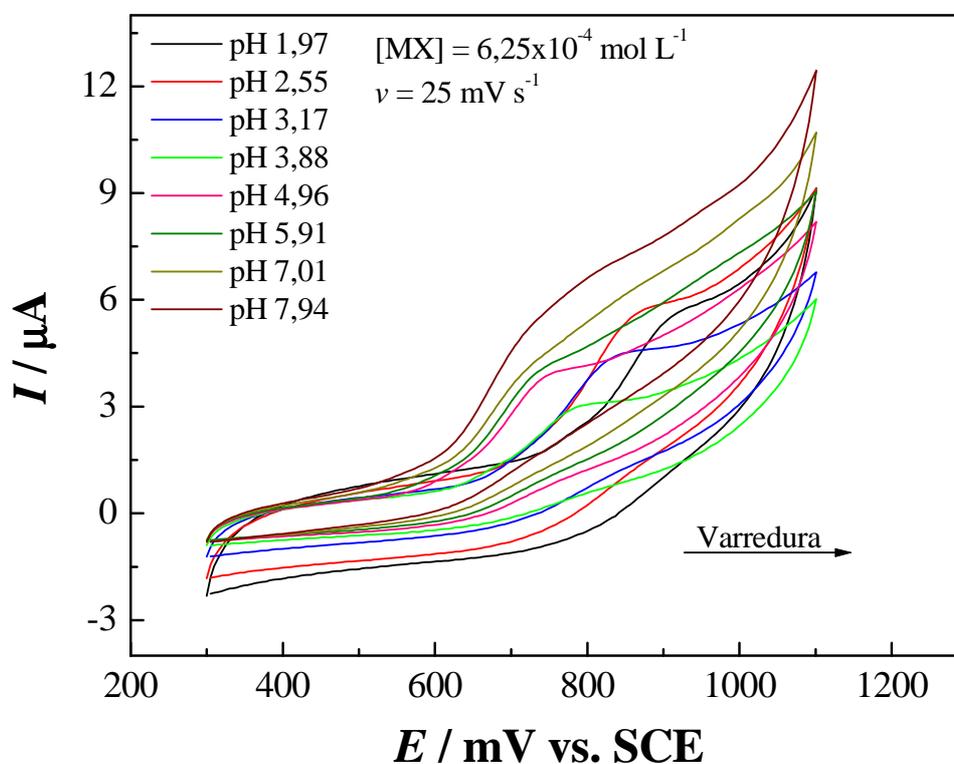


FIGURA 4.12: Registros dos voltamogramas obtidos no estudo do efeito do pH no potencial de pico anódico do MX.

A Figura 4.12 mostra uma tendência de alargamento do pico anódico em função do aumento do pH. O MX apresenta o pK_a 4,61 (Po-Chang Chiang *et al.*, 2006), portanto, em pH mais elevado haverá a formação de uma espécie desprotonada, provavelmente em uma de suas aminas primárias em quantidade significativa.

Essa espécie é eletro-oxidada no intervalo de potenciais usado, apresentando um segundo pico de oxidação, o qual surge a partir do pH 4,96.

A Figura 4.13 apresenta a curva potencial de pico anódico *vs.* pH, referente aos voltamogramas apresentados na Figura 4.12.

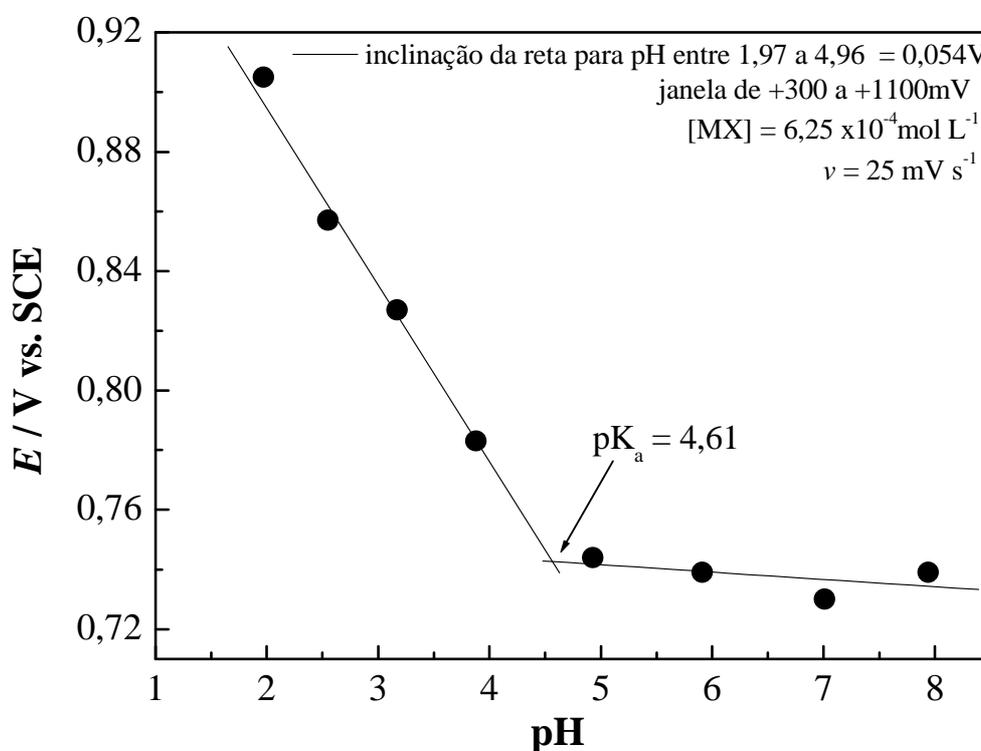


FIGURA 4.13: Estudo do efeito do pH no potencial de oxidação do MX no intervalo de pH 1,97 a 4,96 o comportamento é “Nernstiano”.

A Figura 4.13 apresenta a curva de potencial de pico anódico em função do pH. Nessa curva, nota-se que há uma região com variação nos valores de potencial de pico anódico do MX no intervalo de pH entre 1,97 a 4,96 com inclinação de -54 mV.

Entretanto, para valores de pH superiores a 4,96, não houve variação significativa nos valores de potencial de pico anódico do MX, tomando

como base o primeiro processo eletroquímico. Esse efeito é atribuído à formação da espécie desprotonada do MX.

A inclinação da reta de -54 mV (Figura 4.13) sugere um mecanismo de um elétron por próton para eletro-oxidação do MX. Para isso, o coeficiente angular da curva potencial de pico vs. pH é comparado ao fator RT/nF da Equação de Nernst (Equação 24), o qual assume o valor de 59 mV para $n = 1$ elétron. Portanto, ao se comparar o valor experimental (54 mV) com o obtido pela Equação de Nernst (59 mV) (Equação 24), conclui-se que os valores experimental e teórico são próximos, levando ao mecanismo de um elétron por próton (Brett; Brett, 1996,).

$$E = E^0 + \frac{RT}{nF} \times \ln \frac{[\text{Ox}]}{[\text{Rd}]} \quad \text{Equação 24}$$

A $I_{p,a}$ não variou significativamente com pH entre 2 – 8. Entretanto, o valor de pH selecionado para o prosseguimento dos trabalhos voltamétricos usando GPUE foi 2,5, devido à melhor definição do perfil voltamétrico e à maior $I_{p,a}$ do MX obtida nesse estudo. O potencial de pico anódico para pH 2,5 foi da ordem 840 mV.

Avaliou-se o efeito da velocidade de varredura na corrente de pico anódico do MX apresentada na Figura 4.14. Para tanto, foram usadas as seguintes velocidades de varredura: 5; 15; 25; 41; 50 e 100 mV s^{-1} . As condições experimentais para estudo do efeito da velocidade de varredura foram: intervalo de potenciais de +300 a +1100 mV, 15 mL de eletrólito HCl/KCl pH 2,50 e $[\text{MX}] = 6,25 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$. Todas as medidas foram realizadas em triplicata, sendo usada a média das $I_{p,a}$ para cada velocidade de varredura.

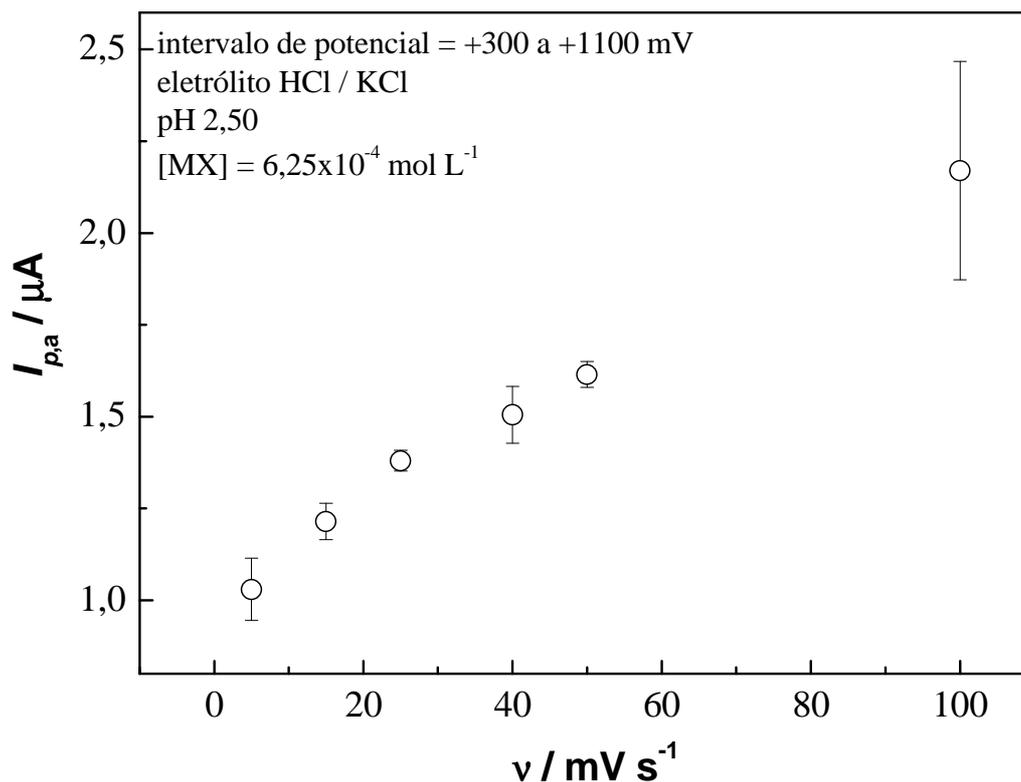


FIGURA 4.14: Efeito da velocidade de varredura na corrente de pico anódico do MX; eletrólito HCl/KCl pH 2,5; $E_{p,a} = 840 \text{ mV}$; intervalo de potenciais +300 a +1100 mV.

Para a velocidade de varredura de 100 mV s^{-1} (Figura 4.14), notou-se um grande desvio padrão da média da $I_{p,a}$, tal efeito se deve ao curto tempo para que a organização da dupla camada ocorra durante o processo voltamétrico.

A Figura 4.15 apresenta variação da $I_{p,a}$ em função da $v^{1/2}$, nessa curva foi descartada a velocidade de varredura de 100 mV s^{-1} .

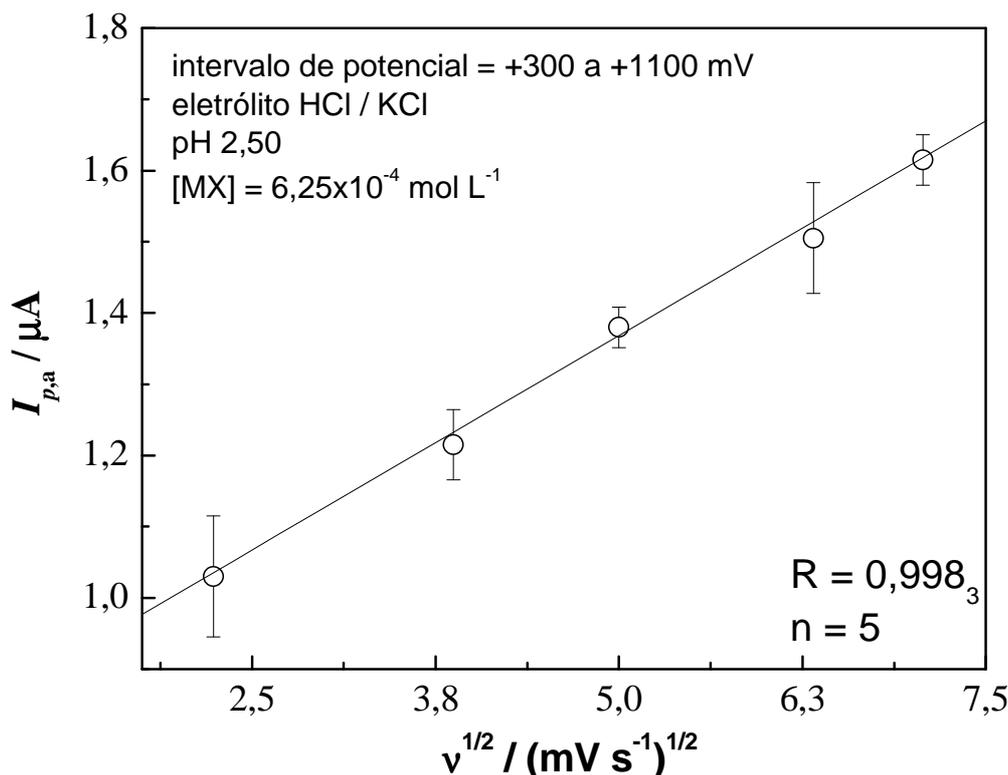


FIGURA 4.15: Influência da $v^{1/2}$ na $I_{p,a}$ indicando que transferência de carga é controlada por difusão; eletrólito HCl/KCl pH 2,5; $E_{p,a} = 840$ mV; intervalo de potenciais +300 a +1100 mV.

A curva $I_{p,a}$ vs. $v^{1/2}$ (Figura 4.15) se apresentou linear com R de 0,998₃. O comportamento linear da curva indica que o transporte de massa foi controlado por difusão (Brett; Brett, 1996; Xavier, 2007). A velocidade de varredura selecionada para a sequência do trabalho foi 25 mV s⁻¹, devido ao menor desvio padrão da média das $I_{p,a}$ (Figura 4.14).

Os desvios padrão obtidos em velocidades de varredura menores que 100 mV s⁻¹ foram relativamente altos, esse fato foi atribuído à adsorção de MX ou MX oxidado na superfície do eletrodo. O processo de adsorção será discutido na última seção deste trabalho.

Avaliou-se o intervalo de potenciais no qual houvesse melhor definição do pico anódico, sem prejuízo do processo de oxidação do MX. A Figura 4.16 apresenta os voltamogramas cíclicos obtidos nesse estudo.

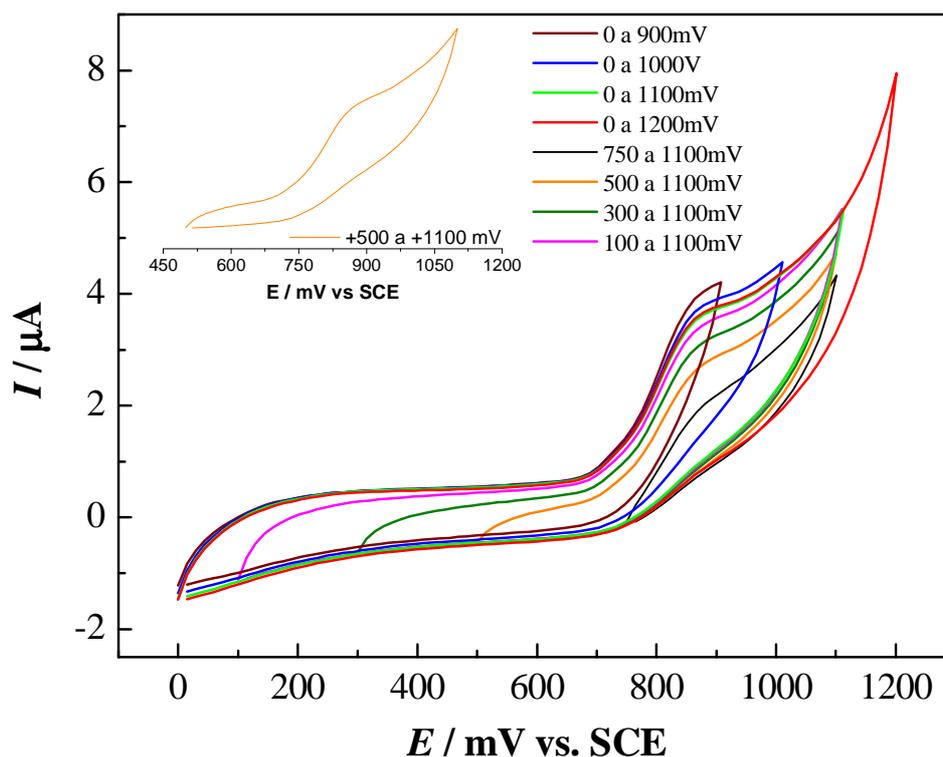


FIGURA 4.16: Estudo do efeito da variação do intervalo potencial na $I_{p,a}$; eletrólito HCl/KCl pH 2,5; $E_{p,a} = 840$ mV; intervalo de potenciais +300 a +1100 mV; $[MX] = 6,65 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹, no detalhe o intervalo escolhido.

O intervalo de potenciais selecionado com melhor perfil voltamétrico sem prejuízo do processo de oxidação do MX foi entre +500 e +1100 mV (Figura 4.16, no detalhe o intervalo escolhido).

Observou-se uma diminuição nas correntes de pico entre o 1º e o 2º ciclo de varredura (Figura 4.17). Entretanto, à partir do 2º ciclo a corrente é praticamente constante, mostrando que o processo de adsorção de MX ou seu produto de oxidação é leve e não afeta as correntes de forma significativa a partir do 2º ciclo.

Devido à adsorção de MX ou MX oxidado, houve a diminuição do valor da $I_{p,a}$ nos sucessivos ciclos voltamétricos.

Avaliou-se o efeito da diminuição da corrente de pico anódico em função do aumento dos sucessivos ciclos voltamétricos, esse estudo consistiu em adições sucessivas de alíquotas de solução estoque de MX e as $I_{p,a}$ foram

medidas em cada ciclo voltamétrico. Foram executados 3 ciclos voltamétricos para cada adição de MX. Todas as medidas foram feitas em triplicata.

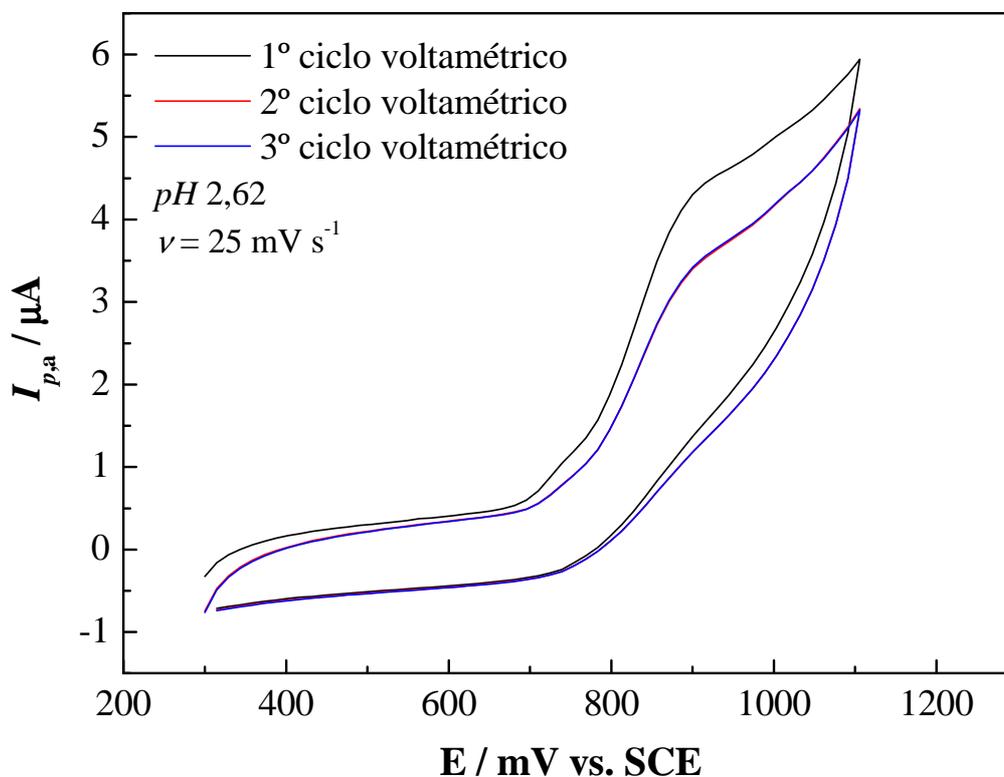


FIGURA 4.17: Comparação entre os 3 ciclos voltamétricos na $[MX] = 6,65 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$; eletrólito HCl/KCl pH 2,5; intervalo de potenciais +500 a +1100mV; $E_{p,a} = 840 \text{ mV}$.

Esse estudo resultou em três curvas analíticas, uma para cada ciclo voltamétrico, e os resultados de sensibilidade LD e LQ (Equações 15 e 16) são apresentados na Tabela 4.23. Para o cálculo de LD e LQ, foi considerado o desvio padrão da média de dez valores de corrente do branco.

TABELA 4.23: Comparação dos valores da sensibilidade, limites de detecção e quantificação em cada ciclo voltamétrico registrado

Ciclos	Sensibilidade / $\text{A mol}^{-1} \text{ L}$	LD / mol L^{-1}	LQ / mol L^{-1}
1º	0,022	$1,49 \times 10^{-6}$	$4,95 \times 10^{-6}$
2º	0,020	$2,01 \times 10^{-6}$	$6,68 \times 10^{-6}$
3º	0,019	$2,02 \times 10^{-6}$	$6,73 \times 10^{-6}$

Comparando-se os valores da sensibilidade (Tabela 4.23) entre os 3 ciclos voltamétricos, nota-se que o 1º ciclo voltamétrico apresenta o valor da

sensibilidade 10% maior que o valor da sensibilidade do 2º ciclo voltamétrico e 15% maior que o valor da sensibilidade no 3º ciclo voltamétrico. Os valores dos limites de detecção e quantificação do 1º ciclo voltamétrico são menores, quando comparados, com os valores dos limites de detecção e quantificação do 2º e 3º ciclos voltamétricos (Tabela 4.23). Devido aos melhores valores de sensibilidade, limite de detecção e limite de quantificação as correntes de pico anódico do MX serão tomadas no 1º ciclo voltamétrico. Assim o efeito da adsorção de MX ou MX oxidado foi minimizado.

A Figura 4.18 apresenta os voltamogramas cíclicos relativos ao primeiro ciclo no intervalo de concentração de MX entre $6,62 \times 10^{-6}$ e $3,15 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$, sendo observada uma resposta linear entre corrente de pico e concentração de MX observada entre $3,38 \times 10^{-5}$ a $2,89 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$.

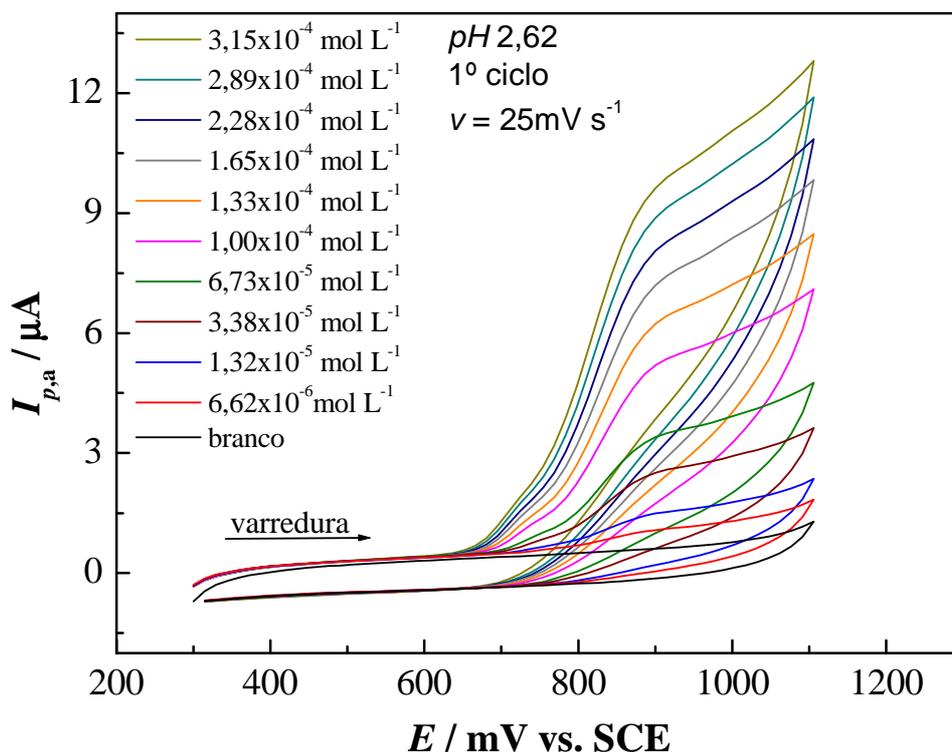


FIGURA 4.18: Voltamogramas cíclicos relativos à adição de alíquotas de MX no intervalo de concentração entre $6,62 \times 10^{-6}$ a $3,15 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$; eletrólito HCl/KCl pH 2,5; intervalo de potenciais +500 a +1100mV; $E_{p,a} = 840 \text{ mV}$.

A Figura 4.19 apresenta a curva analítica, no intervalo de concentração de MX de $3,38 \times 10^{-5}$ a $2,89 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$, que obedeceu à Equação de reta, representada pela Equação 25.

$$I_{p,a} = 5,36 \times 10^3 [\text{MX}] + 4,91 \times 10^{-2}; R = 0,999_4; n = 7 \quad \text{Equação 25}$$

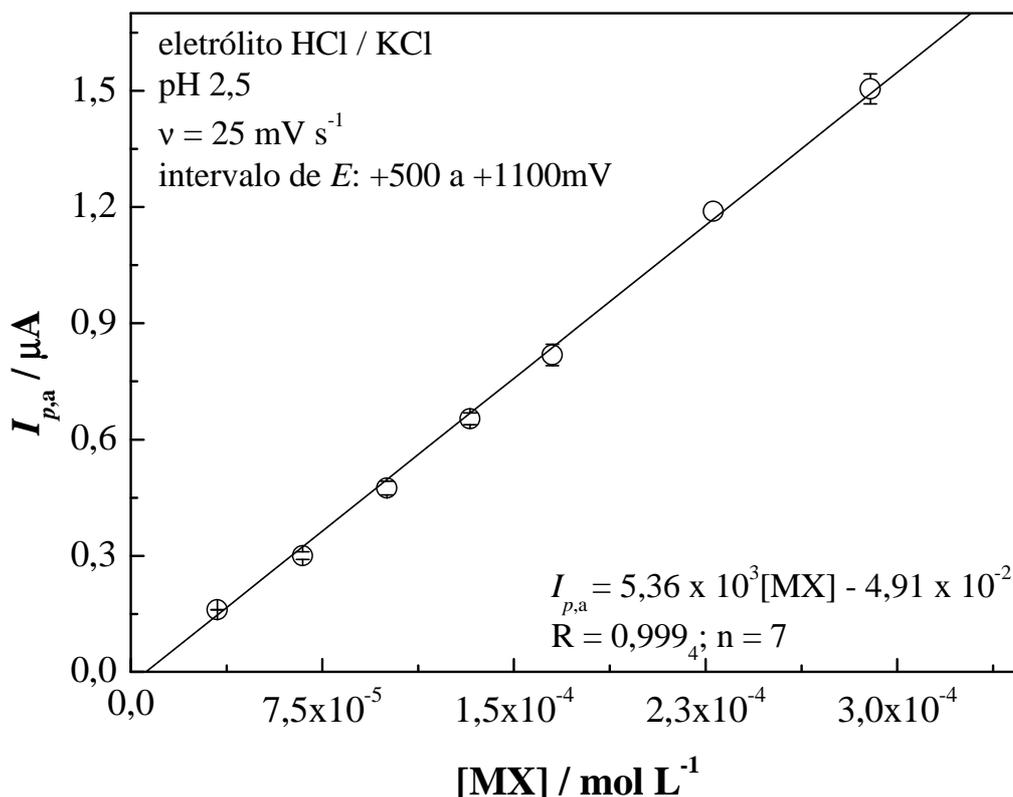


FIGURA 4.19: Curva analítica para a determinação de MX usando voltametria cíclica; eletrólito HCl/KCl pH 2,5; janela +500 a +1100mV; $E_{p,a} = 840 \text{ mV}$.

Para os cálculos dos limites de detecção e quantificação foram usadas as Equações 15 e 16 (pág. 54), considerando o desvio padrão médio de 10 valores da corrente do branco, obtido no potencial de oxidação do MX, juntamente com o valor de sensibilidade obtido pela Equação 25, que representa a curva analítica. Os limites de detecção e quantificação são $1,49 \times 10^{-5}$ e $2,95 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ respectivamente.

A Tabela 4.24 apresenta os resultados da análise das amostras comerciais e dos eletrólitos do plasma e urina artificiais. Os teores de MX

contidos nas amostras foram determinados através da curva analítica apresentada na Figura 4.19.

TABELA 4.24: Resultados da análise das amostras utilizando CV

<i>Amostra</i>	<i>Rótulo</i>	<i>CV^d</i>	<i>Erro1/%^e</i>	<i>Erro2/%^f</i>	<i>Recuperação/%</i>
<i>Regaine^{®a}</i>	20	21,1 ± 0,2	5,40	0	100
<i>Loniten^{®b}</i>	10	9,4 ± 0,8	-6,00	-6,9	94
<i>Manipulado^a</i>	50	51 ± 1	2,00	-3,2	110
<i>Urina^c</i>	25	23,80 ± 0,06	4,80	-	-
<i>Plasma^c</i>	25	22,62 ± 0,08	9,53	-	-

a: mg mL⁻¹; b: mg comprimido⁻¹; c: μmol L⁻¹; d: n = 3; e: erro relativo ao rótulo ± desvio padrão; f: erro relativo ao método comparativo

Os valores obtidos por CV estão de acordo com os valores rotulados e os obtidos no método comparativo concordando em 95 % de acordo com o teste t-Student.

4.2.4.3. Determinação de MX usando Voltametria de Onda Quadrada (SWV)

Estudou-se o efeito da variação do incremento de potencial, amplitude e frequência na otimização de um procedimento usando SWV para a determinação de MX. A Tabela 4.25 apresenta a combinação entre os valores do incremento de potencial, da amplitude e da frequência usados na otimização.

TABELA 4.25: Parâmetros estudados para a determinação de minoxidil por SWV

<i>Amplitude / mV</i>	<i>Incremento de E / mV</i>	<i>Frequência / Hz</i>
50	5,0	25
50	5,0	35
50	5,0	50
50	10	25
50	10	35
50	10	50

A Figura 4.20 mostra os voltamogramas relativos ao estudo do efeito da variação dos valores de incremento de potencial, amplitude e frequência na resposta voltamétrica, apresentados na Tabela 4.25. A concentração de MX na célula foi de $3,23 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$.

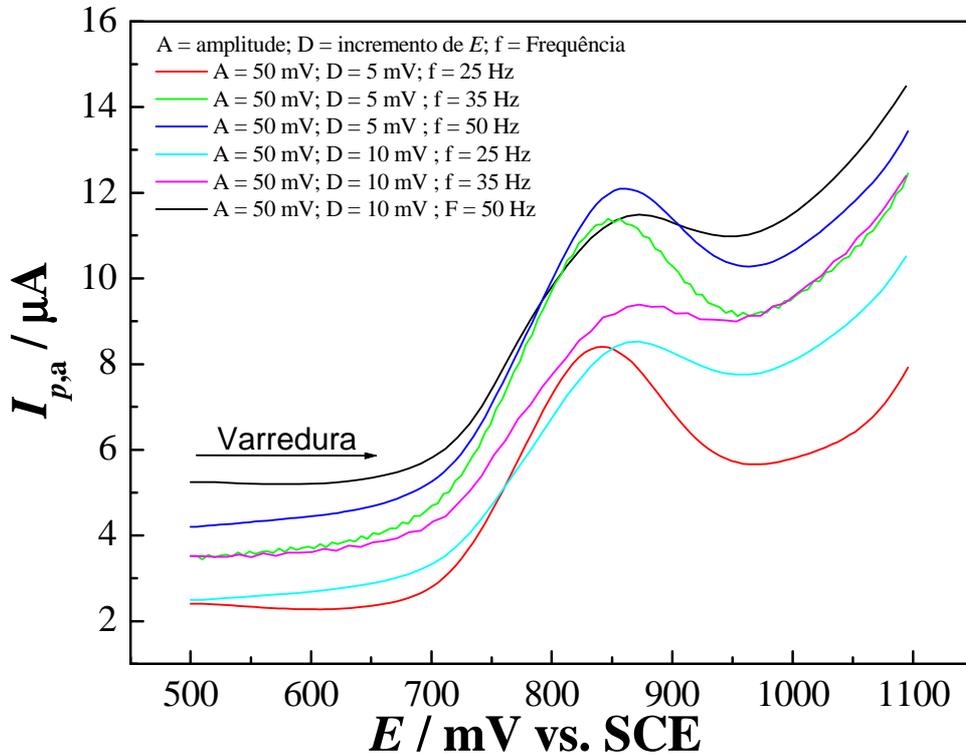


FIGURA 4.20: Voltamogramas cíclicos referentes ao estudo do efeito da variação dos valores dos parâmetros para a determinação de MX por SWV; eletrólito HCl/KCl pH 2,5; $[\text{MX}] = 3,23 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$.

Comparando-se os perfis voltamétricos das curvas apresentadas na Figura 4.20 e os resultados apresentados na Tabela 4.26, conclui-se que a melhor combinação de incremento de potencial, amplitude e frequência foram 5 mV, 50 mV e 25 Hz respectivamente.

TABELA 4.26: Resultados do estudo dos parâmetros da SWV para a determinação de minoxidil

Parâmetros^a	$I_{p,a} / \mu\text{A}$	$W_{1/2} / \text{mV}$
A50; D5; f25	$5,1 \pm 0,3$	129 ± 3
A50; D5; f35	$4,8 \pm 0,2$	132 ± 0
A50; D5; f50	$4,8 \pm 0,2$	134 ± 3
A50; D10; f25	$3,60 \pm 0,07$	138 ± 6
A50; D10; f35	$3,2 \pm 0,1$	148 ± 6
A50; D10; f50	$3,59 \pm 0,07$	141 ± 0

a – A = amplitude / mV; D = incremento de E / mV; f = frequência / Hz

A Equação 26 foi usada para a avaliação da reversibilidade e, pode-se concluir que o processo é irreversível, considerando-se o alargamento do pico em função do aumento da frequência. Portanto, a irreversibilidade do processo encontrado na SWV está de acordo com o que foi observado na CV (Brett; Brett, 1996).

$$W_{1/2} = 3,52RT/nF \quad \text{Equação 26}$$

Foi avaliado o efeito da variação do intervalo de potenciais no pico de onda quadrada. A Figura 4.21 apresenta os voltamogramas da variação do intervalo de potenciais, sendo a janela selecionada entre +500 a +950 mV.

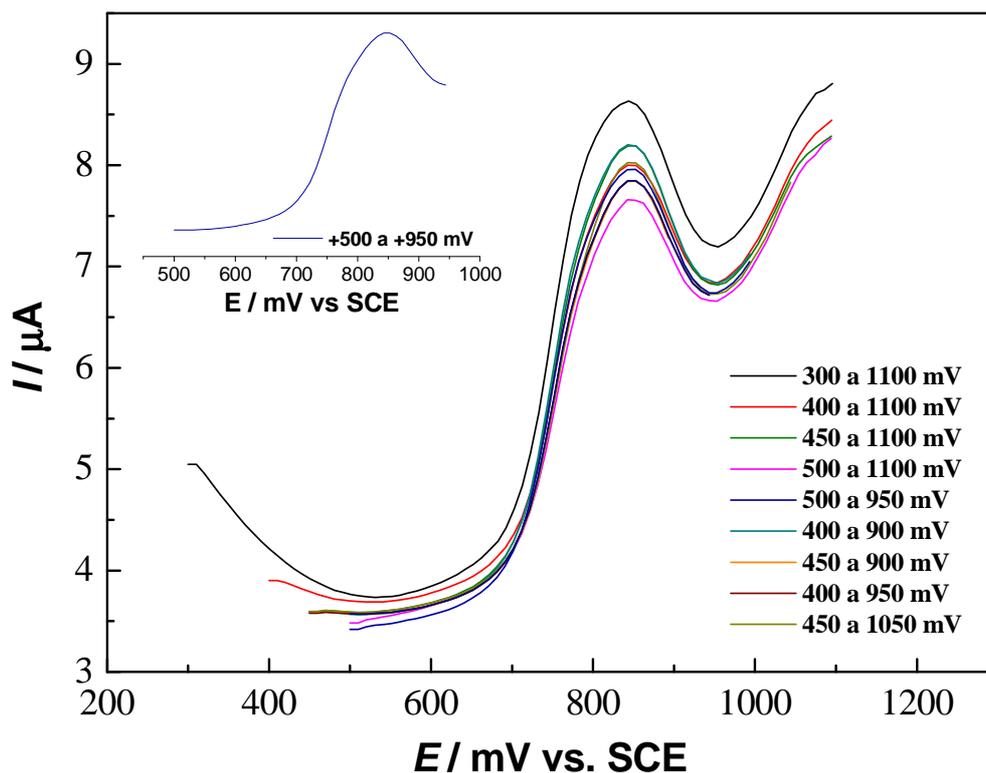


FIGURA 4.21: Estudo do efeito da variação do intervalo potencial na $I_{p,a}$; eletrólito HCl/KCl pH 2,5; $[MX] = 3,23 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$; $E_{p,a} = 840 \text{ mV}$. Em detalhe, o intervalo selecionado.

A Figura 4.22 apresenta os registros voltamétricos do estudo do efeito da variação da concentração de MX na corrente de pico. A região linear foi no intervalo de concentração entre $1,33 \times 10^{-5}$ a $1,15 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$. Abaixo dessa faixa o pico de oxidação não foi evidente.

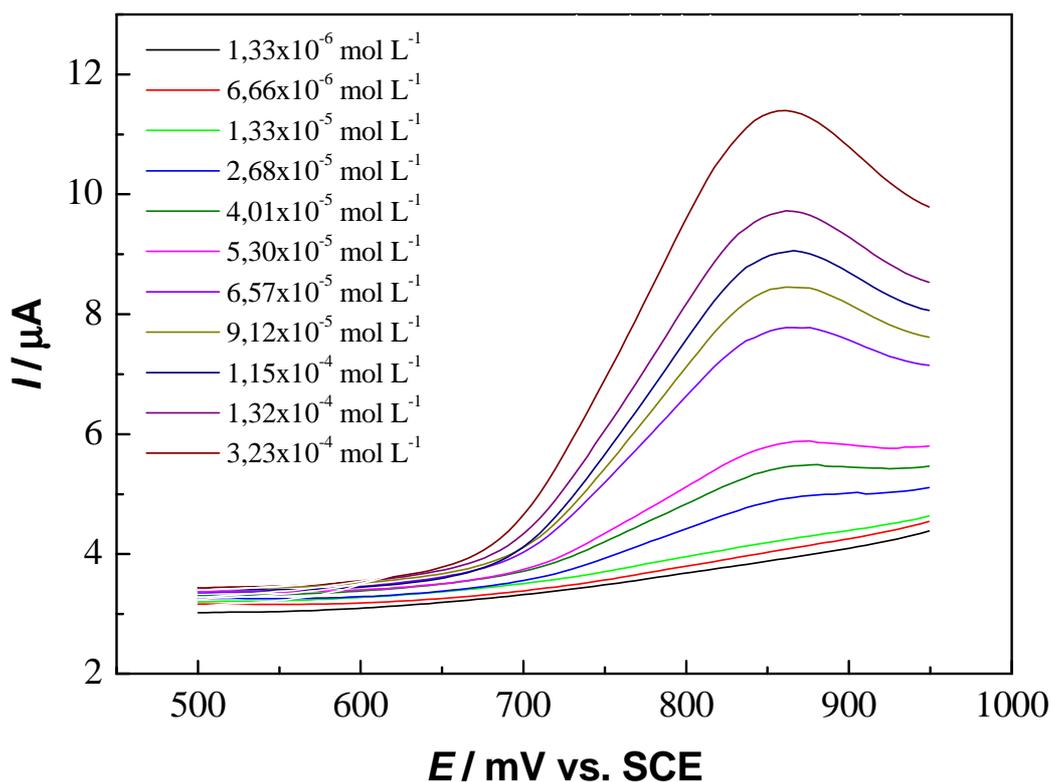


FIGURA 4.22: Voltamogramas relativos à adição de alíquotas de MX. Amplitude 50 mV; incremento de potencial 5 mV; frequência 25 Hz; eletrólito HCl/KCl pH 2,5; $E_{p,a} = 840 \text{ mV}$; intervalo de potenciais +500 a +950mV.

A Figura 4.23 apresenta a curva analítica no intervalo linear de concentração de MX ($1,33 \times 10^{-5}$ a $1,15 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$). Os limites de detecção e quantificação foram calculados conforme foi descrito na seção 4.1.2.3 (Equações 15 e 16, pág. 54) e seus valores foram $7,7 \times 10^{-6}$ e $2,2 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$, respectivamente, enquanto a Equação 27 apresenta a equação da reta.

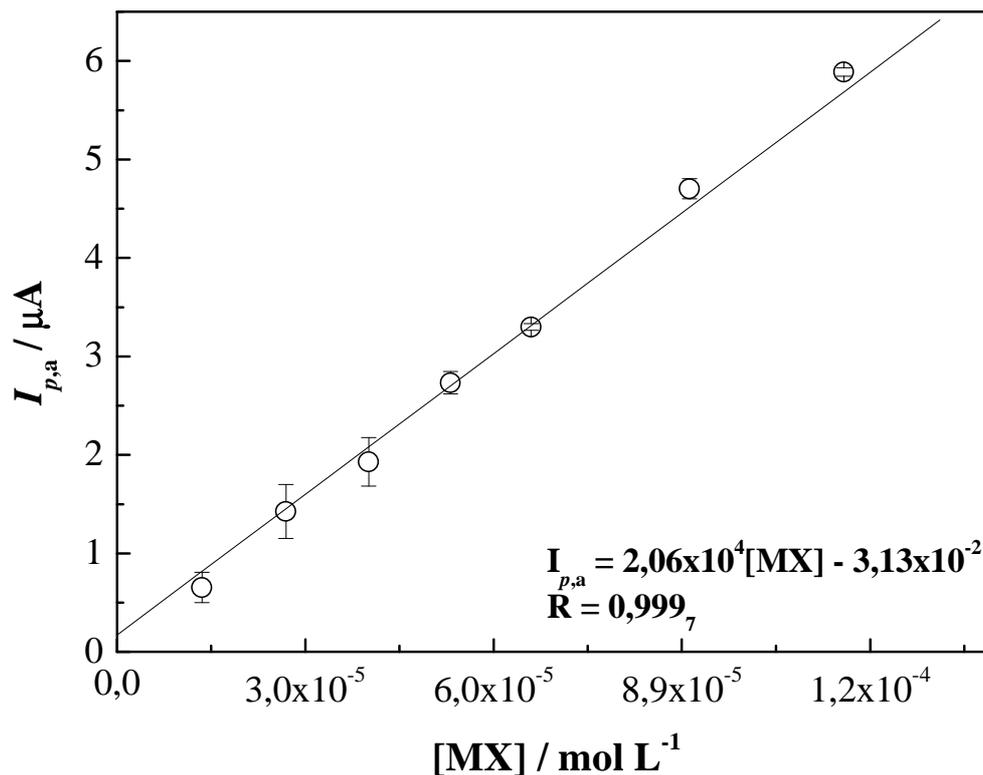


FIGURA 4.23: Curva analítica do MX usando SWV. Amplitude 50 mV; incremento de potencial 5 mV; frequência 25 Hz; eletrólito HCl/KCl pH 2,5; $E_{p,a} = 840$ mV; intervalo de potenciais +500 a +950 mV.

$$I_{p,a} = 2,06 \times 10^4 [\text{MX}] - 3,13 \times 10^{-2}; R = 0,999_7, n = 7 \quad \text{Equação 27}$$

A Tabela 4.27 apresenta os valores dos teores de MX medidas para as amostras usando SWV, obtidos através da Equação 27, que é a equação de reta de curva analítica apresentada na Figura 4.23.

TABELA 4.27: Resultados obtidos na análise das amostras usando SWV

<i>Amostra</i>	<i>Rótulo</i>	<i>SWV</i> ^d	<i>Erro1</i> / % ^e	<i>Erro2</i> / % ^f	<i>Recuperação</i> / %
<i>Regaine</i> ^a	20	18,7 ± 0,1	-6,75	-11,3	102
<i>Loniten</i> ^b	10	9,1 ± 0,7	-9,00	-9,9	92
<i>Manipulado</i> ^a	50	48 ± 3	-4,37	-8,9	90
<i>Urina</i> ^c	25	25,1 ± 0,2	0,400	-	-
<i>Plasma</i> ^c	25	26,92 ± 0,09	7,67	-	-

a – mg mL⁻¹; b – mg comprimido⁻¹; c – μmol L⁻¹; d – n = 3; e – erro relativo ao rótulo ± desvio padrão; f - erro relativo ao método comparativo ± desvio padrão.

Foi aplicado o teste de t-Student para avaliar a concordância entre os valores de concentração de MX obtidos por SWV com os valores rotulados e os do método comparativo sendo de 95 % e 90 % respectivamente.

4.2.4.4. Determinação de MX usando Voltametria de Pulso Diferencial (DPV)

Foi estudada a influência da variação dos valores de amplitude, incremento de potencial e velocidade de varredura usando DPV na oxidação do MX. A Tabela 4.28 apresenta os valores estudados de amplitude, incremento de potencial e velocidade de varredura. A concentração de MX foi de $3,23 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹ na célula. Todos os experimentos foram feitos em triplicata, sendo considerada a média e o desvio padrão para cada experimento.

TABELA 4.28: Parâmetros estudados na otimização da DPV

Amplitude / mV	Incremento de potencial / mV	Velocidade / mV s⁻¹
25,0	5,00	12,5
50,0	5,00	12,5
100	5,00	12,5
25,0	10,0	25,0
50,0	10,0	25,0
100	10,0	25,0
25,0	20,0	50,0
50,0	20,0	50,0
100	20,0	50,0
25,0	30,0	75,0
50,0	30,0	75,0
100	30,0	75,0
25,0	40,0	100
50,0	40,0	100
100	40,0	100

Considerando o maior valor de $I_{p,a}$ e melhor perfil voltamétrico apresentados na Tabela 4.29, os melhores valores de amplitude, incremento de potencial e velocidade de varredura foram 100 mV, 20,0 mV e 50 mV s⁻¹, respectivamente.

TABELA 4.29: Parâmetros experimentais estudados para a determinação de MX usando DPV

Parâmetros ^a	$I_{p,a} / \mu\text{A}$	$W_{1/2} / \text{mV}$
A25; D 5; v 12,5	1,2 ± 0,2	104 ± 2
A25; D 10; v 25	1,2 ± 0,3	101 ± 0
A25; D 20; v 50	1,58 ± 0,02	120 ± 0
A25; D 30; v 75	1,5 ± 0,2	110 ± 2
A25; D 40; v 100	1,3 ± 0,4	NC*
A50; D 5; v 12,5	2,4 ± 0,6	103 ± 5
A50; D 10; v 25	2,8 ± 0,3	104 ± 6
A50; D 20; v 50	3,0 ± 0,6	100 ± 0
A50; D 30; v 75	2,6 ± 0,7	120 ± 0
A50; D 40; v 100	1,7 ± 0,2	NC*
A100; D 5; v 12,5	5,0 ± 0,2	121 ± 3
A100; D 10; v 25	4 ± 1	124 ± 6
A100; D 20; v 50	5,9 ± 0,6	95,7 ± 0,4
A100; D 30; v 75	4,9 ± 0,1	120 ± 0
A100; D 40; v 100	4,9 ± 0,1	NC*

a – A = amplitude/mV; D = incremento de E/mV; v = velocidade de varredura/mV s⁻¹; * NC – não considerado; pico pouco definido.

A Equação 26 (pág. 91) foi usada para a avaliação da reversibilidade e, pode-se concluir que o processo é irreversível considerando o alargamento do pico em função do aumento da frequência. Portanto, a irreversibilidade do processo encontrado na SWV está de acordo com o que foi observado na CV e na SWV (Brett; Brett, 1996).

A Figura 4.24 apresenta os voltamogramas relativos à variação da concentração de MX. Com os dados obtidos na Figura 4.24, construiu-se uma curva analítica referente ao intervalo de resposta linear de concentração de MX, que foi de $1,70 \times 10^{-5}$ a $1,45 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹ (Figura 4.25). Os limites de detecção e de quantificação, calculados tal como na seção 4.1.2.3 (Equações 15 e 16, pag. 54), foram $1,40 \times 10^{-6}$ e $4,64 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹, respectivamente.

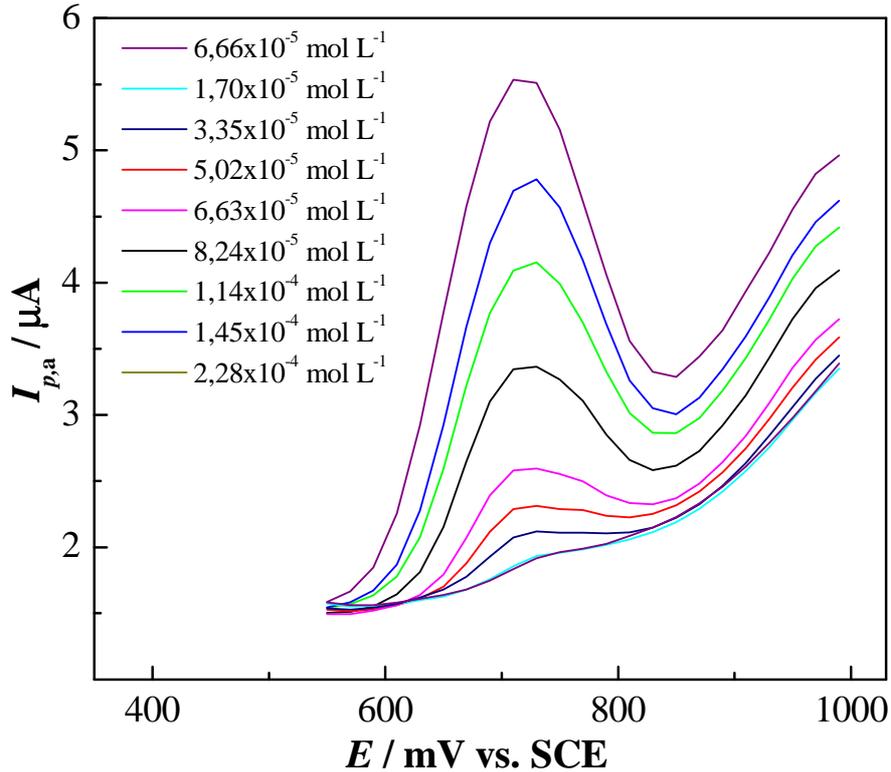


FIGURA 4.24: Voltamogramas de pulso diferencial com adição de alíquotas de MX. Amplitude 100 mV; incremento de potencial 20 mV; $\nu = 50 \text{ mV s}^{-1}$; eletrólito HCl/KCl pH 2,5; $E_{p,a} = 720 \text{ mV}$; janela de +550 a +1000 mV.

A Equação 28 apresenta a equação de reta para a curva analítica.

$$I_{p,a} = 1,88 \times 10^4 [\text{MX}] + 3,91 \times 10^{-2}; R = 0,999_5; n = 7 \quad \text{Equação 28}$$

A Tabela 4.30 apresenta os resultados dos teores de MX contidos nas amostras analisadas por DPV.

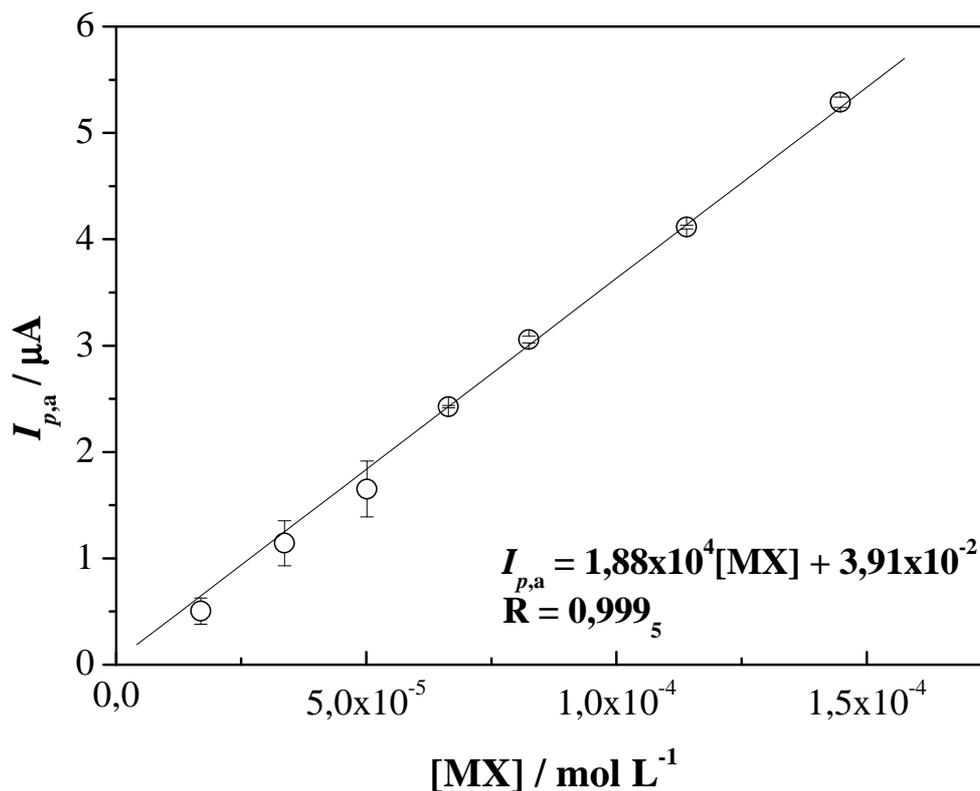


FIGURA 4.25: Curva analítica do MX usando DPV: Amplitude 100 mV; incremento de potencial 20 mV; velocidade de varredura 50 mV s⁻¹; eletrólito HCl/KCl pH 2,5; $E_{p,a} = 720$ mV; intervalo de potenciais +550 a +1000 mV.

TABELA 4.30: Resultados das análises das amostras usando DPV

<i>Amostra</i>	<i>Rótulo</i>	<i>DPV^d</i>	<i>Erro1/%^e</i>	<i>Erro2/%^f</i>	<i>Recuperação/%</i>
<i>Regaine^{®a}</i>	20	21,1 ± 0,1	5,55	0	96
<i>Loniten^{®b}</i>	10	10,7 ± 0,3	6,71	5,9	101
<i>Manipulado^a</i>	50	52,4 ± 0,1	4,75	0,6	107
<i>Urina^c</i>	25	23,5 ± 0,1	-6,19		
<i>Plasma^c</i>	25	27,4 ± 0,2	9,43		

a: mg mL⁻¹; b: mg comprimido⁻¹; c: µmol L⁻¹; d: n = 3; e: erro relativo ao rótulo ± desvio padrão; f: erro relativo ao método comparativo

Usando o método t-Student, foram avaliados a concordância dos valores obtidos pela DPV e os valores rotulados e os obtidos pelo método comparativo. Os resultados da DPV concordam em 95% com os valores rotulados e os resultados do método comparativo.

4.2.4.5. Estudos de Impedância Eletroquímica

Foram registrados espectros de impedância eletroquímica em cinco potenciais diferentes para investigar o comportamento da superfície do GPUE na presença e na ausência de MX. A solução eletrolítica e volume dela foram os mesmos usados nos estudos voltamétricos, 15 mL de solução HCl/KCl pH 2,5, e a concentração de MX na célula foi $6,25 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$.

A Figura 4.26 apresenta os cinco espectros de impedância eletroquímica relativos aos diferentes potenciais estudados. A Figura 4.26 D apresenta o espectro de impedância no potencial de oxidação do MX (840 mV vs. ECS), as Figuras 4.26 A, B, C e E são registradas aos potenciais -500, 0, 500 e 1100 mV, respectivamente.

A Figura 4.26 A apresenta o espectro a -500 mV, no qual há evidência de um processo lento de redução, que pode ser atribuído à redução de óxidos de carbono existentes na superfície, já que não há modificação significativa comparando-se o espectro do branco e o espectro do MX.

As Figuras 4.26 B e 4.26 C apresentam espectros característicos de uma capacitância numa superfície ligeiramente rugosa, sem transferência de carga, tanto na presença como na ausência do MX em solução.

A Figura 4.26 D apresenta o espectro correspondente ao potencial de oxidação do MX. Nesse espectro, observa-se uma grande mudança na impedância comparando-se as curvas do branco com as curvas do minoxidil, evidenciando a transferência de carga entre o eletrodo e a solução de MX. Finalmente, a Figura 4.26 E apresenta espectros nos quais se percebe algum processo relativo à oxidação do grafite e liberação de oxigênio; e, ainda na presença de MX, há a transferência de carga entre o eletrodo e MX em solução.

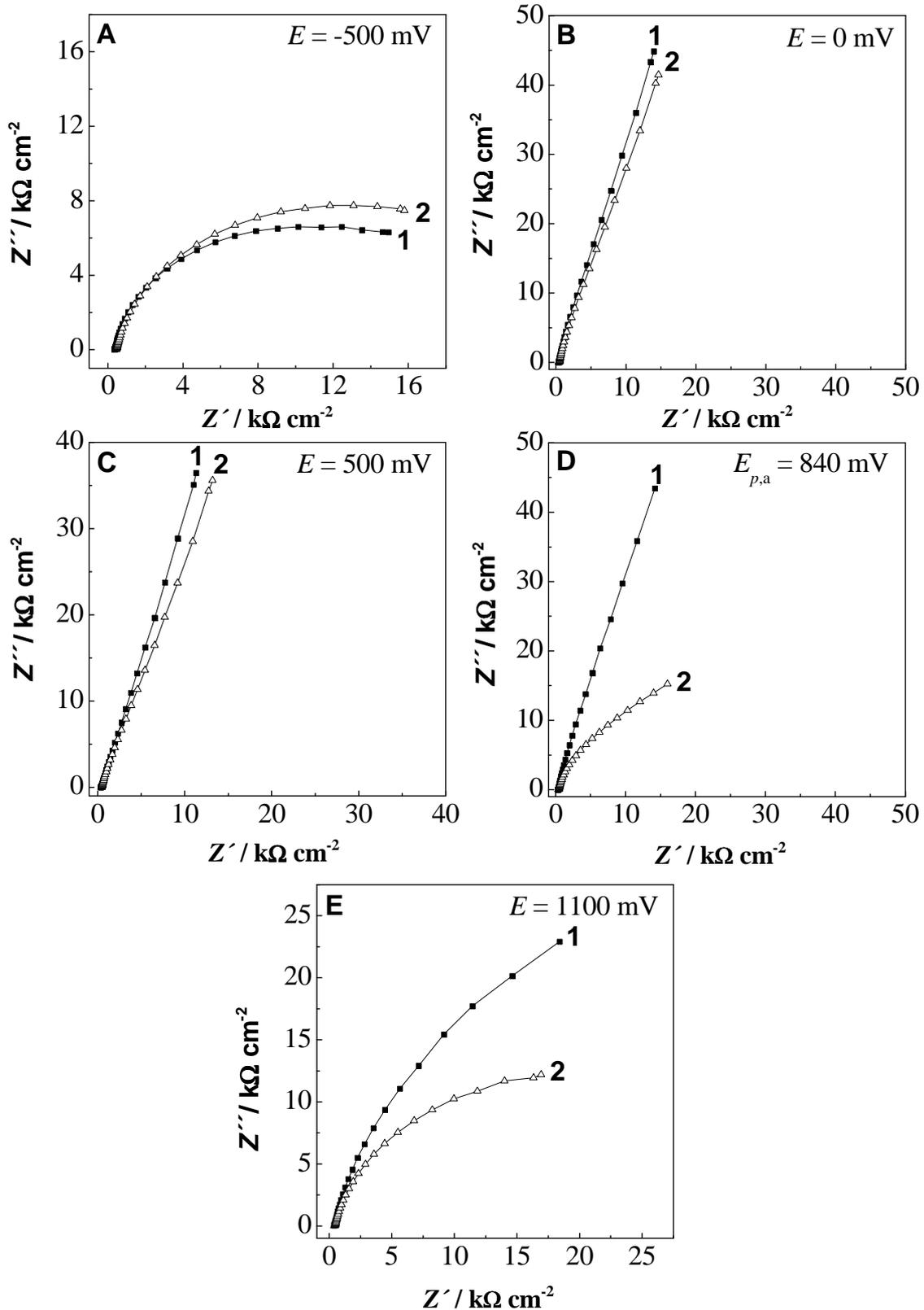


FIGURA 4.26: Registros dos espectros de impedância eletroquímica nos cinco potenciais estudados; OCP = 300 mV; $[\text{MX}] = 6,25 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$; 1 – branco (HCl/KCl pH 2,5); 2 – $[\text{MX}] = 6,25 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$.

A Figura 4.27 representa o circuito referente à interface da superfície do eletrodo e a dupla camada durante a eletro-oxidação do MX.

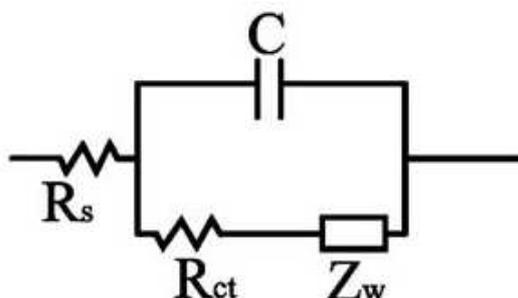


FIGURA 4.27: Circuito representa a interface da superfície do eletrodo e a dupla camada, segundo os estudos de impedância.

Este diagrama, R_s representa a resistência ôhmica do eletrólito (426Ω) C representa um elemento de fase constante (CPE), R_{CT} é a resistência da transferência de carga ($3,34 \times 10^4 \Omega$) e Z_w é a constante de difusão ($1 \times 10^{-4} \Omega \text{ s}^{1/2}$). O valor da transferência de carga é $3,85 \times 10^{-5} \text{ F}$. A taxa de transferência de elétrons (K_{app}) foi calculada pela Equação apresentada abaixo e seu valor foi $1,25 \times 10^{-5} \text{ cm s}^{-1}$:

$$K_{app} = RT/F^2 R_{ct} [MX]; \text{ na qual } [MX] = 6,25 \times 10^{-7} \text{ mol cm}^{-3}$$

4.2.4.6. Avaliação do efeito da adsorção de MX na superfície do GPUE

Os experimentos consistiram em registrar os espectros de impedância na ausência e na presença de MX na concentração de $6,62 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ na célula (Figura 4.28).

Após a realização da espectroscopia de impedância eletroquímica, na mesma célula, sem qualquer tipo limpeza ou mudança de configuração, foi realizado um experimento de CV, no qual foram realizados 15 ciclos voltamétricos usando os parâmetros definidos anteriormente nos estudos de CV (Figura 4.29), após os CV, na mesma célula e sem qualquer tipo de modificação,

foi realizada novamente a espectroscopia de impedância eletroquímica (Figura 4.28).

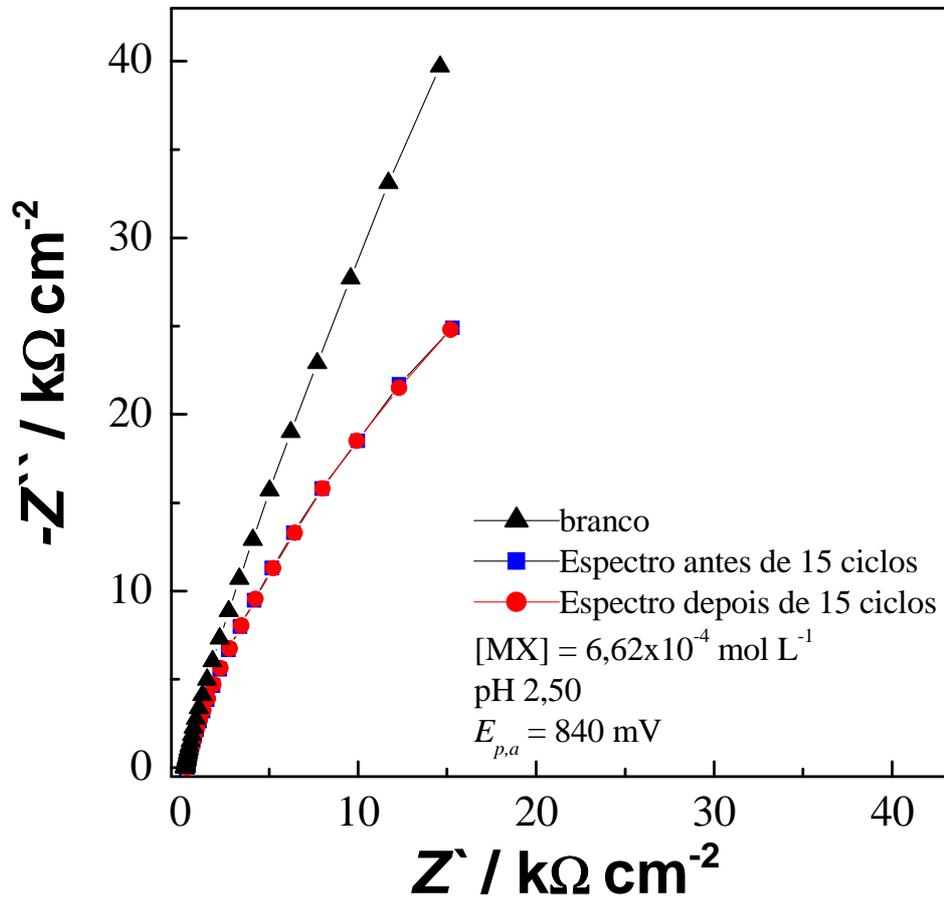


FIGURA 4.28: Estudo do efeito da adsorção de MX pela superfície do GPUE usando impedância eletroquímica antes e depois da avaliação por voltametria cíclica; $[\text{MX}] = 6,62 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$.

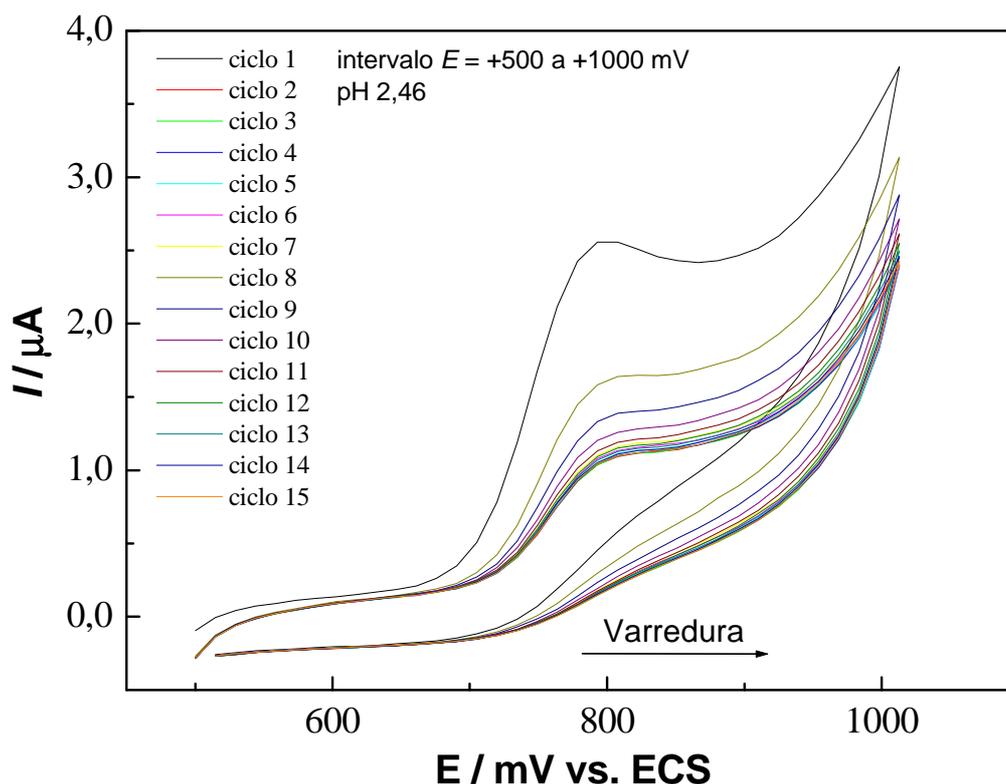


FIGURA 4.29: Avaliação do efeito da adsorção de MX na superfície do GPUE usando CV; eletrólito HCl/KCl pH 2,46; $E_{p,a} = 840$ mV; intervalo de potenciais de +500 a +1100 mV; $v = 25$ mV s⁻¹; [MX] = $6,62 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹.

O estudo de adsorção por CV (Figura 4.29) mostra uma queda sucessiva na $I_{p,a}$ entre o 1º e o 6º ciclo, estabilizando a $I_{p,a}$ a partir do 7º ciclo. Essa queda de $I_{p,a}$ indica que o eletrodo adsorve o analito. Entretanto, pelo estudo de impedância (Figura 4,29), nota-se que não houve nenhuma variação na impedância comparando-se os espectros de antes e depois da CV. Ou seja, segundo a impedância eletroquímica, não houve mudança na superfície do eletrodo provocada pelo analito, portanto, pela impedância eletroquímica não houve adsorção de MX pelo GPUE.

As diferenças observadas entre os voltamogramas da Figura 4.29 e os da Figura 4.17 foram atribuídas à mudança na superfície do eletrodo causada pelas sucessivas renovações e se deve à uma provável heterogeneidade do compósito. Entretanto, a idéia de que há uma adsorção leve na superfície não muda.

Portanto, a queda de $I_{p,a}$ observada no estudo de CV é atribuída a uma adsorção fraca e reversível. Isso se deve à polarização da superfície do GPUE, a qual mantém a forma oxidada do MX atraída eletrostaticamente, bloqueando parcialmente os sítios eletroativos do eletrodo.

4.2.5. Eletrodo Compósito de Grafite-Borracha de Silicone

4.2.5.1. Medida da superfície eletroativa do eletrodo de GSRE e coeficiente de difusão do minoxidil

A área da superfície eletroativa do GSRE foi determinada usando o $K_3Fe(CN)_6$ 5,00 mmol L⁻¹, em KCl 0,5 mol L⁻¹, como sonda eletroquímica. Estudou-se o efeito da variação da velocidade de varredura nas correntes de pico anódico e catódico do $K_3Fe(CN)_6$ usando CV, entre 10, 25, 35, 50, 69, 75 e 100 mV s⁻¹. A Figura 4.30 apresenta os voltamogramas cíclicos obtidos com as diferentes velocidades de varredura.

Calculou-se a área eletroativa do GSRE pela Equação de Randles e Sevcik (Equação 21, pág. 76), para cada velocidade de varredura usando as correntes encontradas no processo de oxidação do $K_3Fe(CN)_6$. O valor da área eletroativa calculada é a média aritmética dos valores das $I_{p,a}$ em cada velocidade de varredura estudada (Equação 21). A área eletroativa calculada do GSRE foi de $0,0898 \pm 0,004$ cm² (Brett; Brett, 1996).

Para a obtenção do coeficiente de difusão do MX, foi utilizada CV em diferentes velocidades de varredura (10, 25, 35, 50, 60, 75 e 100 mV s⁻¹) e tendo em consideração a área do GSRE determinada acima. O MX apresentou apenas um pico de oxidação, com máximo em 860 mV em solução HCl/KCl pH 2,0. A concentração de MX foi de $6,62 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹.

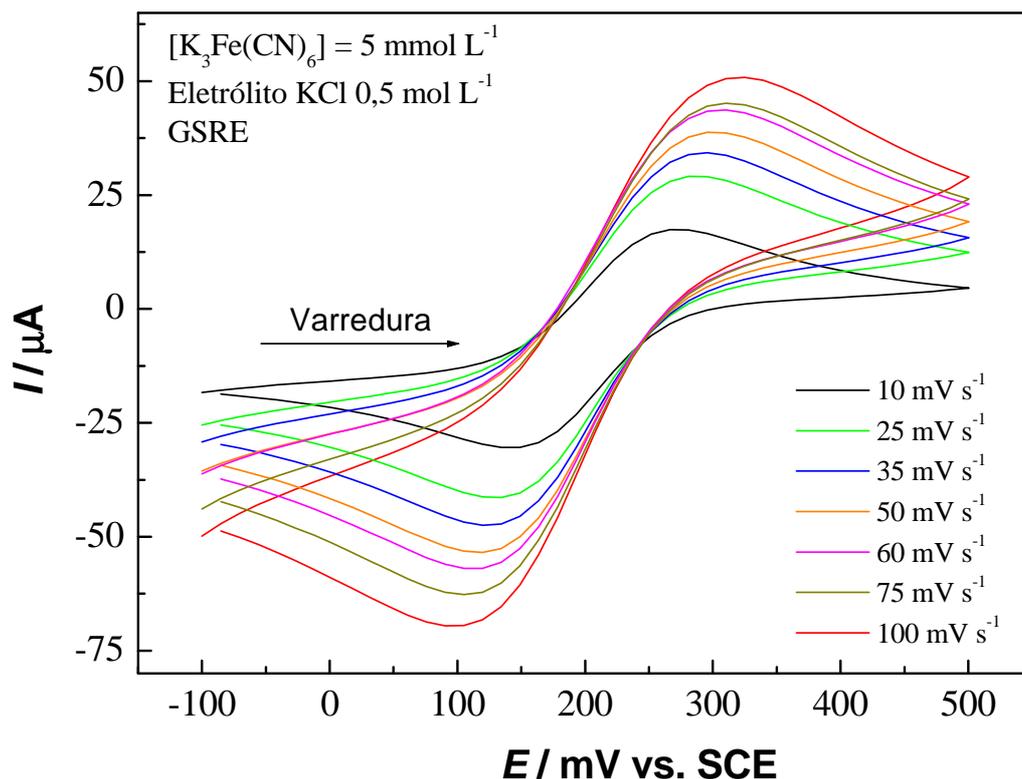


FIGURA 4.30: Voltamogramas cíclicos da solução de $K_3Fe(CN)_6$ $5,00 \text{ mmol L}^{-1}$ em KCl $0,5 \text{ mol L}^{-1}$, em diferentes velocidades de varredura, com o sinal do branco (KCl $0,5 \text{ mol L}^{-1}$) descontado.

A Equação de Ilkovic para processos irreversíveis (Equações 22 e 23) forneceu os valores dos coeficientes de difusão do analito para cada velocidade de varredura estudada. O valor do coeficiente de difusão do MX foi a média aritmética dos coeficientes de difusão medidas para cada velocidade de varredura. O coeficiente de difusão médio do MX foi de $(8,0 \pm 0,9) \times 10^{-6} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$.

4.2.5.2. Determinação de MX usando CV

Foi avaliada a influência do pH no potencial de oxidação do minoxidil, a Figura 4.31 apresenta os voltamogramas cíclicos para os diferentes pH estudados (2,02; 2,53; 3,43; 4,06; 5,24; 5,90 e 6,98) usando como base as soluções descritas na Tabela 3.7, pág 31.

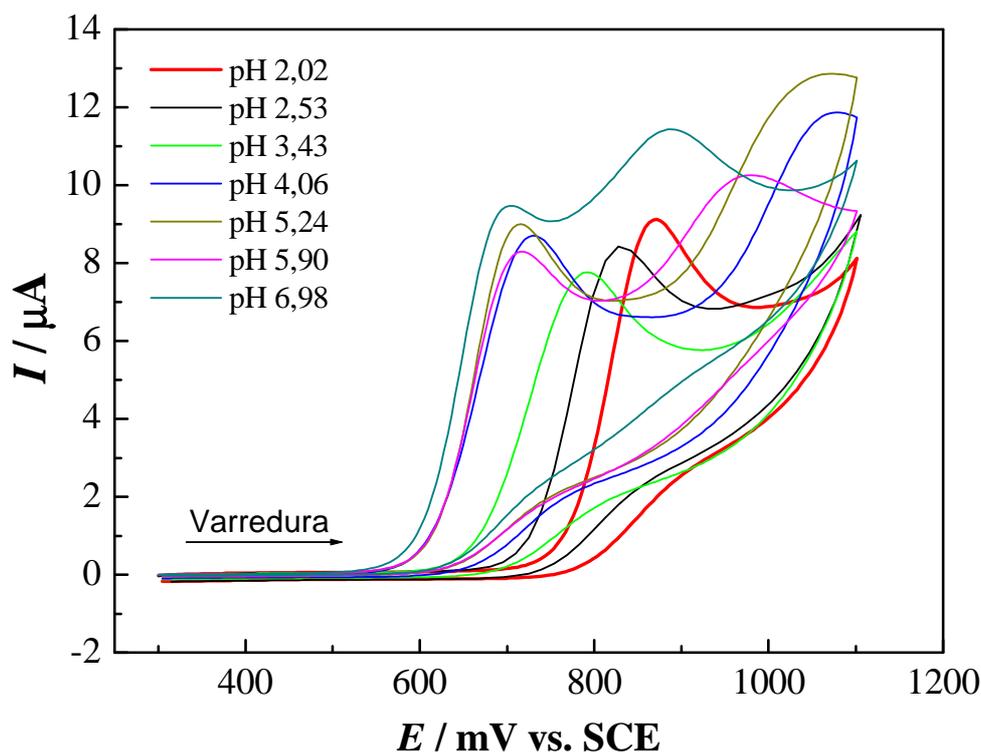


FIGURA 4.31: Registros da CV relativos ao estudo do efeito do pH no $E_{p,a}$ do MX; $\nu = 50 \text{ mV s}^{-1}$; janela de +300 a +1100 mV; $[\text{MX}] = 6,25 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$.

Os voltamogramas apresentados Figura 4.31 mostram o surgimento de um segundo pico anódico em pH acima de 4,06. Como discutido anteriormente, o MX apresenta o pK_a 4,61 (Po-Chang Chiang *et al.*, 2006), portanto, o surgimento do segundo pico de oxidação se deve ao surgimento de uma espécie eletroativa, provavelmente uma amina desprotonada. Essa espécie é eletro-oxidada no intervalo de potenciais usado, apresentando um segundo pico de oxidação bem mais pronunciado nesse caso que o observado no GPUE. Testes com outros sistemas tampão também mostraram o segundo pico.

A Figura 4.32 apresenta a dependência da $I_{p,a}$ em função do pH.

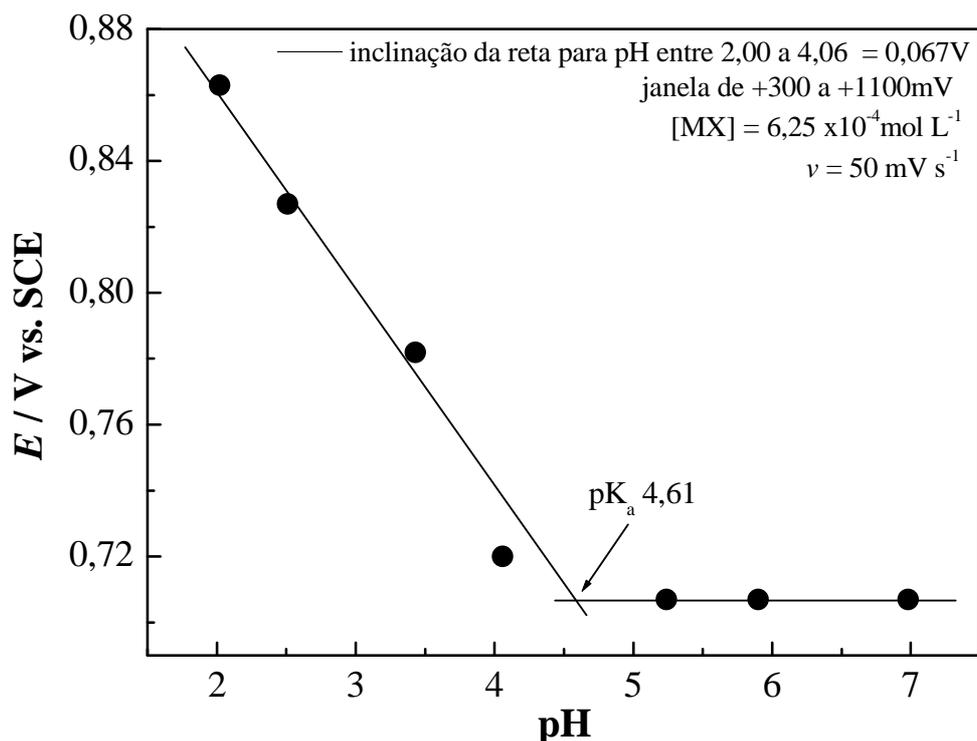


FIGURA 4.32: Estudo da influência do pH no $E_{p,a}$ do MX; $v = 50 \text{ mV s}^{-1}$; intervalo de potenciais de +300 a +1100 mV; $[\text{MX}] = 6,25 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$.

Observa-se, na Figura 4.32, uma região com variação nos valores de potencial de pico anódico do MX no intervalo de pH entre 2,00 a 4,06 com inclinação de -67 mV.

Entretanto, para valores de pH maiores que 4,06, não houve variação significativa nos valores de potencial de pico anódico do MX, considerando o primeiro processo eletroquímico. Esse efeito é atribuído à formação da espécie desprotonada do MX, como já foi discutido no caso do GPUE.

Para seleção do pH de trabalho, foi levado em consideração o melhor perfil voltamétrico, que foi obtido no pH 2,00.

O mecanismo da reação da eletro-oxidação foi determinado pelo coeficiente angular, que representa a curva potencial de pico em função do pH no intervalo de 2,00 a 4,06. Analogamente à seção 4.2.4.2, o mecanismo de um elétron por próton da eletro-oxidação foi obtido através do coeficiente angular da reta (67m V).

Para a confirmação do segundo pico como sendo um processo de oxidação, foram obtidas curvas CV restringindo-se o intervalo de potenciais ao suposto segundo processo na faixa de +750 a +1100mV, (Figura 4.33 A) no sentido de varredura positiva. Foi obtida também a curva CV com inversão do sentido de varredura no mesmo intervalo de potenciais do estudo da influência do pH (+300 a +1100 mV, Figura 4.33 B).

As Figura 4.33 A e 4.33 B indicam que o segundo pico é realmente um processo de oxidação, podendo ser atribuído ao MX desprotonado, como discutido anteriormente, pois nota-se que o mesmo é independente do primeiro pico e, portanto, não se trata de uma espécie eletrogerada.

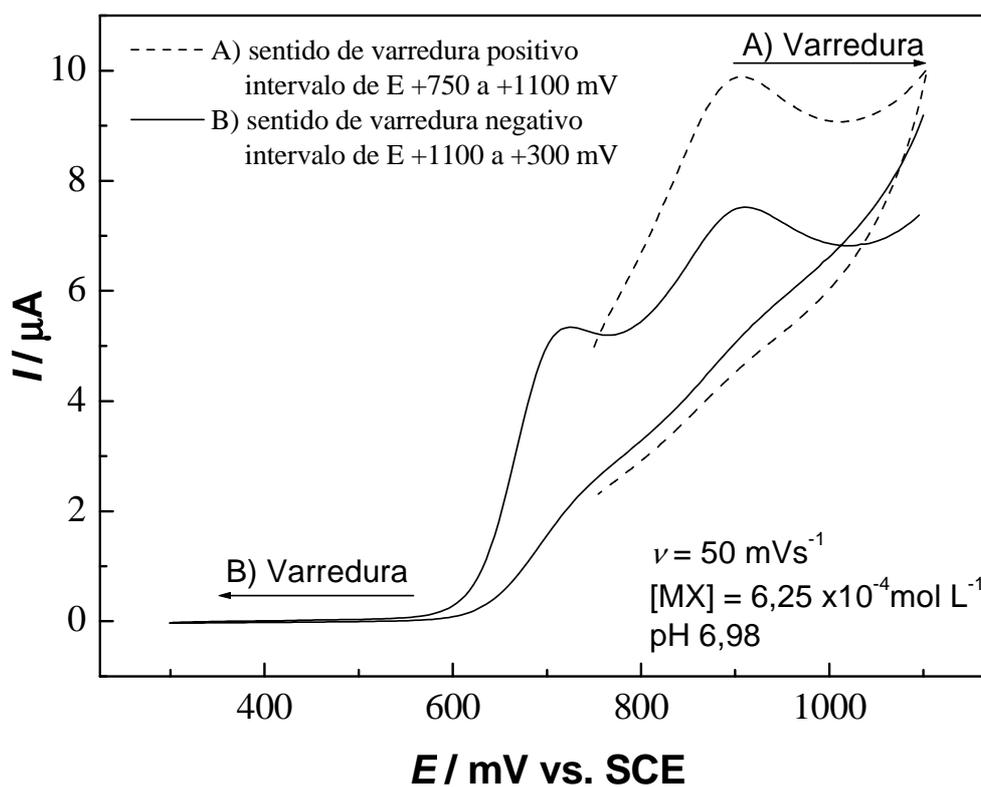


FIGURA 4.33: Voltamogramas cíclicos em pH 6,98: A) Intervalo de potenciais de +750 a +1100 mV no sentido positivo; B) Intervalo de potenciais de +300 a +1100 mV sentido negativo.

Foi realizado o tratamento matemático de deconvolução para avaliar a influência do 1º processo no 2º e vice-versa. Foi selecionado o

voltamograma cíclico obtido em pH 6,98 por ser o voltamograma em que os processos de oxidação são bem marcados. A Figura 4.35 ilustra o resultado do estudo de deconvolução.

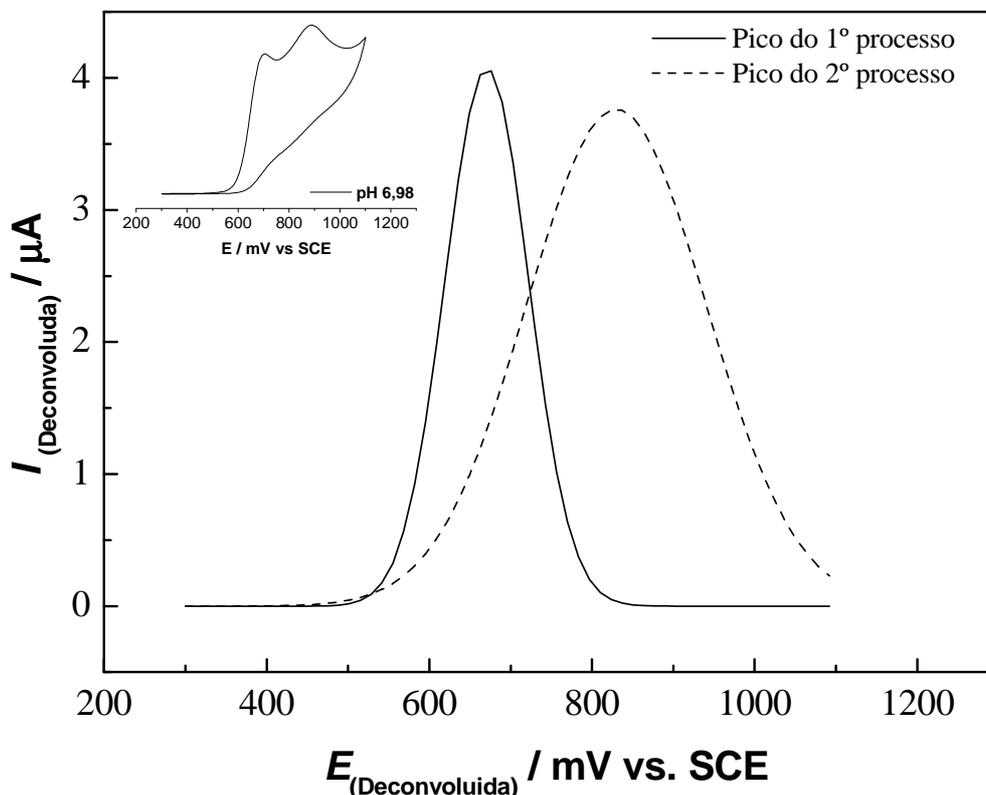


FIGURA 4.34: Deconvolução da curva voltamétrica em pH 6,98 usado na avaliação do 1º processo e do 2º processo; no detalhe o voltamograma como foi obtido. Condições: $v = 50 \text{ mV s}^{-1}$, $[\text{MX}] = 6,25 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$, pH 6,98, janela entre +300 a +1100 mV

Segundo a Figura 4.34, os picos de ambos os processos de oxidação se apresentam sobrepostos, distorcendo o perfil voltamétrico das curvas CV.

O estudo do segundo processo de oxidação não faz parte dos objetivos desse trabalho; portanto, será considerado apenas o pico de oxidação para o prosseguimento desse trabalho.

Estudou-se o efeito da velocidade de varredura para 10, 25, 40, 50, 75 e 100 mV s^{-1} . Esse estudo definiu a melhor velocidade de varredura usada em CV também foi usado para avaliar o processo de transferência de massa.

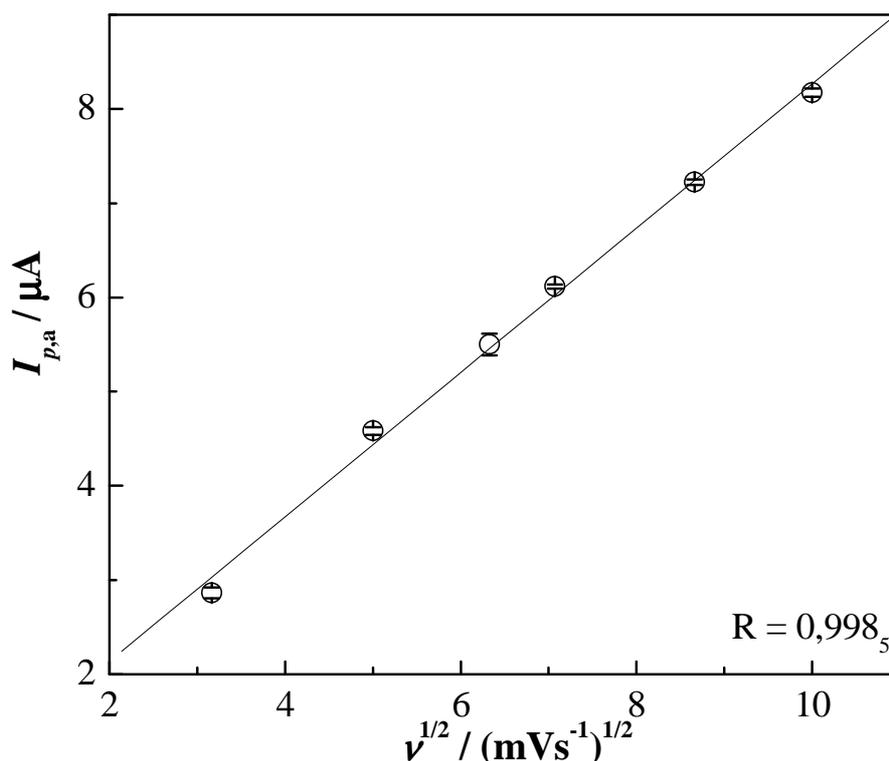


FIGURA 4.35: Influência da $v^{1/2}$ na $I_{p,a}$ indicando que transferência de massa é controlada por difusão; eletrólito HCl/KCl pH 2,0; intervalo de potenciais de +300 a +1100 mV; $E_{p,a} = 860$ mV.

A curva $I_{p,a}$ em função da raiz quadrada da velocidade de varredura é linear (Figura 4.35) indicando que o processo de transferência de massa é controlado por difusão.

A velocidade de varredura selecionada para os estudos posteriores foi a de 50 mV s^{-1} , devido ao menor desvio padrão das $I_{p,a}$ entre as triplicatas.

Estudou-se o melhor intervalo de potenciais para a determinação de MX sem prejuízo no processo de oxidação (Figura 4.36). O eletrólito usado foi HCl/KCl pH 2,0 e a concentração de MX foi de $6,25 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$. O intervalo de potenciais selecionado foi de + 600 a + 1100 mV, devido à melhor definição do perfil voltamétrico da curva CV, como se pode observar no detalhe da Figura 4.36.

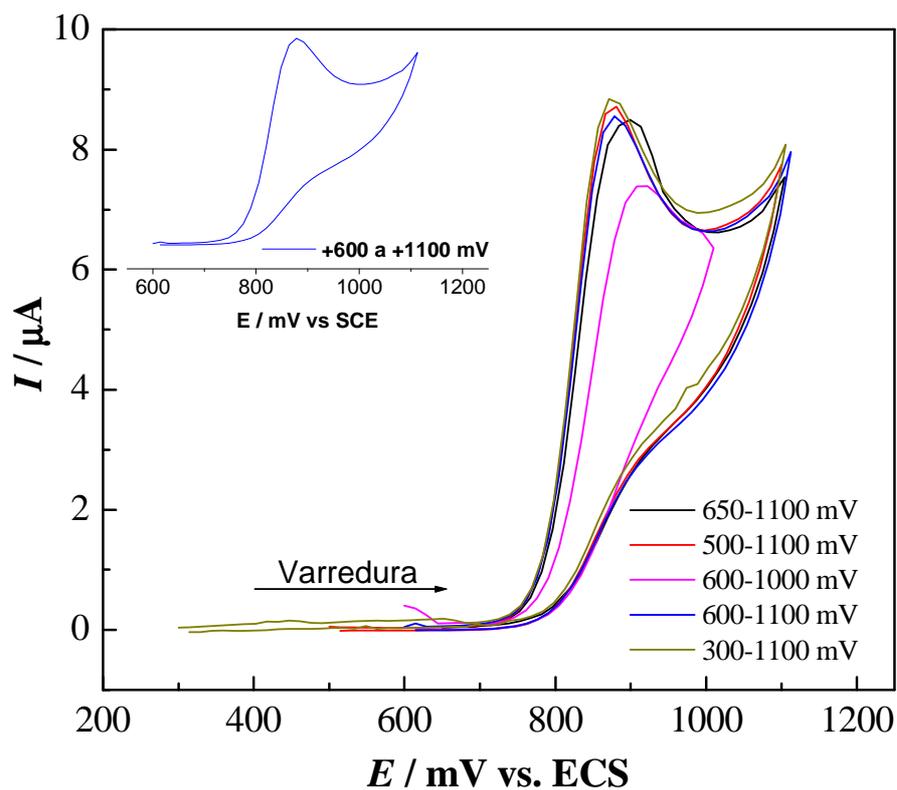


FIGURA 4.36: Estudo do efeito da variação do intervalo potencial na $I_{p,a}$; Eletrólito HCl/KCl pH 2,0; $[MX] = 6,25 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$; $E_{p,a} = 860 \text{ mV}$. Em detalhe, o voltamograma no intervalo +600 a +1100 mV.

Foi avaliado o efeito da variação da concentração de MX na corrente de pico anódico. O intervalo de concentração usado foi de $6,66 \times 10^{-6}$ a $3,23 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$. A Figura 4.37 apresenta os voltamogramas cíclicos da variação da concentração de MX.

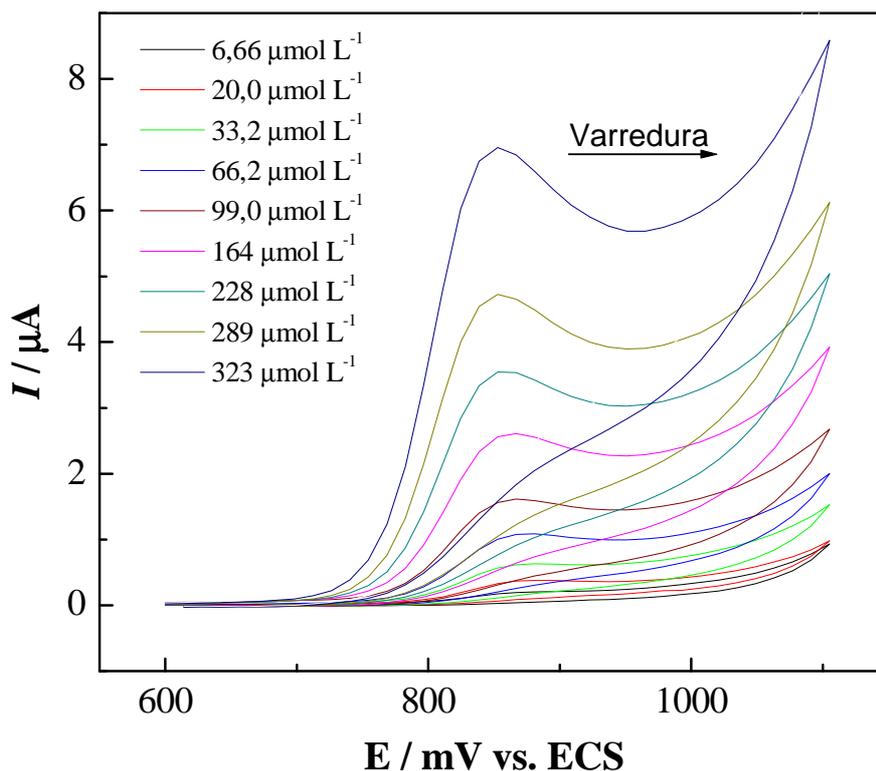


FIGURA 4.37: Estudo do efeito da variação da concentração de MX nos valores de $I_{p,a}$; em HCl/KCl pH 2,0; janela de +600 a +1100 mV; $E_{p,a} = 860$ mV.

A Figura 4.38 apresenta a curva analítica construída usando a região linear, que foi entre $3,32 \times 10^{-5}$ a $2,89 \times 10^{-4}$ mol L^{-1} . A Equação 29 representa a equação da reta da curva analítica.

$$I_{p,a} = 4,72 \times 10^3 [\text{MX}] + 2,73 \times 10^{-2}; R = 0,9997; n = 6 \quad \text{Equação 29}$$

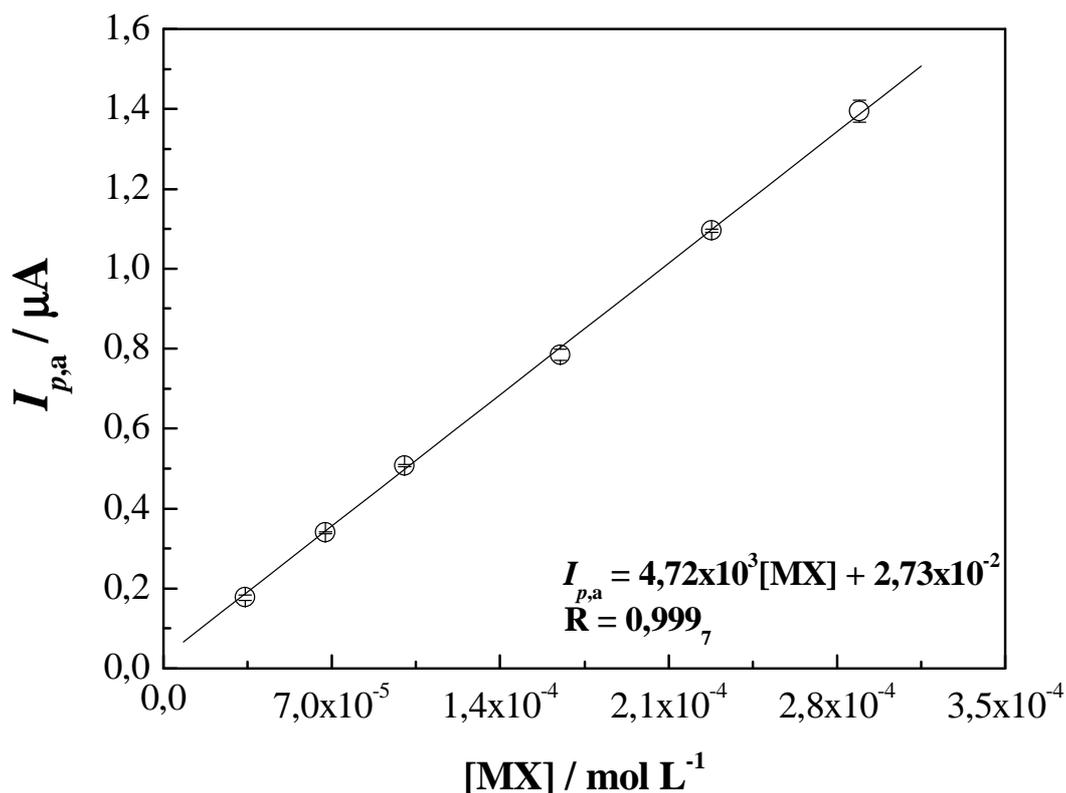


FIGURA 4.38: Curva analítica para a determinação de MX usando CV; em HCl/KCl pH 2,0; janela de +600 a +1100mV; $E_{p,a} = 860$ mV.

Os limites de detecção e quantificação foram $2,23 \times 10^{-5}$ e $3,18 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹, respectivamente, seguindo a forma de cálculo apresentada anteriormente na seção 4.1.2.3 (Equações 15 e 16, pág. 54).

A Tabela 4.31 apresenta os resultados da análise das amostras usando CV. Os teores de MX contido nas amostras foram determinados através da Equação 29, representando a curva analítica (Figura 4.38).

TABELA 4.31: Resultados das análises das amostras usando CV

<i>Amostra</i>	<i>Rótulo</i>	<i>CV</i> ^d	<i>Erro1</i> ^e	<i>Erro2</i> ^f	<i>Recuperação / %</i>
<i>Regaine</i> ^a	20	19.8 ± 0.3	-1,2	-6.2	84
<i>Loniten</i> ^b	10	10.6 ± 0.7	6,4	4.9	110
<i>Manipulado</i> ^a	50	52 ± 5	4,3	-1.3	103
<i>Urina</i> ^c	25	24 ± 4	-3,1	-	-
<i>Plasma</i> ^c	25	27 ± 4	8,3	-	-

a: mg mL⁻¹; b: mg comprimido⁻¹; c: μmol L⁻¹; d: n = 3; e: erro relativo ao rótulo ± desvio padrão; f: erro relativo ao método comparativo

Os resultados de concentração de MX nas amostras obtidos pela CV, ao aplicar o teste t-Student, concordaram em 95% tanto com os valores rotulados quanto com os resultados do método comparativo.

4.2.5.3. Determinação de MX usando Voltametria de Onda Quadrada (SWV)

Foi estudada a influência da variação dos valores da amplitude, do incremento de potencial e da frequência na determinação de MX por SWV. A Figura 4.39 apresenta os voltamogramas do estudo da influência da variação dos valores da amplitude, do incremento de potencial e da frequência.

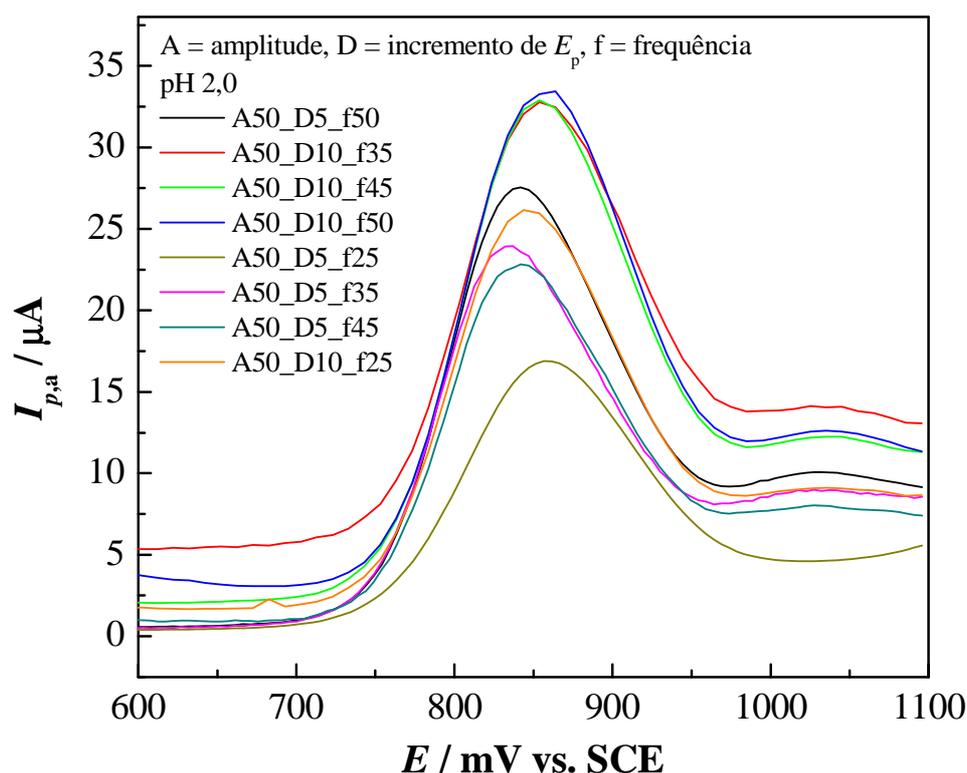


FIGURA 4.39: Voltamogramas de onda quadrada obtidos a partir do estudo da variação da amplitude, do incremento de potencial e da frequência; em HCl/KCl pH 2,0; janela de +300 a 1100 mV; $[MX] = 6,65 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$.

Comparando-se os perfis dos voltamogramas (Figura 4.39) com os resultados descritos na Tabela 4.32, a melhor combinação de incremento de

potencial, amplitude e frequência foram 10 mV, 50 mV e 50 Hz, respectivamente. Nota-se, na Figura 4.39, um segundo pico de oxidação discreto e no potencial da ordem de 1025 mV, esse pico é atribuído à espécie formada pela desprotonação do MX, discutido anteriormente. Apesar de estar presente em baixas concentrações nesse pH, a SWV é muito sensível e capaz de detectar a espécie.

A equação 26 (pág. 91) permitiu a avaliação da reversibilidade do processo, considerando-se o alargamento do pico em função do aumento da frequência. Assim pode-se concluir que o sistema é irreversível, o que concorda com o encontrado em CV (Brett; Brett, 1996).

TABELA 4.32: Valores de $I_{p,a}$ e de $W_{1/2}$ obtidos a partir dos estudos dos parâmetros da SWV

Parâmetros^a	$I_{p,a} / \mu\text{A}$	$W_{1/2} / \text{mV}$
<i>A50; D5; f25</i>	$1,4 \pm 0,2$	122 ± 0
<i>A50; D5; f35</i>	$1,9 \pm 0,2$	109 ± 3
<i>A50; D5; f45</i>	$1,9 \pm 0,6$	112 ± 0
<i>A50; D5; f50</i>	$2,2 \pm 0,6$	109 ± 3
<i>A50; D10; f25</i>	$2,1 \pm 0,2$	114 ± 6
<i>A50; D10; f35</i>	$2,4 \pm 0,3$	121 ± 0
<i>A50; D10; f45</i>	$2,6 \pm 0,4$	121 ± 0
<i>A50; D10; f50</i>	$2,7 \pm 0,8$	121 ± 0

a: A = amplitude / mv, D = incremento de potencial/mV e f frequência/Hz.

Avaliou-se o intervalo útil de potenciais para determinação de MX usando SWV e o GSRE. A Figura 4.40 apresenta os voltamogramas cíclicos nos diferentes intervalos de potencial estudados. O intervalo de potenciais selecionado foi de +500 a +1050 mV, apresentado no detalhe da Figura 4.40.

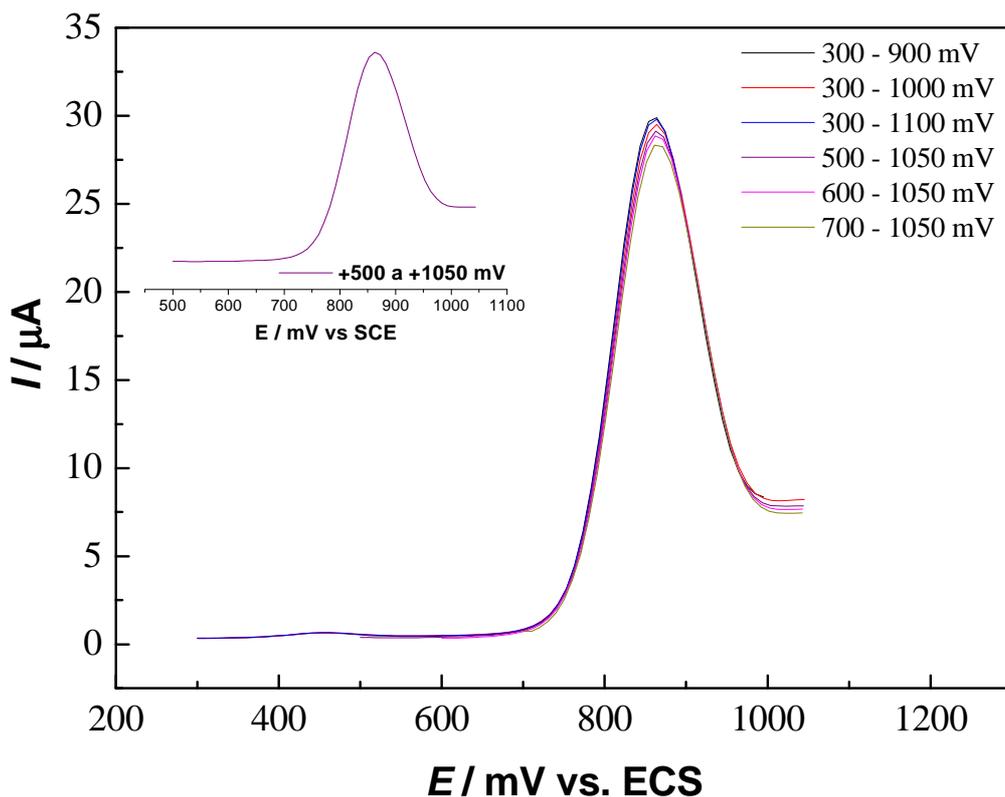


FIGURA 4.40: Estudo do efeito da variação do intervalo potencial na $I_{p,a}$: eletrólito HCl/KCl pH 2,0 $[MX] = 6,65 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$; $E_{p,a} = 860 \text{ mV}$. No detalhe, o intervalo escolhido.

A Figura 4.41 apresenta o estudo do efeito da adição sucessiva de alíquotas de solução estoque de MX. O intervalo de concentração de MX estudado foi de $6,66 \times 10^{-6}$ a $1,25 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$.

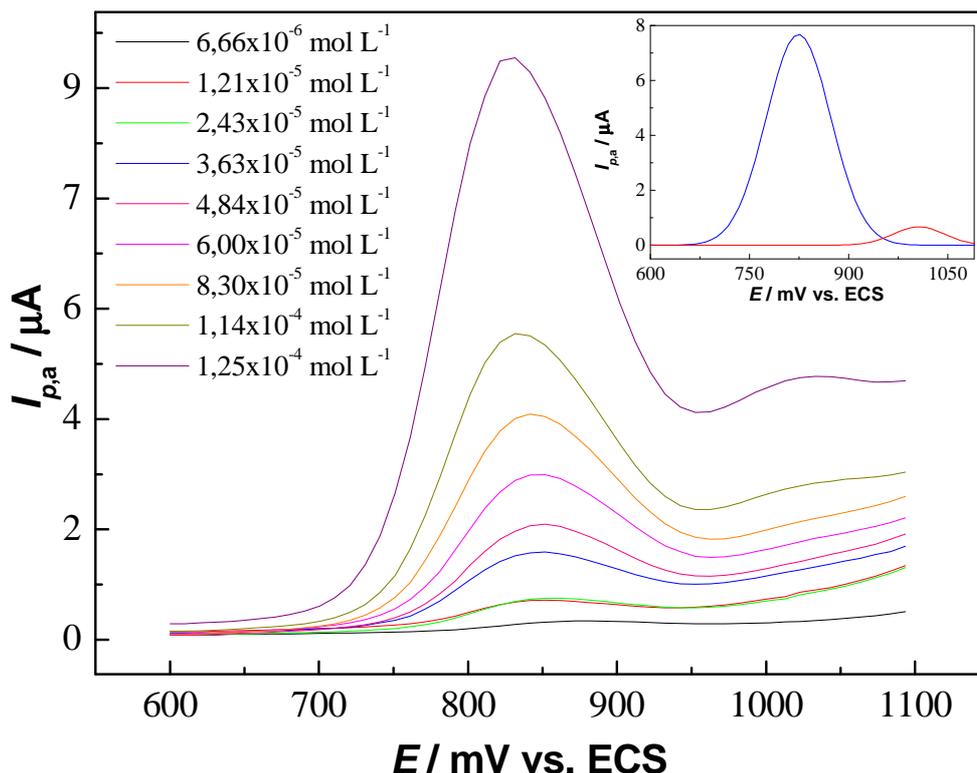


FIGURA 4.41: Estudo do efeito da adição sucessiva de alíquotas de solução estoque de MX nos valores de $I_{p,a}$; eletrólito HCl/KCl pH 2,0; intervalo de potenciais +600 a +1100 mV; $\nu = 50 \text{ mV s}^{-1}$; $E_{p,a} = 860 \text{ mV}$. No detalhe a deconvolução da curva SWV na concentração de MX = $1,14 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$.

A deconvolução apresentada no detalhe da Figura 4.41 mostra que há dois processos de oxidação, o primeiro em 860 mV e o segundo em 1030 mV e, ainda, pode-se afirmar que não há influência do 1º pico no 2º e vice versa.

A Figura 4.42 apresenta a curva analítica no intervalo linear de concentração de MX entre $1,21 \times 10^{-5}$ a $1,14 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ e a Equação 30 representa a curva analítica.

$$I_{p,a} = 1,61 \times 10^4 [\text{MX}] + 1,03 \times 10^{-1}; R = 0,9995; n = 7 \quad \text{Equação 30}$$

Os LD eLQ foram calculados seguindo o método descrito na seção 4.1.2.3 (Equações 15 e 16, pág. 54) e seus valores foram $2,88 \times 10^{-6}$ e $9,38 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$, respectivamente.

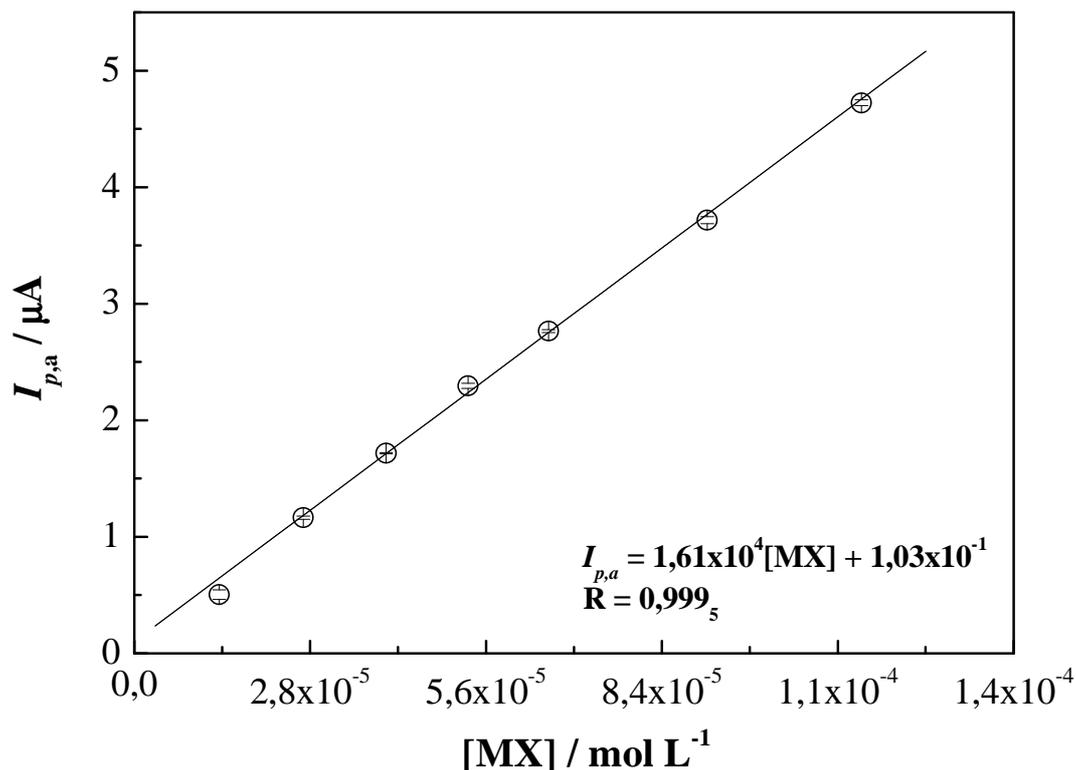


FIGURA 4.42: Curva analítica Estudo do MX; eletrólito HCl/KCl pH 2,0; intervalo de potenciais +600 a +1100 mV; $\nu = 50 \text{ mV s}^{-1}$; $E_{p,a} = 860 \text{ mV}$; no detalhe, a curva analítica.

A Tabela 4.33 apresenta os resultados para a análise das amostras usando SVW.

Os níveis de confiança foram calculados através do teste t-Student. Os resultados obtidos em SWV concordam em 95% com os valores rotulados e os resultados obtidos no método comparativo.

TABELA 4.33: Resultados das análises das amostras usando SWV

<i>Amostra</i>	<i>Rótulo</i>	<i>SWV</i> ^d	<i>Erro1</i> ^e	<i>Erro2</i> ^f	<i>Recuperação / %</i>
<i>Regaine</i> ^a	20	20,05 ± 0,06	0,25	4,9	93
<i>Loniten</i> ^b	10	10,3 ± 0,3	3,0	1,9	101
<i>Manipulado</i> ^a	50	46,1 ± 0,2	-7,8	12,5	99
<i>Urina</i> ^c	25	26 ± 1	4,0	-	-
<i>Plasma</i> ^c	25	26,8 ± 0,3	7,2	-	-

a: mg mL⁻¹; b: mg comprimido⁻¹; c: µmol L⁻¹; d: n = 3; e: erro relativo ao rótulo ± desvio padrão; f: erro relativo ao método comparativo

4.2.5.4. Determinação de MX usando Voltametria de Pulso Diferencial (DPV)

Avaliou-se a influência da variação dos valores de amplitude, incremento de potencial e velocidade de varredura usando GSRE na oxidação do MX por DPV. A Tabela 4.34 apresenta os valores de amplitude, incremento de potencial e velocidade de varredura estudados.

A concentração de MX foi de $3,23 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹ na célula. O eletrólito era HCl/KCl pH 2,00. Todos os experimentos foram realizados em triplicata, sendo considerada a média e o desvio padrão para cada experimento.

A Figura 4.43 apresenta os voltamogramas para os valores de amplitude, incremento de potencial e velocidade de varredura que forneceram os melhores resultados.

TABELA 4.34: Valores de amplitude, incremento de potencial e velocidade de varredura para a definição dos parâmetros da DPV

Amplitude / mV	Incremento de E / mV	ν / mV s⁻¹
25,0	5,00	12,5
50,0	5,00	12,5
100	5,00	12,5
25,0	10,0	25,0
50,0	10,0	25,0
100	10,0	25,0
25,0	20,0	50,0
50,0	20,0	50,0
100	20,0	50,0
25,0	30,0	75,0
50,0	30,0	75,0
100	30,0	75,0
25,0	40,0	100
50,0	40,0	100
100	40,0	100

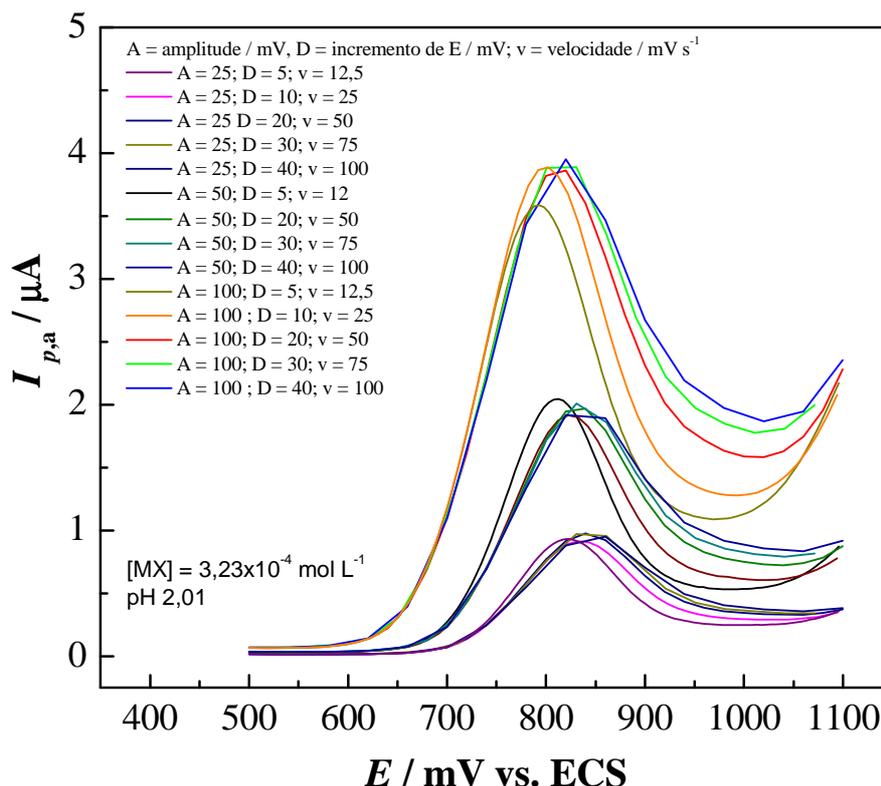


FIGURA 4.43: Voltamogramas referentes à avaliação da amplitude, do incremento de potencial e da velocidade de varredura para a determinação de MX por DPV; eletrólito HCl/KCl pH 2,0; $[MX] = 3,23 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$.

A Tabela 4.35 apresenta os valores de $I_{p,a}$ e $W_{1/2}$ para o estudo da influência da variação dos valores de amplitude, incremento de potencial e velocidade de varredura.

Considerando o alargamento do pico de oxidação em função da velocidade e varredura pode-se concluir que o sistema é irreversível concordando com a CV e a SWV (Equação 26, pág. 91).

Para algumas combinações de amplitude, incremento de potencial e velocidade, o perfil voltamétrico distorcido tornou impraticável o cálculo do $W_{1/2}$, portanto, impossibilitando a obtenção do número de elétrons envolvidos no processo eletroquímico (Equação 26).

O melhor conjunto de valores foi amplitude de 100 mV; incremento de potencial de 20,0 mV e velocidade de varredura de 50 mV s^{-1} .

TABELA 4.35: Parâmetros experimentais estudados para a determinação de MX por DPV

Parâmetros ^a	$I_{p,a} / \mu\text{A}$	$W_{1/2} / \text{mV}$
A25; D 5; v 12,5	8,28 ± 0,04	501 ± 7
A25; D 10; v 25	7,730 ± 0,002	131 ± 0
A25; D 20; v 50	7,990 ± 0,003	140 ± 0
A25; D 30; v 75	8,221 ± 0,001	NC*
A25; D 40; v 100	1,1 ± 0,1	NC*
A50; D 5; v 12,5	1,2 ± 0,8	117 ± 0
A50; D 10; v 25	1,620 ± 0,006	131 ± 4
A50; D 20; v 50	1,59 ± 0,01	120 ± 0
A50; D 30; v 75	1,15 ± 0,3	NC*
A50; D 40; v 100	1,612 ± 0,005	NC*
A100; D 5; v 12,5	2,98 ± 0,04	135 ± 3
A100; D 10; v 25	3,22 ± 0,02	141 ± 0
A100; D 20; v 50	3,10 ± 0,01	94,8 ± 0,2
A100; D 30; v 75	3,02 ± 0,07	150 ± 0
A100; D 40; v 100	3,212 ± 0,005	NC*

a – A = amplitude / mV; D = incremento de E/mV; v = mV s⁻¹

* NC – não considerado; pico pouco definido.

A Figura 4.44 apresenta os voltamogramas cíclicos do estudo da adição sucessiva de alíquotas de solução estoque de MX na corrente de pico anódico. O intervalo de concentração estudado foi de $2,66 \times 10^{-6}$ a $3,58 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹.

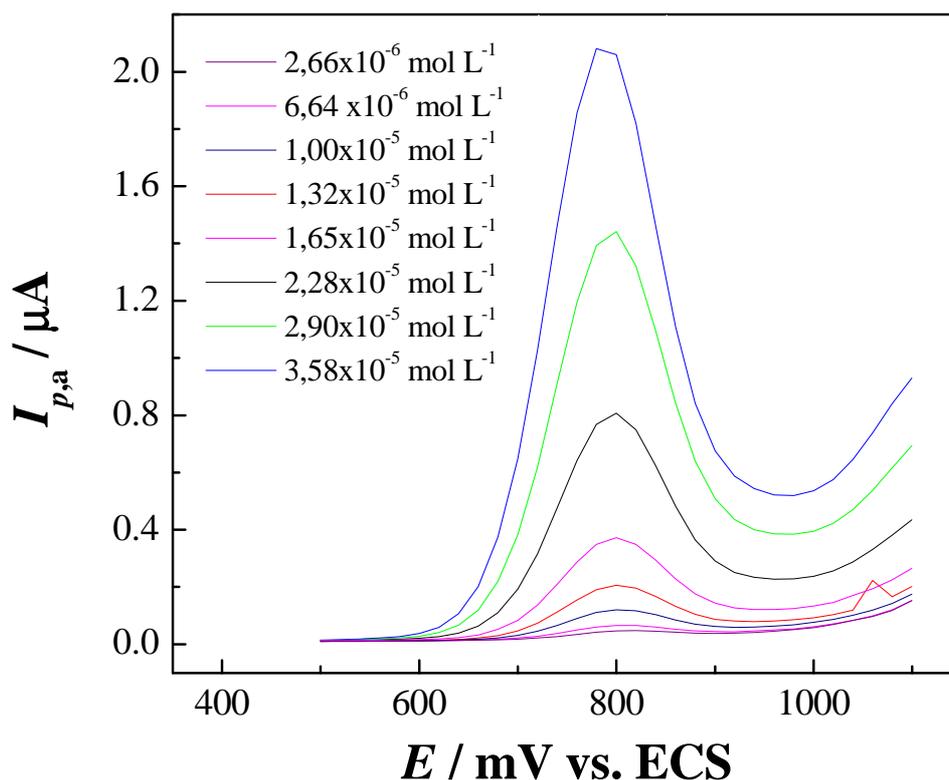


FIGURA 4.44: Estudo do efeito da variação da concentração de MX nos valores de $I_{p,a}$. Amplitude = 100 mV; incremento de potencial = 20 mV; $\nu = 50 \text{ mV s}^{-1}$; eletrólito HCl/KCl pH 2,0; $E_{p,a} = 795 \text{ mV}$.

A Equação 31 representa a equação da reta da curva analítica apresentada na Figura 4.45. O intervalo de resposta linear foi de $6,64 \times 10^{-6}$ a $2,90 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ para a concentração de MX.

Os limites de detecção e quantificação foram $3,07 \times 10^{-6}$ e $1,03 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$, respectivamente, sendo seu cálculo baseado no método descrito na seção 4.1.2.3 (Equações 15 e 16 pág. 54).

$$I_{p,a} = 5,12 \times 10^4 [\text{MX}] + 9,36 \times 10^{-2}; R = 0,9997; n = 6 \quad \text{Equação 31}$$

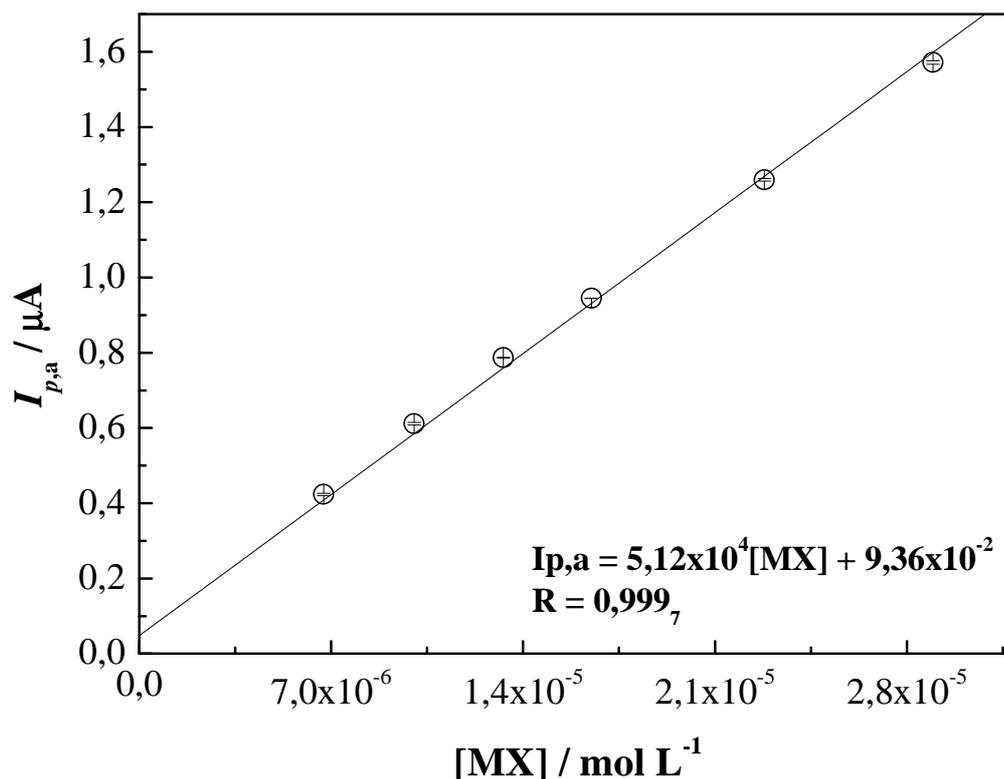


FIGURA 4.45: Curva analítica do MX; Amplitude = 100 mV; incremento de potencial = 20 mV; $\nu = 50 \text{ mV s}^{-1}$; eletrólito HCl/KCl pH 2,0; $E_{p,a} = 795 \text{ mV}$. No detalhe, a curva analítica.

Os resultados (Tabela 4.36) obtidos em SWV foram submetidos ao teste t-Student. Os resultados de SWV concordam em nível de 95% tanto com os valores rotulados, quanto com os resultados obtidos no método comparativo.

TABELA 4.36: Resultados obtidos nas análises das amostras usando DPV

<i>Amostra</i>	<i>Rótulo</i>	<i>DPV</i> ^d	<i>Erro1/%</i> ^e	<i>Erro2/%</i> ^f	<i>Recuperação / %</i>
<i>Regaine</i> ^a	20	19,9 ± 0,1	-0,500	-5,7	93
<i>Loniten</i> ^b	10	9,5 ± 0,4	-5,00	5,9	100
<i>Magistral</i> ^a	50	51,5 ± 0,4	3,07	2,3	99
<i>Urina</i> ^c	25	25,90 ± 0,03	3,48		
<i>Plasma</i> ^c	25	26,4 ± 0,8	5,55		

a: mg mL⁻¹; b: mg comprimido⁻¹; c: µmol L⁻¹; d: n = 3; e: erro relativo ao rótulo ± desvio padrão; f: erro relativo ao método comparativo

4.2.5.5. Estudos de Impedância Eletroquímica

Foi avaliado o comportamento da superfície do GSRE usando espectroscopia de impedância eletroquímica, na presença e na ausência de MX e em cinco potenciais diferentes, sendo um deles o potencial de pico anódico do analito. A configuração da eletroquímica foi a mesma da usada nos estudos voltamétricos. A concentração de MX na célula foi de $6,25 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹.

A Figura 4.46 foi dividida em 5 partes (A, B, C, D e E) e apresenta os espectros de impedância eletroquímica nos diferentes potenciais (-500, 0, +500, +860 e +1100 mV). A Figura 4.46 D apresenta o espectro de impedância no potencial de oxidação do MX (860 mV), as Figuras 4.46A, 4.46B, 4.46C e 4.46E têm os respectivos potenciais; -500, 0, 500 e 1100 mV.

O espectro de impedância apresentado na Figura 4.46 D aponta uma redução da impedância com a adição de MX, indicando a transferência de carga entre o eletrodo e a solução contendo o analito. Em todos os outros potenciais estudados, não ocorreu mudança significativa na impedância do sistema ao se adicionar MX e os espectros registrados caracterizam um eletrodo de superfície porosa. A Figura 4.46 E apresenta o espectro de impedância no potencial de +1100 mV na qual nota-se algum processo relativo à oxidação do grafite e liberação de oxigênio.

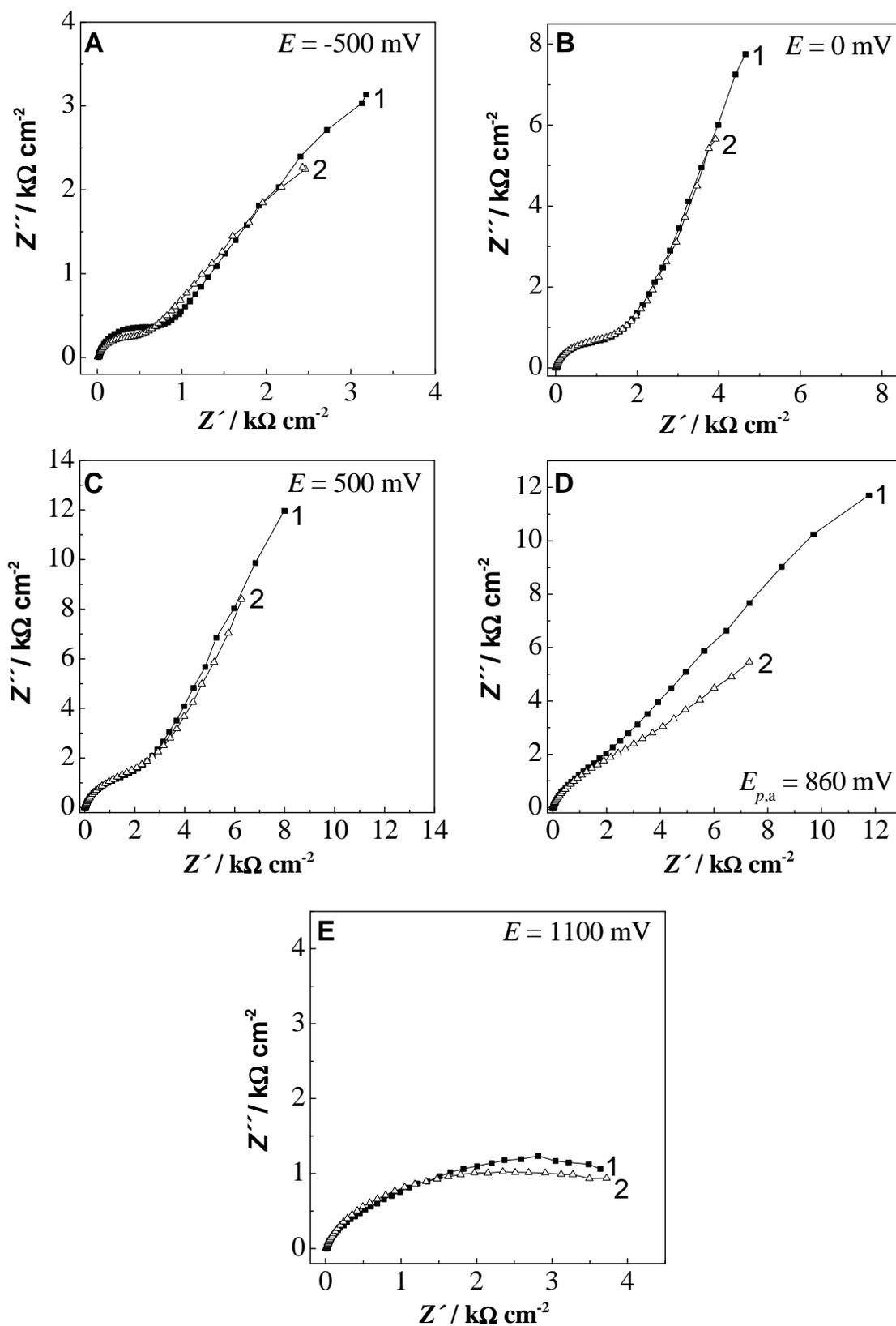


FIGURA 4.46: Registros dos espectros de impedância eletroquímica nos cinco potenciais estudados; OCP = 175 mV; $[MX] = 6,25 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$; 1 – branco; 2 – $[MX] = 6,25 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$.

Na Figura 4.47, é representado o circuito referente à interface da superfície do eletrodo e a dupla camada durante a eletro-oxidação do MX.

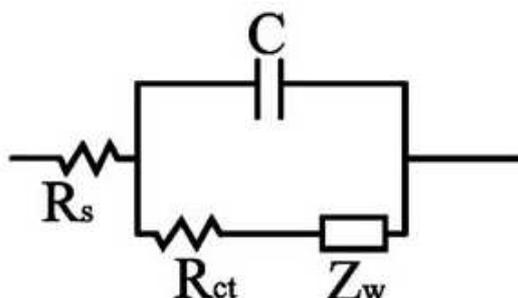


FIGURA 4.47: Circuito referente à interface da superfície do eletrodo e a dupla camada segundo estudos de impedância.

Neste esquema R_s representa a resistência do eletrólito ($10,63 \Omega$), C é um elemento constante de fase (CPE), R_{CT} é a resistência do eletrodo ($3,47 \times 10^3 \Omega$) e Z_w é a constante de difusão ($1 \times 10^{-4} \Omega \text{ s}^{1/2}$). O valor da transferência de carga é $2,56 \times 10^{-5} \text{ F}$. A taxa de transferência de elétrons (K_{app}) foi calculada pela Equação apresentada abaixo e seu valor foi $7,50 \times 10^{-5} \text{ cm s}^{-1}$.

$$K_{app} = RT/F^2 R_{ct} [MX]; \text{ na qual } [MX] = 6,25 \times 10^{-7} \text{ mol cm}^{-3}$$

4.2.5.6. Avaliação do efeito da adsorção de MX pela superfície do GSRE

Foi avaliada a adsorção do MX pelo GSRE, os estudos consistiram na combinação das técnicas de Voltametria Cíclica e Espectroscopia de Impedância Eletroquímica.

Inicialmente, avaliou-se a variação da $I_{p,a}$ provocada pela suposta adsorção de MX pela superfície do GSRE. Foram obtidos 50 voltamogramas cíclicos de uma solução de MX em pH 2,0 na ordem de concentração do analito de $6,25 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ (Figura 4.48). Após essa etapa, a superfície do GSRE foi apenas lavada com água, foram realizados outros 50 voltamogramas cíclicos em solução HCl/KCl pH 2,0 na ausência de MX (Figura 4.49). Novamente o eletrodo foi lavado com água e outros 50 voltamogramas cíclicos foram

realizados agora com solução HCl/KCl pH 2,0 contendo MX na ordem $6,25 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ (Figura 4.50).

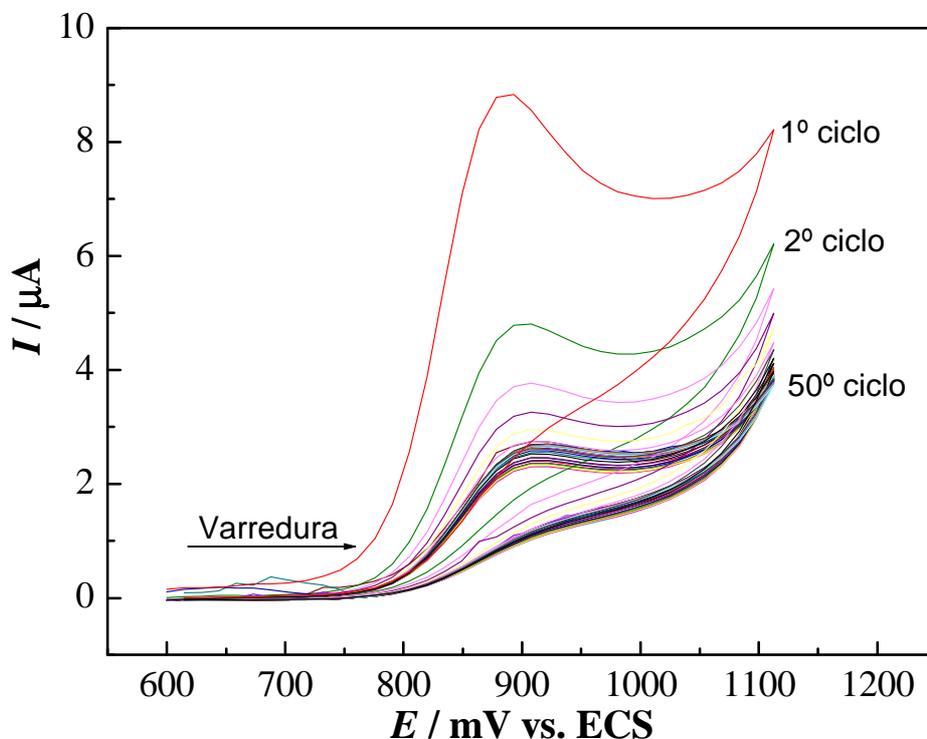


FIGURA 4.48: Avaliação do efeito da adsorção de MX na superfície do GSRE usando CV (50 ciclos voltamétricos); em HCl/KCl pH 2,0; $E_{p,a} = 860 \text{ mV}$; janela de +600 a +1100 mV; $\nu = 50 \text{ mV s}^{-1}$, $[\text{MX}] = 6,25 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$.

Na Figura 4.48, observa-se a queda sucessiva da $I_{p,a}$ entre o 1º e o 5º ciclos, entretanto, do 5º ao 50º ciclos, a $I_{p,a}$ se mantém praticamente constante.

A Figura 4.49 apresenta os voltamogramas do branco nos quais se pode observar que o 1º ciclo apresenta um pequeno processo de oxidação em torno de 900 mV. Entretanto, os ciclos sucessivos não apresentam processos, ou seja, no 1º ciclo houve a limpeza da superfície do eletrodo.

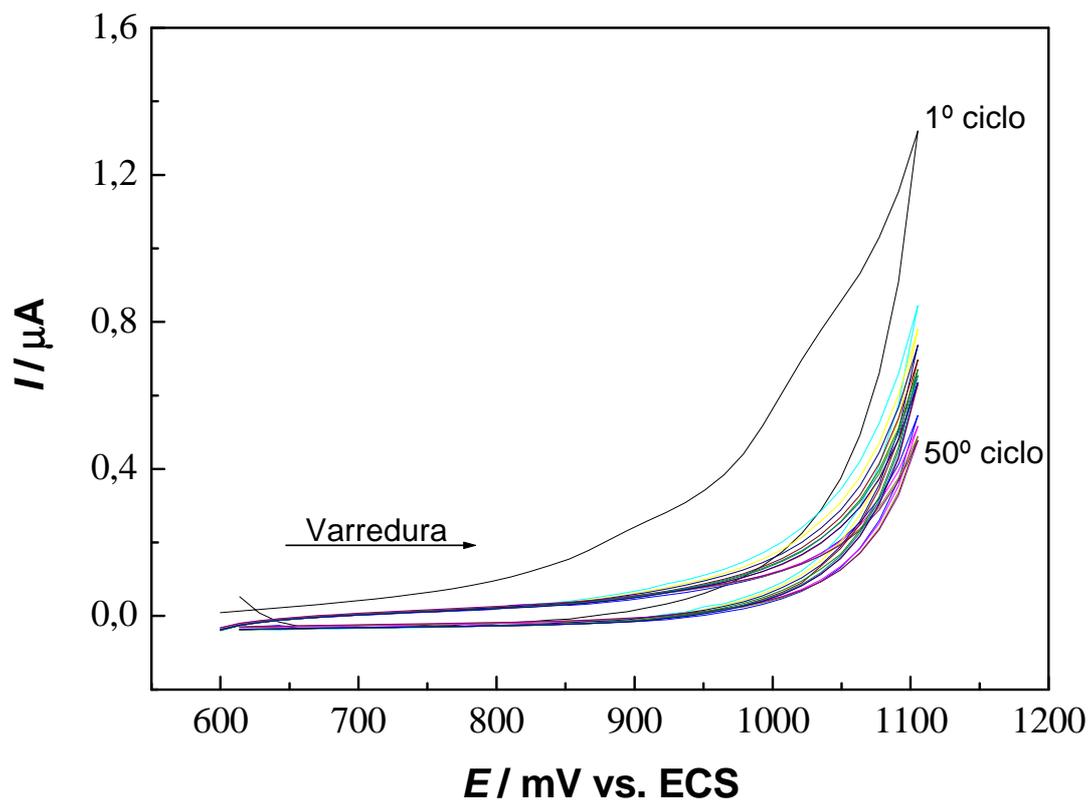


FIGURA 4.49: Avaliação do efeito da adsorção de MX na superfície do GSRE usando CV (50 ciclos voltamétricos) na ausência de MX na célula; em HCl/KCl pH 2,0; janela de +600 a +1100 mV; $\nu = 50 \text{ mV s}^{-1}$.

Na Figura 4.50 são apresentados os 50 ciclos relativos à solução HCl/KCl contendo MX e nela observa-se que os picos são muito semelhantes aos picos da Figura 4.48. Portanto, relacionando tais resultados, pode-se sugerir uma adsorção fraca e reversível. No entanto, para a confirmação de tal efeito, foram realizados experimentos combinando Voltametria Cíclica e Espectroscopia de Impedância Eletroquímica.

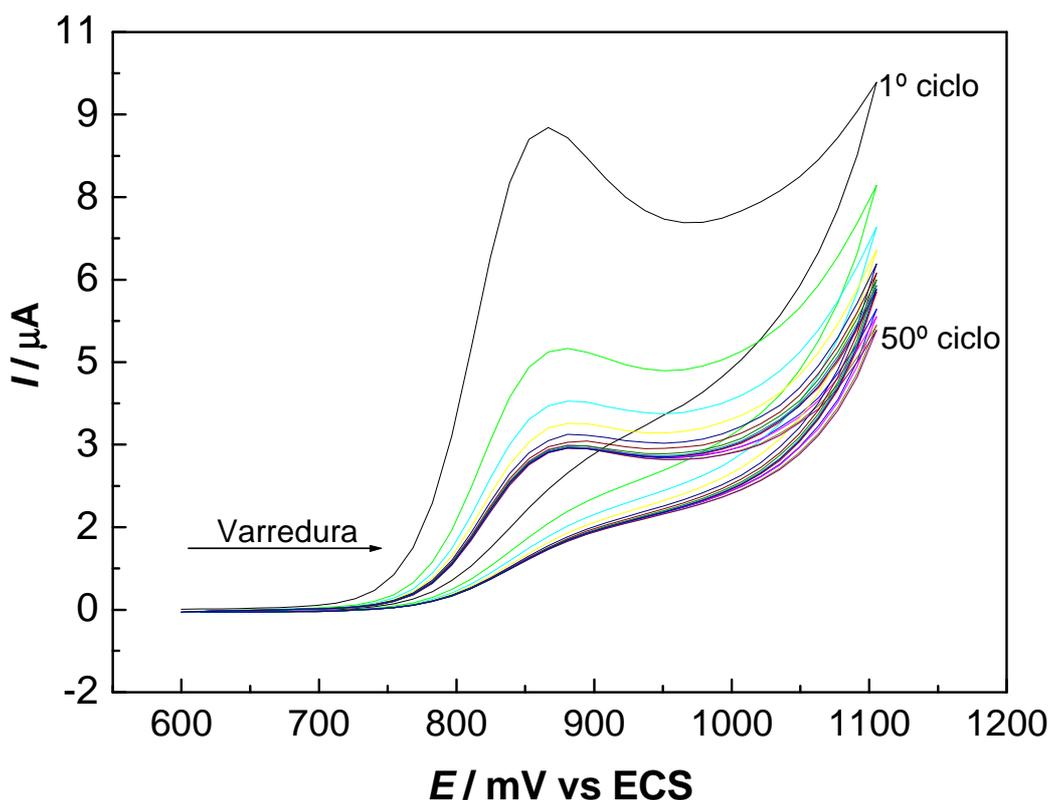


FIGURA 4.50: Avaliação da variação $I_{p,a}$ provocada pela adsorção de MX na superfície do GSRE usando CV (50 ciclos voltamétricos); em HCl/KCl pH 2,0; $E_{p,a} = 860$ mV; intervalo de potenciais +600 a +1100 mV; $\nu = 50$ mV s⁻¹; [MX] = $6,25 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹.

Em seguida à impedância eletroquímica, na mesma célula sem limpeza da superfície ou mudança de configuração dos eletrodos, foram realizados 15 voltamogramas cíclicos usando o intervalo de potenciais +500 a +1000 mV e $\nu = 50$ mV s⁻¹ (Figura 4.51). Após os voltamogramas cíclicos novamente, na mesma célula, foi registrado espectro de impedância eletroquímica.

A Figura 4.51 apresenta os voltamogramas cíclicos da segunda etapa do estudo de adsorção por CV, mostrando queda sucessiva na $I_{p,a}$ entre o 1º e o 15º ciclo, confirmando que há adsorção de MX pela superfície do GSRE, ainda ratificando os resultados obtidos anteriormente (Figuras 48, 49 e 50). Entretanto, ao se comparar o espectro de impedância anterior aos 15 ciclos voltamétricos, com o espectro de impedância posterior aos 15 ciclos

voltamétricos (Figura 4.52), nota-se que não há nenhuma variação significativa entre eles; isto é, há uma adsorção fraca e reversível de MX pela superfície do GSRE provocada pela polarização dos eletrodos.

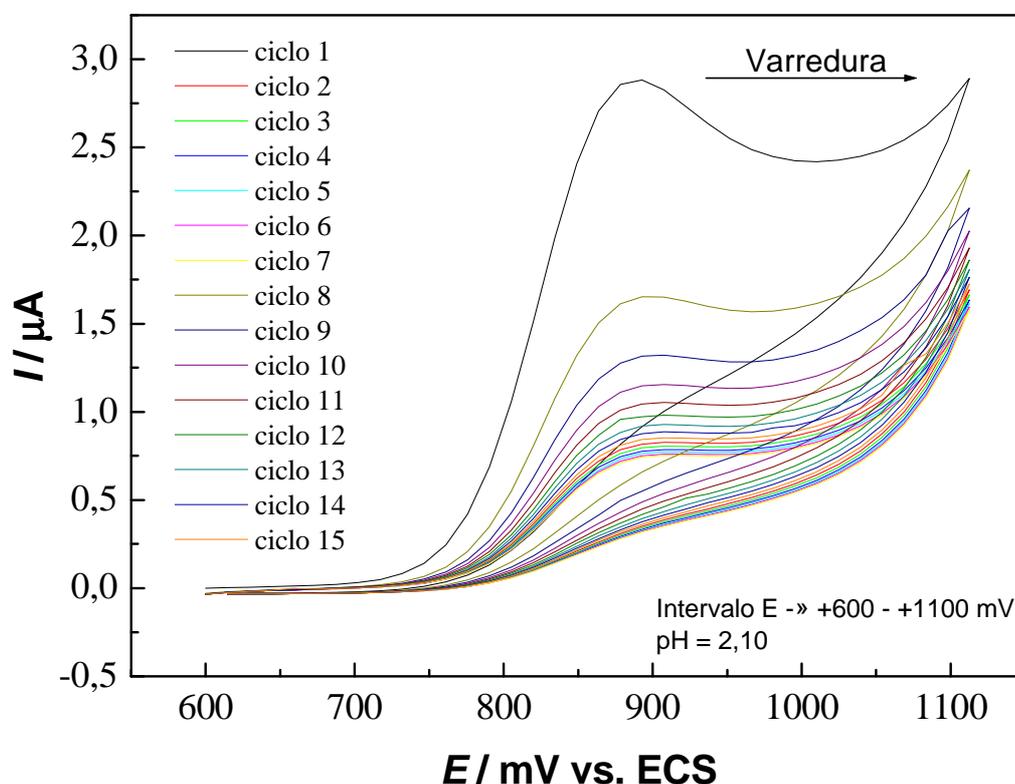


FIGURA 4.51: Avaliação da variação $I_{p,a}$ provocada pela adsorção de MX na superfície do GSRE usando CV (15 ciclos voltamétricos); em HCl/KCl pH 2,0; $E_{p,a} = 860 \text{ mV}$; intervalo de potenciais +600 a +1100 mV; $\nu = 50 \text{ mV s}^{-1}$; $[\text{MX}] = 6,62 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$.

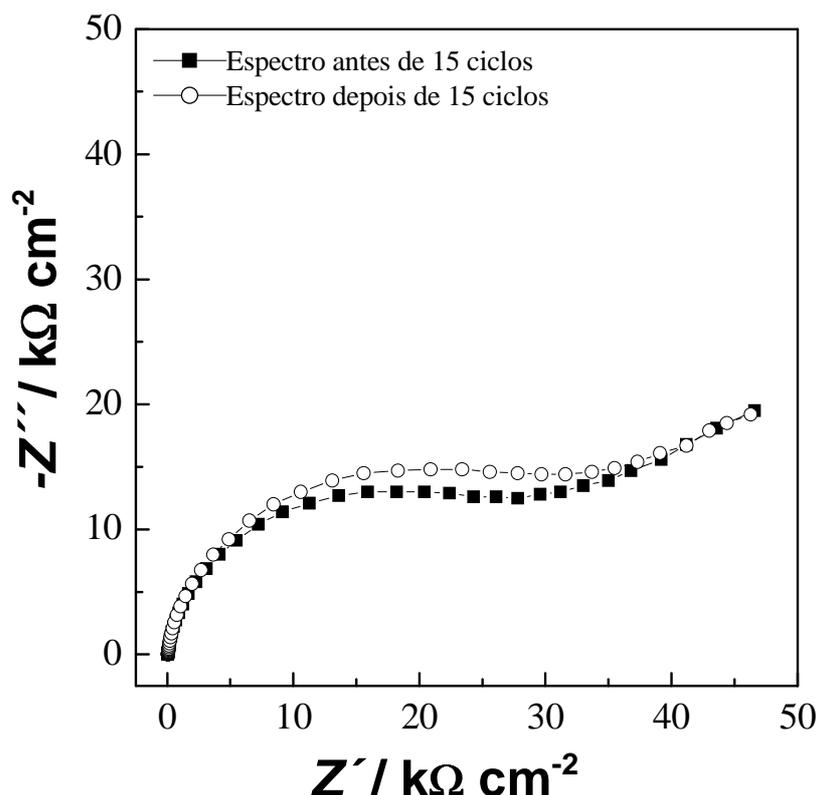


FIGURA 4.52: Estudo do efeito da adsorção de MX pela superfície do GSRE usando impedância eletroquímica antes e depois da avaliação por CV. Condições: $[MX] = 6,62 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$, em KCl/HCl pH 2,10, $E_{p,a} = 860 \text{ mV}$

4.2.6. Conclusões

Os métodos eletroanalíticos propostos utilizando os eletrodos compósitos de grafite-poliuretana (GPUE) e grafite-borracha de silicone (GSRE) se mostraram úteis. Os valores de concentração de MX obtidos pelos métodos propostos foram estatisticamente concordantes com os rótulos de cada medicamento e com os valores obtidos no método comparativo e ainda com os valores de concentração de MX artificialmente adicionados aos eletrólitos de plasma e da urina artificiais. A Tabela 4,37 abaixo apresenta as principais características para a determinação de MX usando os eletrodos GPUE e GSRE.

TABELA 4.37: Comparação de algumas figuras de mérito para os GPUE e GSRE em três técnicas na determinação de MX

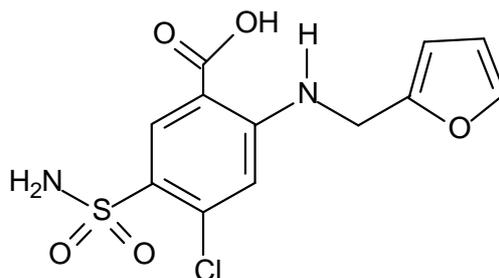
Eletrodos		CV	SWV	DPV
GPUE	Linearidade/ mol L ⁻¹	3,38 x10 ⁻⁵ a 2,89 x10 ⁻⁴	1,33 x10 ⁻⁵ a 1,15 x10 ⁻⁴	1,70 x10 ⁻⁵ a 1,45 x10 ⁻⁴
	Sensibilidade/ A L mol ⁻¹	5,36x10 ³	2,06 x 10 ⁴	1,88x10 ⁴
	LD / mol L ⁻¹	1,49x10 ⁻⁵	7,7x10 ⁻⁶	1,40x10 ⁻⁶
	LQ / mol L ⁻¹	4,95x10 ⁻⁵	2,20x10 ⁻⁵	
GSRE	Linearidade/ mol L ⁻¹	3,39 x10 ⁻⁵ a 2,89 x10 ⁻⁴	1,21x10 ⁻⁵ a 1,14 x10 ⁻⁴	6,64x10 ⁻⁶ a 2,90 x10 ⁻⁵
	Sensibilidade/ A L mol ^{-1b}	4,72x10 ³	1,61x10 ⁴	2,00x10 ⁴
	LD / mol L ^{-1a}	2,23x10 ⁻⁵	2,88 x10 ⁻⁶	3,07x10 ⁻⁶
	LQ / mol L ^{-1a}	3,18x10 ⁻⁵	9,38x10 ⁻⁶	4,64 x10 ⁻⁶

Conclui-se que o desempenho analítico de ambos os eletrodos na determinação de MX são semelhantes, inclusive com no que diz respeito à vida útil de cada um deles que foi na ordem de 250 determinações sem renovação de superfície. Os valores apresentados para as figuras de mérito (linearidade, sensibilidade e LD) são semelhantes para cada técnica voltamétrica usada nas determinações. Portanto, ambos os eletrodos e todas as técnicas voltamétricas foram eficientes para a determinação de MX.

4.3. Determinação de MX e FR em amostras comerciais usando cromatografia de alta eficiência (HPLC)

4.3.1. Considerações sobre a furosemida

A furosemida (FR), 4-cloro-N-furfuril-sulfamylantranílico, é um sólido cristalino, branco e inodoro, insolúvel em água e soluções ácidas diluídas, com baixa solubilidade em solventes orgânicos como álcool e acetona e solúvel em soluções alcalinas. Sua fórmula estrutural é apresentada abaixo (Budavari *et al.*, 2001).



Classificada como um potente diurético, a furosemida, se administrada em excesso, gera excreção excessiva de água e eletrólitos, precisando ser utilizada com supervisão médica, devendo a dosagem ser ajustada de acordo com a necessidade do paciente (Eades e Christensen, 1998; Rang *et al.*, 2001; Vlase *et al.*, 2003).

A furosemida é apresentada comercialmente na forma de comprimidos, contendo de 20 a 80 mg da droga ou soluções injetáveis contendo 10 mg mL⁻¹. O Sistema Único de Saúde (SUS) disponibiliza gratuitamente comprimidos de 40 mg.

A posologia varia entre 20 e 80 mg, para adultos, em dose única pela manhã, podendo ser aumentada até uma dosagem máxima de 600 mg dia⁻¹. Entretanto, para crianças, utiliza-se dose única de 2 mg de furosemida por kg de peso, tendo-se como dosagem máxima 6 mg kg⁻¹ (Souza, 1998).

O Lasix[®], do laboratório Aventis, é o medicamento de referência com ampla utilização como diurético. Com a introdução dos medicamentos genéricos no mercado, houve um aumento no número de fórmulas farmacêuticas, exigindo maior rigor na análise da qualidade do medicamento produzido, com relação aos controles microbiológico, físico-químico ou dos

princípios ativos; portanto, gerou-se a necessidade de metodologias rápidas e confiáveis para aplicação nesses fármacos.

Em tratamentos contínuos de crianças e adultos, observa-se o surgimento de tolerância e resistência ao diurético, o que pode ser superado com a administração da furosemida em associação a outros fármacos como as tiazidas (Riera, 2000; Vlase *et al.*, 2003).

4.3.2. *Justificativa*

A justificativa para a determinação de MX e FR, mesmo não havendo medicamentos comerciais contendo os dois fármacos como princípio ativo, se dá por dois motivos:

- A) O sulfato de minoxidil, o metabólito do MX, causa ativação simpática reflexa, taquicardia e retenção hidrossalina, portanto, deve ser administrado em conjunto com diuréticos e bloqueadores simpáticos e;
- B) Na literatura são encontrados 11 artigos descrevendo a associação de MX e FR usados no controle da *HA*, os quais são apresentados a seguir.

Chrysant *et al.* (1991) avaliaram a adição de betaxolol na combinação de furosemida e MX no controle da *HA* em 30 pacientes.

Seedat e Rawat (1983) aplicaram a combinação de captopril, MX e furosemida em 14 pacientes com *HA* severa, os quais não respondiam a tratamentos convencionais.

Osterziel e Julius (1982) investigaram a ação da combinação de MX e furosemida e a combinação de MX e captopril em pacientes que apresentavam *HA*.

Alpert e Bauer (1982) avaliaram a combinação entre propranolol e furosemida no controle da pressão arterial de 9 pacientes com *HA*. Também avaliaram a resposta desses pacientes frente à administração de doses de MX após terem tomado a combinação propranolol/FR.

Bauer e Alpert (1980) estudaram o efeito da combinação entre propranolol, furosemida e MX em 5 pacientes com *HA* severa.

Tenschert *et al.* (1979) estudaram os efeitos da combinação minoxidil, FR/hidroclorotiazida e propranolol/pindolol em 22 pacientes que apresentavam *HA* e *hipertensão do sistema vascular renal*.

Hammond e Kirkendall (1979) compararam a eficácia do MX no controle da *HA* com a eficácia da combinação entre MX e FR em 14 pacientes com *HA* severa.

Lowenthal *et al.* (1978) usaram MX, propranolol, clonidina e FR combinados no controle da pressão arterial de 26 pacientes que apresentavam *HA* severa e mal funcionamento renal.

Riddiough (1977) investigou as reações adversas provocadas pelo uso contínuo de anti-hipertensivos como diuréticos, vasodilatadores e demais fármacos, combinados ou não.

Dargie *et al.* (1977) estudaram o efeito da combinação de minoxidil, propranolol e furosemida na pressão sanguínea de um grupo de pacientes com *HA*, os quais não respondiam a tratamentos convencionais.

Wilburn *et al.* (1975) trataram 13 pacientes que apresentavam *HA* severa com a combinação de MX, propranolol e FR.

Tais trabalhos mostram um possível interesse no estudo das amostras em que o MX e FR são aplicados em associação no controle da *HA*, não descartando a hipótese de seu uso conjunto na prática do controle da *HA*.

O objetivo principal deste trabalho era a determinação de MX e FR em urina humana, pois parte dos fármacos não são metabolizados sendo excretados pela urina sem modificação. Entretanto, por falta de recursos de biossegurança e motivos éticos as determinações foram realizadas apenas em formulações farmacêuticas.

4.3.3. Espectros de absorção do MX e da FR na região do UV

Inicialmente, obtiveram-se os espectros de absorção do MX e da FR visando usar o detector UV do cromatógrafo na detecção dos analitos em seus λ_{\max} específicos. Para tanto, foram obtidos espectros de soluções distintas de MX e FR, ambas diluídas em metanol/trietilamina (99:1), na concentração de $5,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$. Os espectros são apresentados na Figura 4.53.

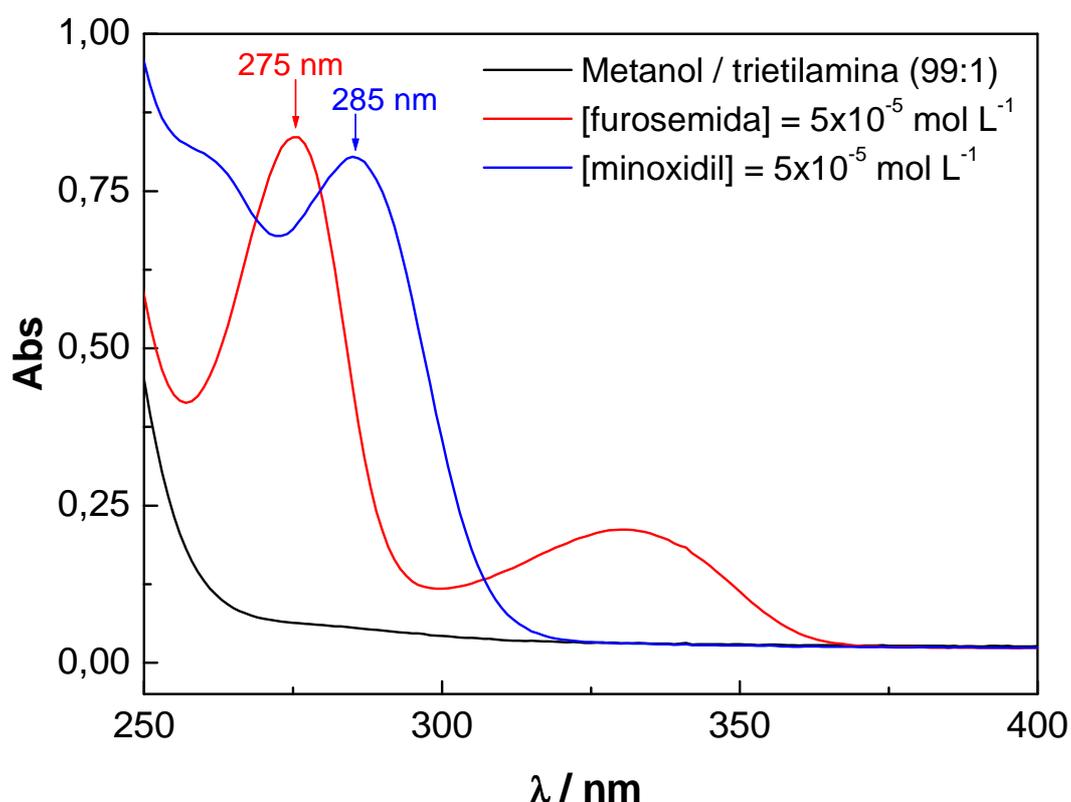


FIGURA 4.53: Espectros de absorção do MX e da FR, ambos diluídos em metanol/trietilamina (99:1 V/V) em concentrações iguais de $5,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$.

Nota-se que a FR apresentou dois máximos de absorção, em 275 e 330 nm, sendo o primeiro o de maior absorbância. O MX apresentou um ombro entre 255 e 272 nm e um pico de absorção em 285 nm.

Os espectros apresentam intersecção em três λ distintos (270, 280 e 307 nm) dos espectros da FR e do MX, sendo que em 280 nm ocorre a intersecção com maior absorbância. Portanto, para os estudos de otimização do sistema cromatográfico, foi usado o λ de 280 nm.

Entretanto, para a quantificação simultânea de MX e FR, foram utilizados dois λ diferentes, 275 nm para a FR e 285 nm para o MX devido à maior absorbância apresentada nos espectros da Figura 4.53. A quantificação dos analitos em dois λ diferentes foi possível já que o detector *SPD-10A VP Shimadzu*, disponibiliza o recurso do monitoramento simultâneo em dois comprimentos de onda.

A Figura 4.54 apresenta os registros cromatográficos simultâneos usando os dois λ distintos para detecção de MX e FR. Fica claro pela Figura 4.54 a diferença de área de pico cromatográfico entre os diferentes λ para o mesmo analito, isso reflete num melhor desempenho analítico como o aumento da sensibilidade e melhores limites de detecção e quantificação do MX e da FR.

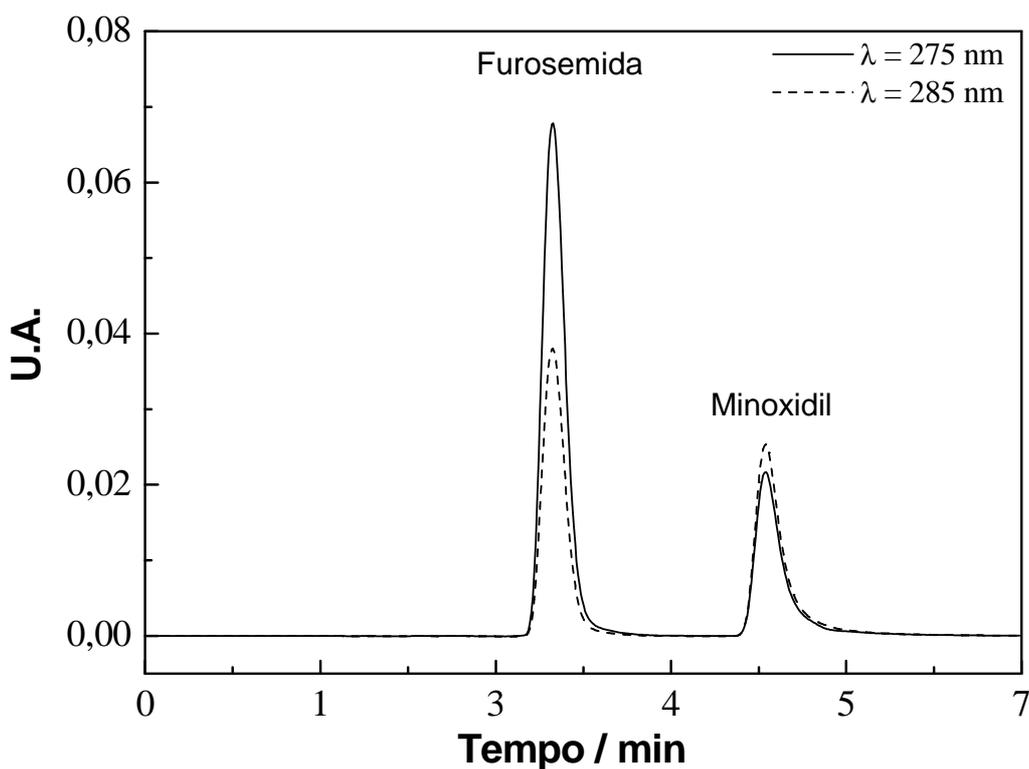
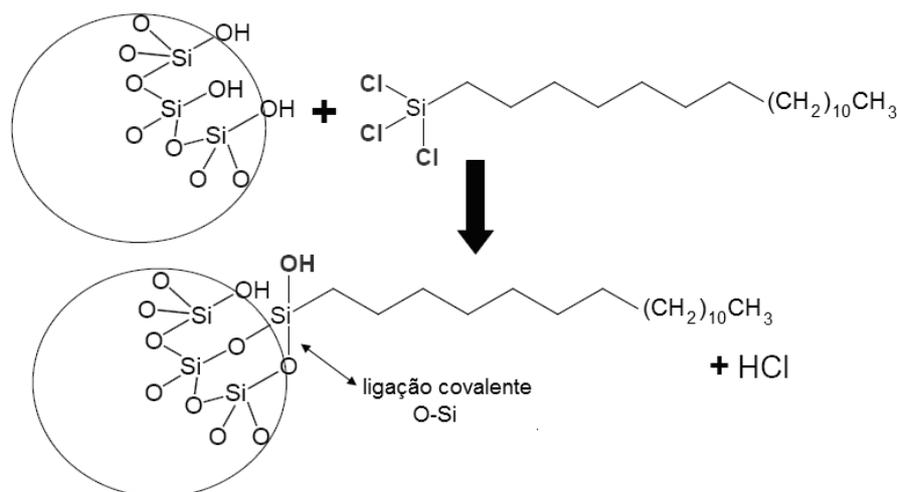


FIGURA 4.54: Cromatogramas obtidos na determinação simultânea de MX e furosemida nos comprimentos de onda 275 e 285 nm.

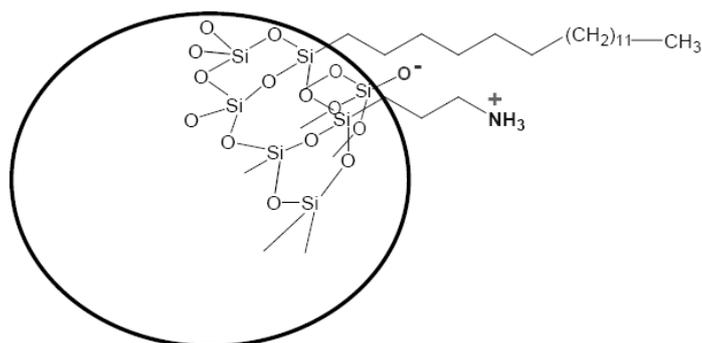
4.3.4. Estudo do efeito da adição de trietilamina a fase móvel

A coluna usada nas determinações de MX e FR foi uma coluna C-18 Supelco[®], como descrito anteriormente. Esta coluna consiste em um suporte de sílica ligado covalentemente a uma molécula de $\text{Cl}_3\text{Si-C}_{18}$, ou similar, empacotada em um tubo de aço inox. A reação entre a sílica e o $\text{Cl}_3\text{Si-C}_{18}$ pode ser representada por:



Os grupos hidroxila da sílica suporte não ligados ao $\text{Cl}_3\text{Si-C}_{18}$ são grupos com caráter ácido, portanto, esses grupos interagem fortemente com grupos amina, de caráter básico. Este efeito foi observado nas análises do MX, o qual contém em sua estrutura duas aminas primárias, havendo afinidade entre a fase estacionária e o MX, o que causa aumento no tempo de retenção do analito e, ainda, formação de uma cauda residual no pico cromatográfico. O mesmo efeito ocorre com a FR, que também contém grupos amina em sua estrutura (Pombeiro; 1998, Skoog *et al.*, 2002; Waters).

Para minimizar o efeito ácido-base provocado pelos grupos ácidos da fase estacionária, adicionou-se 1% (V/V) de trietilamina na fase móvel. Com isso, os sítios com caráter ácido da fase estacionária foram saturados com grupamentos de caráter básico da trietilamina, como apresentado no esquema abaixo (Pombeiro; 1998, Skoog *et al.*, 2002; Waters), prevenindo sua interação com os analitos.



O efeito da presença de trietilamina na fase móvel é apresentado na Figura 4.55, a qual representa os cromatogramas na presença e na ausência da trietilamina.

Nota-se claramente que a amina causa um aumento significativo do sinal, com conseqüente redução da largura dos picos e diminuição na eluição de ambos os analitos. Portanto, nesse trabalho, a fase móvel usada foi uma mistura de metanol e trietilamina, 99:1 V/V.

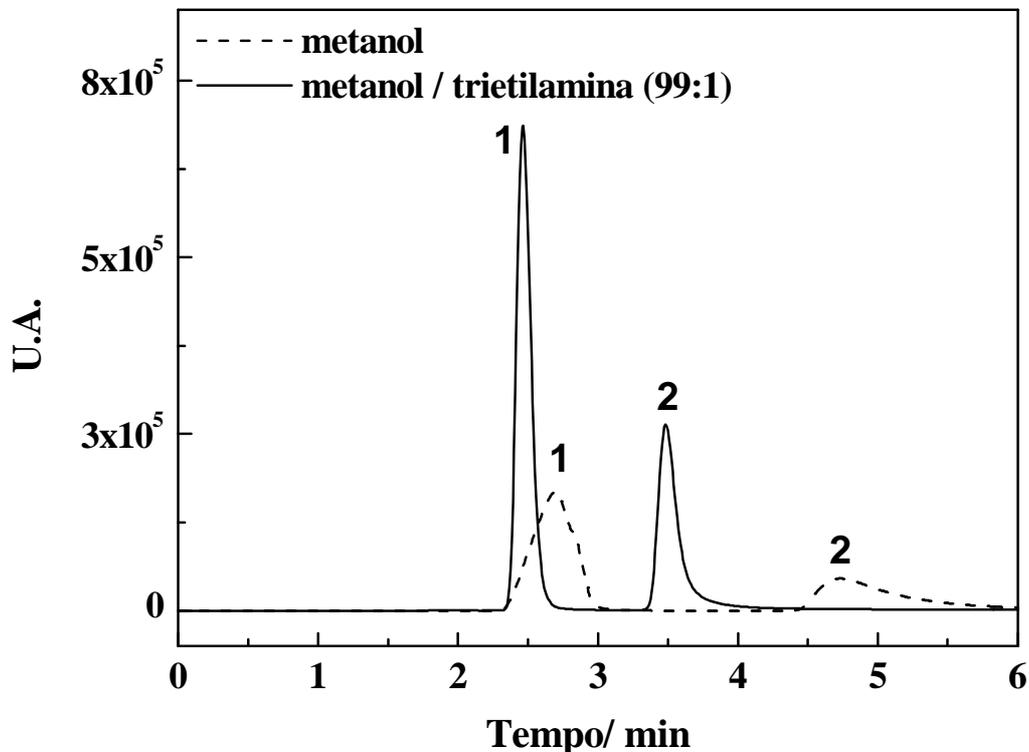


FIGURA 4.55: Estudo do efeito da adição de 1% de trietilamina na fase móvel na resolução dos picos cromatográficos. Pico 1 – FR; Pico 2 – MX.

4.3.5. Estudo do efeito da vazão da fase móvel nos picos cromatográficos do MX e da furosemida

Estudou-se o efeito da vazão da fase móvel na definição dos picos cromatográficos do MX e FR. Os resultados são apresentados na Figura 4.56. Considerando o estudo do efeito da vazão, foram avaliadas a resolução (R_s) e a seletividade (α) para a determinação simultânea dos dois fármacos (Figura 4.57).

A resolução é uma medida da eficiência da separação cromatográfica de duas substâncias e pode ser calculada para picos com o mínimo de separação entre eles sem sobreposição. A separação completa dos picos exige, porém, em geral, uma resolução mínima de 1,5. A Equação 32 apresenta como é efetuado o cálculo da resolução, sendo s a distância entre os máximos dos picos das substâncias 1 e 2 e $4\sigma_1$ e $4\sigma_2$ são as larguras na base dos picos correspondentes (Pombeiro; 1998).

$$R_s = s / [(4\sigma_1 + 4\sigma_2) / 2]$$

Equação 32

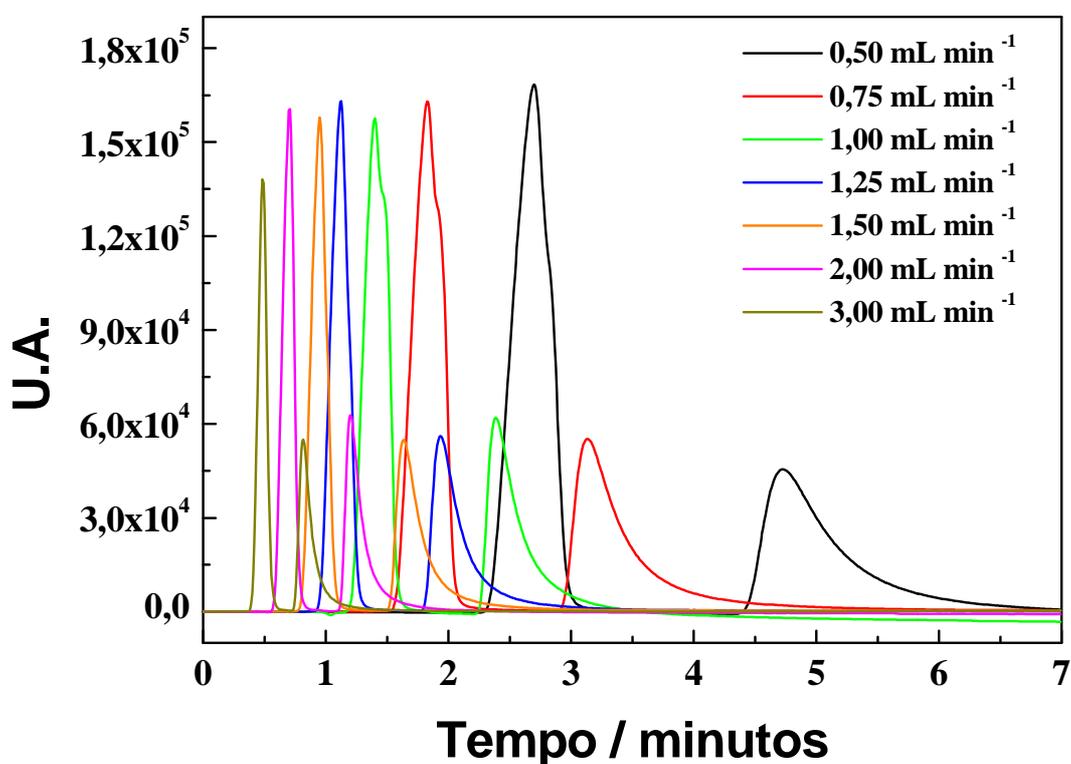


FIGURA 4.56: Efeito da vazão na determinação simultânea de MX e FR.

A seletividade (α) é outro parâmetro para medir a eficiência de separação entre os picos das substâncias 1 e 2, é desejável que tenha um valor de pelo menos 1,2. A seletividade é calculada através das Equações 33 e 34; nas quais tr_2 é tempo de retenção da substância 2; k'_2 é a razão de capacidade da substância 2 (razão entre os números de mols do soluto na fase estacionária e na fase móvel); L é o comprimento da coluna cromatográfica e u é a velocidade do eluente.

$$R_s = (tr_2/4\sigma_2) \cdot [(\alpha - 1/\alpha) \cdot (k'_2/1 + k'_2)] \quad \text{Equação 33}$$

$$tr = (L/u) \cdot (1 + k') \quad \text{Equação 34}$$

Os resultados obtidos no estudo do efeito da vazão aplicados nas Equações 33 e 34 geraram o conjunto de pontos apresentados na Figura 4.57.

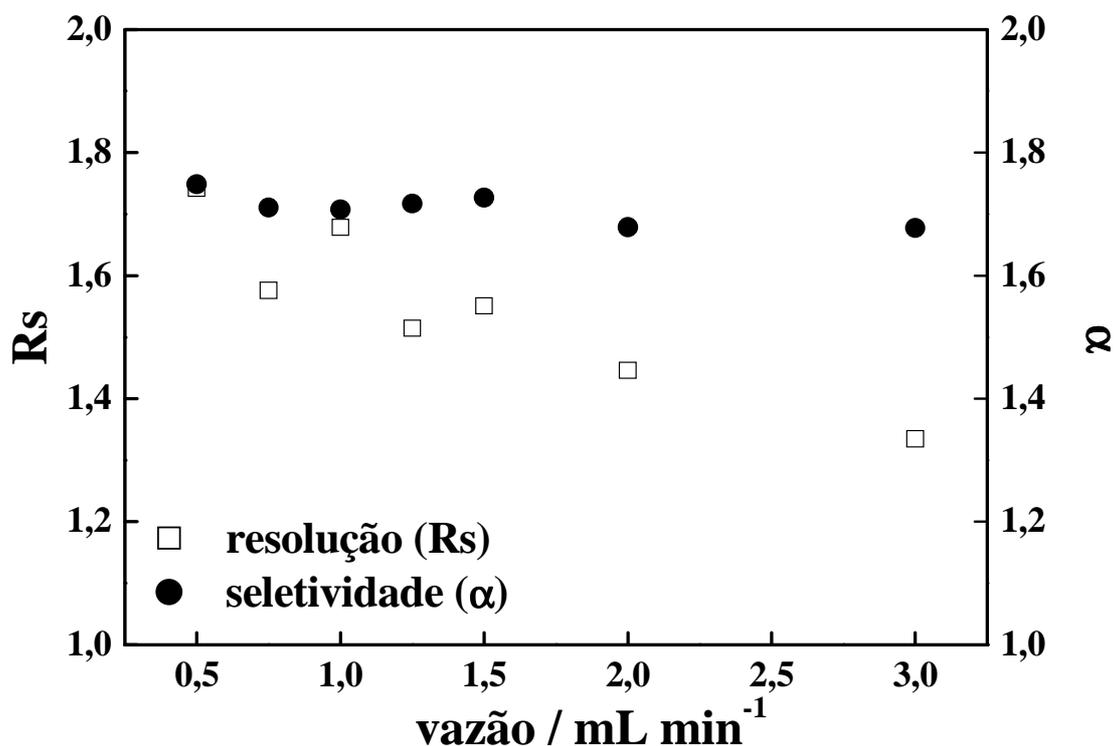


FIGURA 4.57: Avaliação da resolução e da seletividade em função do estudo do efeito da vazão de fase móvel.

Seguindo os valores mínimos de RS e α , 1,5 e 1,2 respectivamente, para uma alta eficiência na separação dos analitos MX e FR, nota-se que todas as vazões estudadas levam a valores superiores a 1,2 para α , entretanto, o intervalo de vazões entre 0,5 e 1,5 mL min⁻¹ apresentam valores iguais ou maiores que 1,5.

Portanto, selecionou-se o valor de vazão que apresentasse maior Rs e α , que neste caso foi de 0,5 mL min⁻¹. Outro fator de grande importância na escolha da melhor vazão é o tempo de retenção dos analitos, que deve ser superior a 1,5 minutos, pois tempos de retenção menores que 1,5 minutos são definidos como tempo morto da coluna, ou seja, representam a não interação dos analitos com a fase estacionária, isso se deve à afinidade química ou à alta vazão do sistema (Pombeiro; 1998).

4.3.6. Curva analítica e análise das amostras

Definidos os parâmetros cromatográficos para a determinação de MX e FR, foi construída uma curva analítica (Figura 4.58).

Os registros cromatográficos foram realizados nos λ_{\max} de cada composto, 275 para a FR e 285 para o MX (Figura 4.53).

A Figura 4.58 apresenta as curvas analíticas da área dos picos em função da concentração de MX e FR.

O intervalo de concentração para ambos os analitos foi entre $1,00 \times 10^{-7}$ a $1,00 \times 10^{-3}$ mol L⁻¹ (n = 6). Nesse intervalo, obtiveram-se coeficientes de correlação 0,9995 e 0,9996 para o MX e a FR, respectivamente. As equações de reta obtidas para cada fármaco são:

$$\text{MX: } \text{área} = 5,85 \times 10^8 \cdot [\text{minoxidil}] + 3,64 \times 10^3 \quad (R = 0,9995) \quad \text{Equação 35}$$

$$\text{FR: } \text{área} = 1,10 \times 10^9 \cdot [\text{furosemida}] + 6,91 \times 10^3 \quad (R = 0,9996) \quad \text{Equação 36}$$

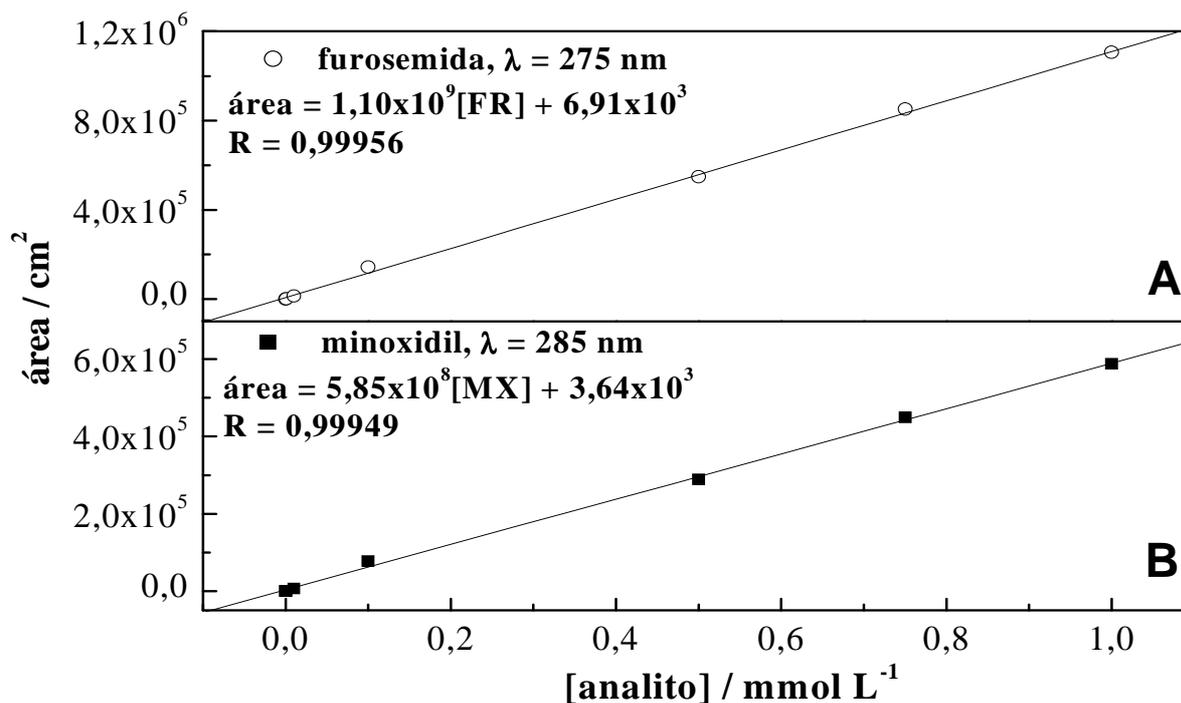


FIGURA 4.58: Curvas analíticas para a determinação simultânea de MX (B) e FR (A).

Foram avaliados os teores de furosemida contidos nas amostras comerciais analisadas neste trabalho para efeito de comparação. Tais amostras foram submetidas a um método espectrofotométrico de calibração por ponto único, o qual emprega NaOH como solução extratora, sendo as medidas realizadas em 271 nm. Conforme preconiza a Farmacopéia Americana (USP). Atualmente, tal farmacopéia recomenda o uso de cromatografia, porém, em função da disponibilidade de instrumentação, simplicidade e precisão da técnica, optou-se por empregar UV (USP, 1985).

A Tabela 4.38 apresenta os teores de furosemida individual obtidos pelo método comparativo nas amostras comerciais e erro relativo ao rotulado.

TABELA 4.38: Valores de concentração de furosemida encontrados pelo método comparativo

Amostra	Rótulo^a	Método comparativo^a	Erro / %
<i>Furosem</i> [®]	40	39,2±0,1	-2,00
<i>Neosemid</i> [®]	40	41,8±0,6	+4,50
<i>Pharlab</i> [®]	40	39,5±0,3	-1,25
<i>Teuto</i> [®]	40	41,7±0,2	+4,25

a: mg comprimido⁻¹

A Tabela 4.39 apresenta os resultados obtidos nas análises das amostras comerciais para determinação de MX e FR individualmente, enquanto a Tabela 4.40 apresenta a determinação dos analitos simultaneamente nas amostras comerciais.

TABELA 4.39: Resultados das análises individuais de MX e FR nas amostras comerciais

Amostras	Analito	Rótulo	Método proposto		Erros/%	
			<i>MX</i>	<i>FR</i>	<i>E₁</i>	<i>E₂</i>
<i>Furosem</i> [®]	FR	40 ^a	-	35,9	-10,0	-8,2
<i>Neosemid</i> [®]	FR	40 ^a	-	42,4	6,0	1,4
<i>Pharlab</i> [®]	FR	40 ^a	-	39,2	-2,0	-0,8
<i>Teuto</i> [®]	FR	40 ^a	-	39,7	-0,6	-4,6
<i>Loniten</i> [®]	MX	10 ^b	9,6	-	-4,0	-4,9
<i>Regaine</i> [®]	MX	20 ^b	20,08	-	0,4	-4,8

a – mg por comprimido, b – mg por mL de solução, n = 3; *E₁* erro relativo ao rótulo e *E₂* erro relativo ao método comparativo.

TABELA 4.40: Resultados das análises simultâneas de MX e FR contidos nas amostras comerciais

Amostras	Analito^a		Método proposto		Erros/%	
	<i>FR</i>	<i>MX</i>	<i>FR</i>	<i>MX</i>	<i>E_{FR}</i>	<i>E_{MX}</i>
<i>Furosem</i> [®] + <i>Loniten</i> [®]	40	10	36,4	9,7	-9,0	-3,0
<i>Neosemid</i> [®] + <i>Loniten</i> [®]	40	10	42,3	9,6	5,7	-4,0
<i>Pharlab</i> [®] + <i>Loniten</i> [®]	40	10	39,3	9,6	-1,8	-4,0
<i>Teuto</i> [®] + <i>Loniten</i> [®]	40	10	39,7	9,7	-0,75	-3,0

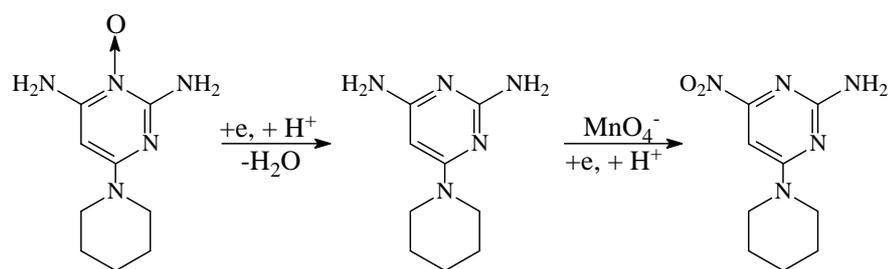
a – mg por comprimido, n = 3; *E_{FR}* erro relativo ao rótulo das amostras contendo FR e *E_{MX}* erro relativo ao rótulo das amostras contendo MX.

4.3.7. Conclusões

Os resultados obtidos pelo procedimento proposto e pelo método comparativo, tendo se mostrado estatisticamente compatíveis, no intervalo de confiança de 95% (teste t-Student).

4.4. Caracterização da estrutura do produto de oxidação química do minoxidil

Sousa e colaboradores (2005) propuseram um método titulométrico com detecção espectrofotométrica para determinação de MX em amostras farmacêuticas. O método se baseia na reação redox entre o MX e o KMnO_4 em meio ácido, medindo o decréscimo de absorvância provocado pela descoloração da solução de KMnO_4 , devido à formação de Mn^{2+} , que é incolor em solução aquosa. Os autores sugeriram que a reação entre o MX e o KMnO_4 ocorre em duas etapas, como apresentado na Equação 37 (não balanceada) e, ainda, propuseram uma estrutura para o produto de oxidação.



Equação 37

Para a elucidação da fórmula do produto de oxidação, contou-se com a contribuição do Prof. Dr. Antônio Gilberto Ferreira, DQ-UFSCar .

Inicialmente, promoveu-se a oxidação do MX com o KMnO_4 e o produto da reação foi isolado. Para tanto, inicialmente o meio reacional foi neutralizado com $\text{NaOH}_{(\text{aq})}$ a $1,0 \text{ mol L}^{-1}$. Durante a neutralização formou-se uma substância de coloração amarelada, a qual foi atribuída à desprotonação do produto de oxidação do MX.

Após a neutralização do meio reacional ($\text{pH} = 7,0$), adicionou-se clorofórmio para a extração do produto de oxidação. A fase orgânica tornou-se amarelada devido à presença do produto de oxidação do MX. Em seguida, separou-se a fase orgânica, contendo o produto de oxidação, com o auxílio de um funil de separação e evaporou-se o clorofórmio até securo em um evaporador rotatório a 50°C , sob pressão reduzida.

Após a evaporação, o produto de oxidação do MX foi obtido na forma sólida, o qual se apresentou como uma substância de coloração

amarelada, solúvel em água, ácidos e alcoóis, apesar de maior solubilidade em clorofórmio.

Foram, a seguir, obtidos e comparados os espectros do produto de partida (MX) e do produto de oxidação na região do infravermelho, os quais são apresentados na Figura 4.59.

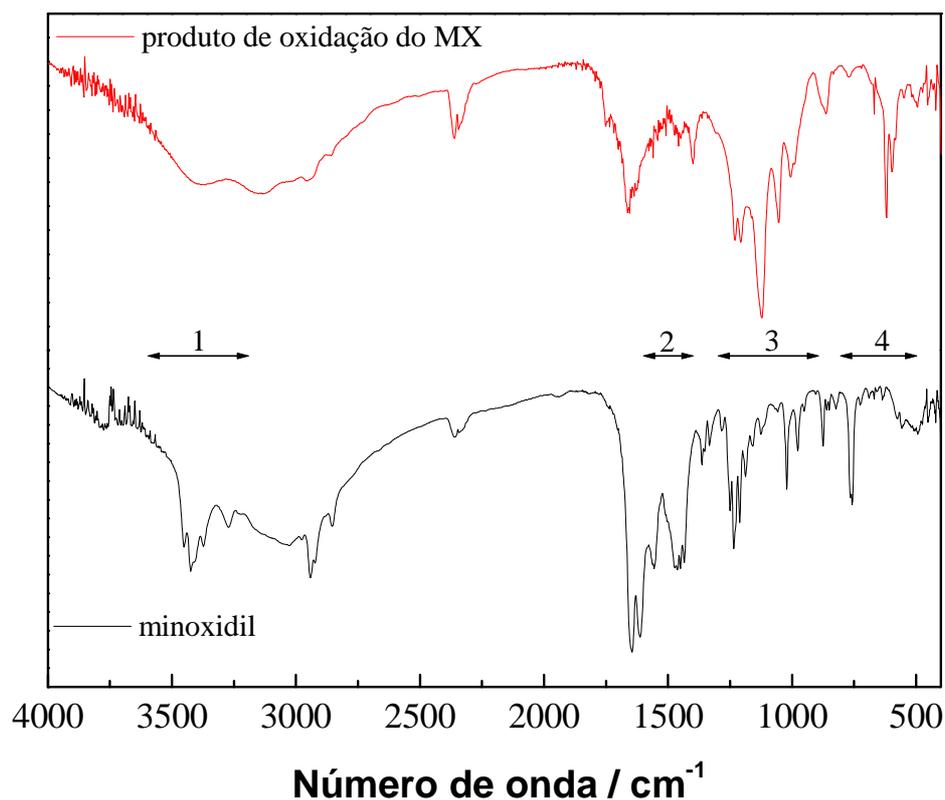


FIGURA 4.59: Espectros de infravermelho do MX e do seu produto de oxidação.

Comparando-se os espectros do MX e do produto de oxidação de MX apresentados na Figura 4.59 notaram-se mudanças significativas em posições de picos em quatro regiões nos espectros: 1 – 3600 a 3200 cm⁻¹; 2 – 1600 a 1400 cm⁻¹; 3 – 1300 a 900 cm⁻¹ e 4 – 800 a 500 cm⁻¹.

De acordo com os espectros, pode-se deduzir que reação redox ocorreu na(s) amina(s) primária(s) ligada(s) ao grupo piperidino. Outra evidência são as bandas de baixa frequência (800 a 500 cm⁻¹, 4^a região) presentes no espectro do produto de oxidação, as quais sugerem a interação de

grupos $-\text{NO}_2$ com o grupo piperidino (Silverstein *et al.*, p.106). Entretanto, esses dados não são suficientes para concluir sobre a estrutura do produto.

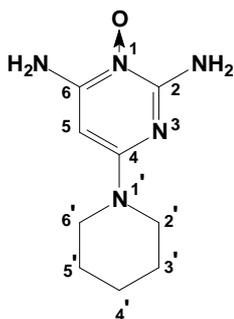
A Tabela 4.41 apresenta algumas atribuições para as bandas presentes no espectro IV do MX, relativas às amins primárias, pois os picos relativos a elas então localizados nas regiões com maiores mudanças em relação ao espectro do produto de oxidação (Chao; Thamann; Vail, 1988).

TABELA 4.41: Atribuições dos picos situados nas regiões A,B,C e D do espectro do MX

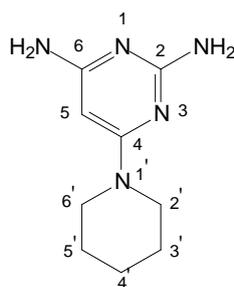
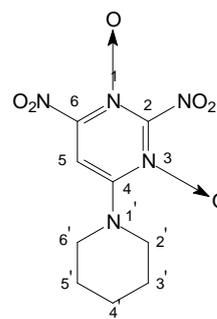
<i>Número de onda / cm^{-1}</i>	<i>Atribuições</i>
3451	NH – estiramento simétrico livre
3407	NH – estiramento assimétrico livre
3368	NH – Estiramento associado
3271	NH – estiramento associado
1643	NH_2 tesoura
1610	NH_2 tesoura/estiramento do anel PIR*
1352	C-N estiramento anel PIR*
1332	C-N estiramento anel PIR*
1283	C- NH_2 estiramento(PIR*/CH angular PIP**)
1250	C-N estiramento (PIR*/PIP**)
1234	CH angular (PIR*)/ estiramento C-N PIP**
1186	Estiramento C-N PIP**
976	Estiramento do anel PIR*/C-NH angular
950	Torção NH_2
874	C-N angular (PIR*/PIP**)
756	NH_2 vibracional

*PIR: grupo piridímico; **PIP: grupo piperidímico

Os resultados obtidos por RMN também confirmaram a mudança da estrutura do MX. É importante enfatizar que no espectro de RMN de ^{13}C do produto de oxidação e nas respectivas expansões, observaram-se claramente os deslocamentos químicos para os três conjuntos de sinais correspondendo aos três compostos: material de partida, composto 1 e composto 2.



Material de partida - MX

Composto 1
desoximinoxidilComposto 2
3,5-dióxido-2,4-dinitro-6-
piperidinopirimidina

Essas misturas não foram observadas nos espectros do material de partida.

A Tabela 4.42 apresenta os deslocamentos químicos δ (ppm) de ^1H , ^{13}C e ^{15}N para material de partida (MX), composto 1 e composto 2, todos dissolvidos em DMSO-d₆.

TABELA 4.42: Deslocamento químico δ (ppm) de ^1H , ^{13}C e ^{15}N para os compostos: material de partida (MX), 1 e 2 em DMSO-d₆

n°	Material de partida			Composto 1			Composto 2		
	^1H	^{13}C	$^{15}\text{N}^*$	^1H	^{13}C	$^{15}\text{N}^*$	^1H	^{13}C	$^{15}\text{N}^*$
1	----	----	196,1	----	----	190,0	----	----	190,0
2	6,81 sl	151,8	70,0	5,38 sl	162,5	76,6	----	150,0	76,6
3	----	----	183,1	----	----	n.o.	----	----	n.o.
4	----	154,4	----	----	163,4	----	----	152,0	----
5	5,36 s	73,1	----	5,04 s	73,6	----	5,59 sl	107,0	----
6	6,81 sl	153,1	70,0	5,38 sl	164,9	76,6	----	151,4	76,6
1'	----	----	85,2	----	----	85,8	----	----	85,8
2', 6'	3,40-3,35m	44,8	----	3,40-3,35m	44,5	----	3,40-3,35m	48,6	----
3', 5'	1,52-1,41m	24,8	----	1,52-1,40m	25,4	----	1,52-1,40m	24,4	----
4'	1,52-1,41m	24,0	----	1,52-1,40m	25,0	----	1,52-1,40m	23,5	----

* informações obtidas do experimento de ^1H - ^{15}N gHMBC

n.o. – não observado, s – singlete, sl – singlete largo, m – multipeto

A Tabela 4.42 apresenta dados referentes ao material de partida, onde foram observados os principais deslocamentos químicos tanto de hidrogênio e do carbono 13, como do nitrogênio 15, devido à sua solubilidade e à sua pureza.

A Tabela 4.43 apresenta os deslocamentos químicos δ (ppm) de ^1H e ^{13}C para o material de partida (MX), o composto 1 e o composto 2 dissolvidos em DMSO-d6.

TABELA 4.43: Deslocamento químico δ (ppm) de ^1H , e ^{13}C para os compostos: material de partida, 1 e 2 em DMSO-d6

Nº	Material de Partida (MX)			Composto 1			Composto 2		
	^1H	^{13}C	HMBC*	^1H	^{13}C	HMBC*	^1H	^{13}C	HMBC
1	----	----	----	----	----	----	----	----	----
2	6,81sl	151,8	73,1	5,38sl	162,5	n.o.	----	150,0	n.o.
3	----	----	----	----	----	----	----	----	----
4	----	154,4	----	----	163,4	----	----	152,0	----
						73,6			
5	5,36 s	73,1	73,1 153,1	5,04 s	73,6	162,5	5,59sl	107,0	----
						163,4			
6	6,81sl	153,1	73,1	5,38sl	164,9	n.o.	----	151,4	n.o.
1'	----	----	----	----	----	----	----	----	----
			163,4;154,4			163,4;154,4			163,4;154,4
			152,0;			152,0;44,5;			152,0;44,5;
2', 6'	3,40- 3,35m	44,8	44,5; 44,8; 48,6; 23,5; 24,0; 24,4; 24,8; 25,0; 25,4;	3,40- 3,35m	44,5	44,8; 48,6; 23,5; 24,0; 24,4; 24,8; 25,0; 25,4;	3,40- 3,35m	48,6	44,8; 48,6; 23,5; 24,0; 24,4; 24,8; 25,0; 25,4;
3',5'	1,52- 1,41m	24,8	23,5; 24,0; 24,4; 24,8; 25,0; 25,4; 44,5; 44,8, 48,6	1,52- 1,40m	25,4	23,5; 24,0; 24,4; 24,8; 25,0; 25,4; 44,5; 44,8, 48,6	1,52- 1,40m	24,4	23,5; 24,0; 24,4; 24,8; 25,0; 25,4; 44,5; 44,8, 48,6
4'	1,52- 1,41m	24,0	23,5; 24,0; 24,4; 24,8; 25,0; 25,4; 44,5; 44,8, 48,6	1,52- 1,40m	25,0	23,5; 24,0; 24,4; 24,8; 25,0; 25,4; 44,5; 44,8, 48,6	1,52- 1,40m	23,5	23,5; 24,0; 24,4; 24,8; 25,0; 25,4; 44,5; 44,8, 48,6

n.o. – não observado, s – singlete, sl – singlete largo, m – multiplete

*software fornecido pela *VARIAN*

Os resultados de Tabela 4.43 mostram que o composto 1 apresenta hidrogênios amínicos pelos deslocamentos químicos tanto dos hidrogênios quanto do carbono 13; indicando a estrutura acima para o composto 1.

A Tabela 4.44 apresenta os deslocamentos químicos δ (ppm) de ^1H , e ^{15}N para o material de partida (MX) e os compostos 1 e 2 em DMSO-d₆.

TABELA 4.44: Deslocamento químico δ (ppm) de ^1H , e ^{15}N para os compostos: material de partida, 1 e 2 em DMSO-d₆

nº	Material de Partida (MX)			Composto 1			Composto 2		
	^1H	^{15}N	$^1\text{H}-^{15}\text{N}$ gHMBC*	^1H	^{15}N	$^1\text{H}-^{15}\text{N}$ gHMBC*	^1H	^{15}N	$^1\text{H}-^{15}\text{N}$ gHMBC*
1	-----	196,1	-----	-----	190,0	-----	-----	190,0	-----
2	6,81 sl	70,0	70,0; 183,1 e 196,1	5,38 sl	77,2	77,2 e 190,0	-----	n.o.	n.o.
3	-----	183,1	-----	-----	n.o.	-----	-----	n.o.	-----
4	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
5	5,36 s	-----	196,1	5,04 s	-----	-----	5,59 sl	75,5	75,5 e 190,0
6	6,81 sl	70,0	70,0; 183,1 e 196,1	5,38 sl	77,2	77,2 e 190,0	-----	-----	-----
1'	-----	85,2	-----	-----	85,8	-----	-----	85,8	-----
2',	3,40-	-----	85,2 e	3,40-	-----	85,2 e	3,40-	-----	85,2 e
6'	3,35m	-----	85,8	3,35m	-----	85,8	3,35m	-----	85,8
3',5'	1,52- 1,41m	-----	-----	1,52- 1,40m	-----	-----	1,52- 1,40m	-----	-----
4'	1,52- 1,41m	-----	-----	1,52- 1,40m	-----	-----	1,52- 1,40m	-----	-----

n.o. – não observado, s – singlete, sl – singlete largo, m – multipletto

*software fornecido pela *VARIAN*

Na Tabela 4.44, os dados mostram que o composto 2 não apresenta nenhum hidrogênio amínico e, por outro lado, apresenta um sinal no espectro de RMN de ^{13}C em δ 107,0 ppm para o carbono 5, bastante deslocado e desprotegido quando comparado com os demais, o que permite atribuir a estrutura acima para o composto 2.

Os resultados obtidos por RMN são concordantes com aqueles obtidos pela espectroscopia de infravermelho. Em especial, o RMN confirma a

mudança nas duas aminas primárias do MX, aparente no espectro de infravermelho na região espectral entre 3600 a 3200 cm^{-1} (bandas atribuídas às aminas primárias).

Portanto, pode-se concluir que a reação do MX com KMnO_4 em meio ácido ocorre em duas etapas. A primeira etapa é formação do desoximinoxidil provocada pela protonação do O ligado por uma coordenada ao N do anel piperidínico. A segunda etapa é a formação do composto 2, que é o resultado da oxidação química das duas aminas primárias ligadas ao anel piperino do MX, formando o 3,5-dióxido-2,4-dinitro-6-piperidinopirimidina.

***5. Considerações finais e perspectivas
de trabalhos futuros***

Os resultados obtidos sugerem que os métodos propostos neste trabalho foram eficazes na determinação de minoxidil em amostras comerciais e em eletrólitos de plasma e urina artificiais, considerando-se os limites, erros e limitações inerentes a cada técnica.

O procedimento em fluxo com configuração de linha única e detecção na região do visível se mostrou um procedimento simples, podendo utilizar um fotômetro como detector. Este procedimento pode ter aplicações didáticas ou em controle de qualidade em farmácias de manipulação.

A aplicação de dois eletrodos compósitos sólidos (GPUE e GSRE) nos estudos eletroanalíticos do minoxidil, evidenciaram o mecanismo da eletro-oxidação envolvendo 1 elétron por próton. A determinação de minoxidil neste tipo de amostras foi simples, sem a necessidade de pré-tratamento.

A determinação de minoxidil e furosemida em amostras comerciais, usando HPLC, mostrou que tanto a determinação individual, quanto a determinação simultânea dos analitos é possível.

A caracterização do produto de oxidação química do minoxidil sugeriu que a oxidação ocorre em duas etapas formando desoximinoxidil e o 3,5-dióxido-2,4-dinitro-6-piperidinopirimidina.

Perspectivas de trabalhos futuros

A determinação eletroanalítica de MX usando MIPs em amostras comerciais e em fluídos biológicos tais como urina e plasma sanguíneo,

Estudos termoanalíticos do MX e do produto de oxidação, visando caracterizá-los do ponto de vista térmico.

- ADAMS, R. N. Carbon paste electrodes. **Analytical Chemistry**, v. 30, p. 1576, 1958.
- ALPERT, M. A.; BAUER, J. H. Rapid control of severe hypertension with minoxidil. **Archives of internal medicine**, v. 142, n. 12, p. 2099, 1982.
- AMANKWA, L. et al. Electrochemical studies on minoxidil and determination in tablets by differential-pulse polarography. **Analyst**, v. 108, p. 1221, 1983.
- ANDERSON, P.O., KNOBEN, J.E., TROUTMAN, W.G. **Handbook of clinical drug data**. 10. ed. São Francisco: McGraw-Hill Companies, 2002, 1148 p.
- APPEL, L. J. The role of diet in the prevention and treatment of hypertension. **Current Atherosclerosis Reports**, v. 2, n. 6, p. 521, 2000.
- ARCOS, J. et al. Spectrophotometric and electroanalytical study of minoxidil. **Analytical Letters**, v. 24, p. 357, 1991.
- ASMUS, P. A. et al. Determination of minoxidil in bulk drug and pharmaceutical formulations by ion-pairing high-performance liquid-chromatography. **Pharmaceutical Science**, v. 73, p. 1290, 1984.
- ATTARAN, A. M.; PARHAM, H. Ion-pair extraction-spectrophotometric determination of trace amounts of minoxidil. **Asian Journal of Chemistry**, v. 20, n. 5, p. 3585, 2008.
- BAUER, J. H.; ALPERT, M. A. Rapid reduction of severe hypertension with minoxidil. **Journal of Cardiovascular Pharmacology**, v. 2 n. 2, p. 189, 1980.
- BONAZZI, D. et al. Determination of minoxidil in pharmaceutical formulations by difference spectrophotometry and liquid-chromatography (HPLC). **Farmaco**, v. 45, p. 727, 1990.
- BORDBAR, M. et al. Simultaneous spectrophotometric determination of minoxidil and tretinoin by the H-point standard addition method and partial least squares. **Chemical Papers**, v. 63, n. 3, p. 336, 2009
- BRETT, C. M. A.; BRETT, A. M. O. **Eletroquímica: princípios, métodos e aplicações**. New York: Oxford University Press, 1996. 471 p.
- BUDAVARI, S. S. et al. **The Merck index**. 13. ed. New Jersey: John Wiley and Sons, 2001. 6229 p.
- CHAO, R. S., THAMANN, T. J. VAIL, K. C. Vibrational spectroscopic analysis of minoxidil (2,4-Diamino-6-Piperidinopyrimidine-3-Oxide) and related analogs. **Applied Spectroscopy**, v. 42, n. 2, p. 236, 1988

CHRYSANT, S. G. et al. Cardiac changes from beta-blocker, diuretic and minoxidil combination in hypertension. **Oklahoma City Cardiology**, v. 78, n. 1, p. 45, 1991.

DARGIE, H. J.; DOLLERY, C. T.; DANIEL, J. Minoxidil in resistant hypertension. **Lancet**, v. 8037, n. 2, p. 515, 1977.

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. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 48, n. 3, p. 641, 2008.

EADES, S. K.; CHRISTENSEN, M. L. The clinical pharmacology of loop diuretics in the pediatric patient. **Pediatric Nephrology**, v. 12, p. 603, 1998.

ESPINOSA-MANSILLA, A.; MUNOZ DE LA PENA, A.; SALINAS, F. Semiautomatic determination of furanic aldehydes in food and pharmaceutical samples by a stopped-flow injection analysis method. **Journal of AOAC International (USA)** v. 76, n. 6, p. 1255, 1993.

FANALI, S.; CRISTALLI, M.; CATELLANI, P. Determination of minoxidil in pharmaceutical forms by capillary isotachopheresis. **Journal of Chromatography**, v. 405, p. 385, 1987.

FANALI, S. et al. Capillary zone electrophoresis for drug analysis – rapid-determination of minoxidil in pharmaceutical formulations. **Farmaco**, v. 47, n. 5, p. 711, 1992.

GAGLIARDI, L. et al. Simultaneous determination of minoxidil and tretinoin in pharmaceutical and cosmetic formulations by reversed-phase HPLC. **Analytical Letters**, v. 24, p. 1825, 1991.

GOLDEN, M. H.; ZOUTENDAM, P. H. The determination of minoxidil in human-serum by high-performance liquid-chromatography with amperometric detection. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 5, p. 543, 1987.

HAMMOND, J. J.; KIRKENDALL, W. M. Minoxidil therapy for refractory hypertension and chronic renal failure. **Southern Medical Journal**, v. 72, n. 11, p. 1429, 1979.

HAN, J. H. et al. Expression of androgen receptor, estrogen receptor alpha and beta in the dermal papilla of human hair follicles in vivo. **Journal of Dermatological Science**, v. 36, n. 3, p. 176, 2004.

HARRIS, D. C. **Análise Química Quantitativa**. 5. ed. Rio de Janeiro: Livros Técnicos e Científicos, 2001. p. 61.

HIPERTENSION Arterial. Disponível em:
<<http://www.tuotromedico.com/temas/hipertension.htm>>. Acesso em: 2 abr. 2005.

HUANG, T. H. et al. Rapid determination of trace amounts of minoxidil in hamster skin follicles with various formulations using narrow-bore LC/EC. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analyses**, v. 38, p. 532, 2005.

KAPLAN, N. M. Systemic hypertension: mechanism and diagnosis. In: BRAUNWALD, E.; ZIPES, D. P.; LIBBY, P. **Heart disease: a textbook of cardiovascular medicine**. 6. ed. Philadelphia: Saunders, 2001. cap. 28, p. 941.

KATZUNG, B. G. **Basic and clinical pharmacologic**. 9. ed. São Francisco: McGraw-Hill Medical, 2004. 232 p.

LATUFO, P. A.; LOLIO, C. A. Epidemiologia da Hipertensão Arterial no Brasil. In: **SOCESP: cardiologia**. São Paulo: Atheneu, 1996. vol. 2, cap. 37, p. 327.

LAUBE, N.; MOHR, B.; HESSE, A. Laser-probe-based investigation of the evolution of particle size distributions of calcium oxalate particles formed in artificial urines. **Journal of Crystal Growth**, v. 233, p. 367, 2001.

LENANE, P. et al. Congenital alopecia areata, **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 52, n. 2, p. 8, 2005.

LIU, L. et al. Corrosion behavior of Zr-based bulk metallic glasses in different artificial body fluids. **Journal of Alloys and Compounds**, v. 425, p. 268, 2006.

LOWENTHAL, D. T. et al. Long-term clinical effects, bioavailability, and kinetics of minoxidil in relation to renal function. **Journal of Clinical Pharmacology**, v. 18, n. 10, p. 500, 1978.

MAHROUS, M. S.; ABDELKHALEK, M. M.; BELTAGY, Y. A. Simultaneous quantitation of minoxidil and tretinoin in magistral and pharmaceutical preparations by 1st derivative spectrophotometry. **Analytical Letters**, v. 25, p. 1673, 1992.

MAHROUS, M. E. Methods for the quantitative-determination of minoxidil. **Analytical Letters**, v. 24, p. 2017, 1991.

MANO, Reinaldo. Hipertensão Arterial Sistêmica. Manuais de Cardiologia. RJ, abr. 2009. Disponível em:
<<http://www.manuaisdecardiologia.med.br/has/has.htm>>. Acesso em: 15 mar. 2009

MANUAL de hipertensão arterial. VII Relatório Internacional do Joint National Committee. 2003. Disponível em: <<http://www.manuaisdecardiologia.med.br/>>. Acesso em: 15 mar. 2009.

MENDES, R. K.; CLARO NETO, S.; CAVALHEIRO, É. T. G. Evaluation of a new rigid carbon-castor oil polyurethane composite as an electrode material. **Talanta**, v. 57, n. 5, p. 909, 2002.

MENDES, R. K.; CERVINI, P.; CAVALHEIRO, E. T. G. The use of a graphite–castor oil polyurethane composite electrode for the determination of hydroquinone in photographic developers, **Talanta**, v. 68, p. 708, 2006.

NOBRE, F.; LIMA, N. K. C. Hipertensão arterial: conceito, classificação e critérios diagnósticos. In: TIMERMAN, A. (ed.); CÉSAR, L. A. M. (ed.). **Manual de cardiologia**: SOCESP. São Paulo: Atheneu, 2000. cap. 70.

NÓBREGA, J.A.; MOZETO, A.A. ; ALBERICI, R.M. Reaction kinetics in a flow injection spectrophotometric experiment - A laboratory exercise. **Journal of Chemical Education**, v. 68, n. 11, p. 966, 1991.

OLIVEIRA, A. C.; Santos, S. X.; Cavalheiro, E. T. G. Graphite–silicone rubber composite electrode: Preparation and possibilities of analytical application, **Talanta**, v. 74, p. 1042, 2008.

OLSEN, E. A. et al. Alopecia areata investigational assessment guidelines - part II. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 51, n. 3, p. 441, 2004.

OSTERZIEL, K. J.; JULIUS, S. Vasodilators in the treatment of hypertension. **Comprehensive therapy**, v. 8, n. 11, p. 43, 1982.

PFÄFFEN, V.; ORTIZ, P. I. Electrochemical determination of minoxidil in different pharmaceutical formulations by flow injection analysis. **Analytical Science**, v. 22, p. 91, 2006.

PHARMACOPEIA of the United States of America. Rockville: United States Pharmacopeial Convention, 1985. v. 21.

PLAKOGIANNIS, F. M.; MAHZOUF, S. Z.; BABAR, A. Determination of the optimum solvent system for extraction of minoxidil from a tablet dosage form. **Pharmaceutica Acta Helvetiae**, v. 64, p. 348, 1989.

PO-CHANG CHIANG et al. Medium throughput pK_a determinations of drugs and chemicals by reverse phase HPLC with an organic gradient. **Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies**, v. 29, p. 2291, 2006.

- POMBEIRO, A. J. L. O. **Técnicas e operações unitárias em química laboratorial**. 3. ed. Lisboa: Calouste Gulbenkian, 1998. 1069 p.
- PUNGOR, E.; SZESPESVÁRY, É. Voltametric studies with silicone rubber-based graphite electrodes. **Analytica chimica acta**. V. 43:p. 289, 1968a.
- PUNGOR, E.; SZESPESVÁRY, É.; HAVAS, J. Voltametric studies on graphite impregnated silicone rubber electrodes. **Analytical letters**. v. 1, n. 4, p. 213, 1968b.
- RAMOS, L. A.; CAVALHEIRO, C. C. S.; CAVALHEIRO, E. T. G. Determinação de nitrito em águas utilizando extrato de flores. **Química Nova**, v. 29, n. 5, p. 1114, 2006.
- RANG, H. P.; DALE, M. M.; RITTER, J. M. **Farmacologia**. 4. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001. 703 p.
- REIS, B. F. et al. A análise por injeção em fluxo contínuo. **Química Nova**, v. 12, n. 1, p. 82, 1989.
- REIS, B. F. Análise por injeção em fluxo: vinte anos de desenvolvimento. **Química Nova**, v. 19, n. 1, p. 51, 1996.
- RIDDIOUGH, M. A. Preventing, detecting and managing adverse reactions of antihypertensive agents in the ambulant patient with essential hypertension. **American Journal of Hospital Pharmacy**, v. 34, n. 5, p. 465, 1977.
- RIERA, A. R. P. **Hipertensão arterial: conceitos práticos e terapêutica**. São Paulo: Atheneu, 2000. 462 p.
- ROCHA, F.R.P.; NÓBREGA, J.A. Flow Injection Spectrophotometric Determination Of Nitrate In Electrolyte Of Lead-Acid Batteries. **Talanta**, v. 45, p. 265, 1997
- ROCHA, F. R. P. et al. Experimentos didáticos utilizando sistema de análise por injeção em fluxo. **Química Nova**, v. 23, n. 1, p. 119, 2000.
- RUIZ-MEDINA, A. et al. Integrated flow injection-solid phase spectrophotometric determination of minoxidil. **Talanta**, v. 50, n. 2, p. 277, 1999.
- RUZICKA, J.; HANSEN. E. H. Flow injection analyses1. New concept of fast continuous-flow analysis. **Analytica Chimica Acta**, v. 78, p. 145, 1975.
- RUZICKA, J.; HANSEN. E. H. Stopped flow and merging zones - new approach to enzymatic assay by flow injection analysis. **Analytica Chimica Acta**, v. 106, p. 207, 1979.

RUZICKA, J.; HANSEN, E. H. The 1st decade of flow-injection analysis - from serial assay to diagnostic-tool. **Analytica Chimica Acta**, v. 179, p. 1, 1986.

SASTRY, C. S. P. et al. A simple spectrophotometric method for the determination of minoxidil. **Microchemical Journal**, v. 44, p. 268, 1991.

SCIELO. Disponível em: <<http://www.scielo.org>>. Acesso em: 16 fev. 2009.

SEEDAT, Y. K.; RAWAT, R.; Captopril combined with minoxidil, beta-blocker and furosemide in the treatment of refractory hypertension. **European Journal of Clinical Pharmacology**, v. 25, n. 1, p. 9, 1983.

SEMAAN, F. S. et al. Optimization of sample preparation using statical methods: spectrophotometric determination of Fe and Co in pharmaceutical samples. **Microchemical Journal**, v. 78, n. 2, p. 187, 2004.

SEMAAN, F. S. et al. Flow injection spectrophotometric determination of furosemide in pharmaceuticals by the bleaching of a permanganate carrier solution. **Journal of Flow Injection Analysis**, v. 22, n. 1, p. 34, 2005.

SEMAAN, F.S.; PINTO, E.M.; CAVALHEIRO, E.T.G; BRETT, C.M.A. A Graphite-Polyurethane Composite Electrode for the Analysis of Furosemide **Electroanalysis** v. 20, n. 21, p. 2287 , 2008.

SINCLAIR, R. D.; DAWBER, R. P. R. Androgenetic alopecia in men and women. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 48, n. 1, p. 8, 2004.

SILVERSTEIN, R. M.; WEBSTER, F. X.; KIEMLE, D. J. **Identificação espectrométrica de compostos orgânicos**. 7. ed. Rio de Janeiro: Livros Técnicos e Científicos, 2007.

SKOOG, D. A.; HOLLER, F. J.; NIEMAN, T. A. **Princípios de análise instrumental**. 5. ed. Porto Alegre: Bookman, 2002. 836 p.

SOUSA, R. A. et al. Fast determination of minoxidil by photometric flow titration. **Eclética Química**, v. 30, n. 3, p. 79, 2005.

SOUSA, R. A. **Estratégias para a determinação de minoxidil**. 2005. 103 f. Dissertação (Mestrado em Química Analítica). – Departamento de Química, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2007.

SOUZA, F. S. **Guia farmacoterapêutico da rede ambulatorial municipal de Alfenas 1998/1999**. 2. ed. Alfenas: Prefeitura Municipal, 1998. p. 30.

TALLMAN, D. E.; PETERSEN, S. L. Composite electrodes for electroanalysis: principles and applications. **Electroanalysis**, v. 2, p. 499, 1990.

TENSCHERT, W. et al. Minoxidil in treatment resistant hypertension. **Schweizerische Medizinische Wochenschrift**, v. 109, n. 47, p. 1869, 1979.

TRÜEB, R. M. Molecular mechanisms of androgenetic alopecia. **Experimental Gerontology**, v. 37, p. 981, 2002.

USP – PHARMACOPEIA OF THE UNITED STATES OF AMERICA. Rockville: United States Pharmacopeial Convention, 1985. v. 21.

VLASE, H. L.; PANAGOPOULOS, G.; MICHELIS, M. F. Effectiveness of furosemide in uncontrolled hypertension in the elderly: role of rennin profiling. **American Journal of Hypertension**, v. 16, p. 187, 2003.

WANG, J., **Analytical Electrochemistry**. New Jersey: John Wiley & Sons, Inc., Publications, 2006. 250 p.

WATERS. Understanding column selection for reversed-phase chromatography. Disponível em: <http://www.waters.com/waters/educationInstance.htm?locale=cn_US&ciid=10086322>. Acesso em: 26 maio 2009.

WEB of Science. Disponível em: <<http://www.isiknowledge.com>>. Acesso em: 16 fev. 2009.

WILBURN, R. L.; BLAUFUSS, A.; BENNET, C. M. Long-term treatment of severe hypertension with minoxidil, propranolol and furosemide. **Circulation**, v. 52. n. 4, p. 706, 1975.

XAVIER, S. S. **Aplicação de eletrodos compósitos a base de grafite-borracha de silicone na determinação de substâncias de interesse farmacológico**. 2007. 79 f. Dissertação (Mestrado em Química Analítica) – Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2007.

ZARGHI, A. et al. HPLC determination of the tretinoin-minoxidil solution. **Pharmaceutica Acta Helvetiae**, v. 73, p. 163, 1998.

ZHONG, W. Z. et al. Quantitative analysis quantitation of 2-n-nonyl-1,3-dioxolane by stable-isotope dilution gas chromatography mass spectrometry. **Journal of Chromatography B.**, v. 705, p. 39, 1998a.

ZHONG, W. Z. J. et al. Application of solid-phase extraction in the method development for determination of SEPA, an acronym for soft enhancement of percutaneous absorption, in human, rat, and rabbit serum using GC-FID method. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 16, p. 1179, 1998b.

ANEXO I

Bula do Regaine[®]

Regaine®

Minoxidil

FORMA FARMACÊUTICA E APRESENTAÇÕES:

Regaine® (minoxidil) Solução Tópica a 5% é apresentado em embalagem contendo frasco de plástico de 60 ml, acompanhado de bomba spray e conta-gotas.

USO EXTERNO

USO ADULTO

EXCLUSIVO PARA USO MASCULINO

COMPOSIÇÃO:

Cada ml de Regaine® (minoxidil) 5% contém:

Minoxidil 50 mg

Excipiente q.s.p. 1 ml

O excipiente contém: propilenoglicol, etanol e água purificada.

INFORMAÇÃO AO PACIENTE:

- Regaine® (minoxidil) está indicado no tratamento da alopecia androgênica (calvície hereditária) em homens adultos.
- Guarde este produto à temperatura ambiente controlada (20° – 25° C). Feche bem o frasco após o uso.
- O prazo de validade está impresso na embalagem externa e é de 36 meses após a data de fabricação. Verifique sempre o prazo de validade e não utilize medicamentos com o prazo de validade vencido, pois pode ser prejudicial à sua saúde.
- Este produto não deve ser utilizado por mulheres.
- Use este produto apenas na dose recomendada por seu médico. Antes de usar Regaine® (minoxidil), verifique se seu couro cabeludo está normal e saudável. Não use Regaine® (minoxidil) se sua pele ou couro cabeludo estiverem inflamados, vermelhos, irritados ou doloridos, ou sob condições como queimaduras solares ou dermatites. Siga sempre a posologia recomendada, respeitando sempre os horários, as doses e a duração do tratamento.
- Não se preocupe se você esquecer de aplicar o produto uma ou duas vezes, somente proceda da forma adequada na próxima aplicação. Não aplique o produto mais que duas vezes ao dia, pois isso não fará com que seu cabelo cresça mais depressa.
- O uso de secador de cabelos, géis, cremes ou sprays para os cabelos não diminui o efeito de Regaine® (minoxidil).
- O uso de tinturas ou permanentes não interfere na ação de Regaine®. Apesar disso, a fim de evitar qualquer irritação local assegure-se que não há minoxidil no couro cabeludo antes de aplicar qualquer produto químico. Para melhores resultados, não aplique Regaine® (minoxidil) no mesmo dia em que você usou esses produtos químicos.
- São necessários no mínimo 2 meses de aplicação de Regaine® (minoxidil), duas vezes ao dia, para que se evidencie o crescimento capilar esperado. Para alguns homens, podem ser necessários oito a doze meses para que sejam alcançados os melhores resultados, de acordo

com o caso de cada paciente, embora a estabilização da perda de cabelos tenha sido registrada aos três meses de tratamento. A quantidade de cabelo que crescerá novamente varia de pessoa para pessoa.

- Quando você começar a usar Regaine® (minoxidil) 5%, a queda de cabelo pode aumentar temporariamente por até 2 semanas. Este é um processo normal da ação de Regaine® (minoxidil) e mostra que novos cabelos estão crescendo e substituindo os antigos. Procure seu médico se a queda persistir após 2 semanas.
- Se você suspender a aplicação de Regaine® (minoxidil), o nascimento de cabelos novos será interrompido. Ocorrerá então um efeito reversível e dentro de 3 a 4 meses sem tratamento pode-se voltar ao aspecto anterior ao início do tratamento.
- Informe a seu médico o aparecimento de reações desagradáveis. O uso de Regaine® (minoxidil) deve ser interrompido e o médico procurado se você apresentar reações como: irritação local, frequência cardíaca rápida ou palpitações, aumento de peso inesperado e sem motivo aparente, tumefação ou inchaço nas mãos, face ou tornozelos; tontura, debilidade, vertigem ou desmaio, aparecimento de dor no tórax tipo angina, braço ou ombro. Embora o uso extensivo de Regaine® (minoxidil) não tenha revelado evidências de que é absorvido minoxidil o suficiente para acarretar efeitos sistêmicos, maior absorção devido ao abuso ou à variabilidade individual ou sensibilidade anormal poderia levar, pelo menos teoricamente, a um efeito sistêmico, e os pacientes devem ser alertados quanto a isso.
- **TODO MEDICAMENTO DEVE SER MANTIDO FORA DO ALCANCE DAS CRIANÇAS.**
- Não utilize Regaine® (minoxidil) em conjunto com outros medicamentos de uso local, como, por exemplo, a tretinoína e a antralina, pois nesse caso a absorção do minoxidil pode ser aumentada.
- Regaine® (minoxidil) é contra-indicado em pacientes alérgicos ao minoxidil ou a qualquer um dos componentes da fórmula.
- Regaine® (minoxidil) não é recomendado nos casos de perda repentina ou fragmentada de cabelos, nos casos de calvície completa ou perda completa dos cabelos do corpo inteiro e nos casos em que a queda de cabelos é devido ao uso de algum medicamento, deficiências alimentares, quimioterapia ou enfermidades ou situações que causem danos ao couro cabeludo. Se você não está certo sobre o que está causando a perda de seus cabelos, você deve consultar seu médico.
- ESTE MEDICAMENTO É EXCLUSIVO PARA USO EXTERNO. Se ocorrer ingestão acidental, o médico deve ser imediatamente avisado.
- Regaine® (minoxidil) contém uma base alcóolica que pode causar queimação e irritação nos olhos. Portanto, evite o contato com os olhos e pele irritada. No caso de contato acidental com superfícies sensíveis (olhos, pele machucada e membranas mucosas), lave a região afetada com grandes quantidades de água fria corrente. Se a irritação continuar, contacte o médico. Não se deve inalar o spray.
- Lave bem as mãos após a aplicação de Regaine® (minoxidil).
- Não aplique este produto em qualquer outra parte do corpo. Utilize um xampu suave se você lavar os cabelos antes de aplicar Regaine® (minoxidil). Aplique-o apenas quando o cabelo e o couro cabeludo estiverem perfeitamente secos. Deixe o produto em contato com o couro cabeludo por pelo menos 4 horas.
- Como Regaine® (minoxidil) contém álcool em sua formulação, não deve ser aplicado enquanto se estiver fumando ou na presença de fontes incandescentes. Tome cuidado

principalmente quando estiver usando o spray. A inalação do spray deve ser evitada.

- Raspe a face interna do cartucho com metal para visualizar a marca de segurança Pharmacia.
- NÃO UTILIZE MEDICAMENTOS SEM O CONHECIMENTO DE SEU MÉDICO. PODE SER PERIGOSO PARA SUA SAÚDE.

INFORMAÇÃO TÉCNICA:

Farmacologia clínica

Quando aplicado localmente, Regaine® (minoxidil) estimula o crescimento de cabelos em portadores de alopecia androgênica.

Em estudos clínicos realizados em homens com idade entre 18 e 49 anos com graus moderados de calvície, a seguinte resposta foi relatada com o uso de Regaine® (minoxidil) 2%: 26% relataram crescimento de cabelos moderado a denso após o uso de Regaine® (minoxidil) 2% durante 4 meses (26% tiveram crescimento moderado a denso e 33% obtiveram um crescimento mínimo), em comparação com 11% dos homens que relataram crescimento de cabelo usando placebo durante 4 meses (11% tiveram crescimento moderado a denso e 31% obtiveram um crescimento mínimo).

São necessários no mínimo 2 meses de aplicação diária de Regaine® (minoxidil) 5%, duas vezes ao dia, para que se evidencie o crescimento capilar esperado. Para alguns homens, são necessários pelo menos 4 meses para a obtenção de resultados. Podem ser necessários oito a doze meses para que sejam alcançados os melhores resultados, variando de acordo com o caso de cada paciente, embora a estabilização da perda de cabelos tenha sido registrada aos três meses de tratamento.

Se a aplicação de Regaine® (minoxidil) for suspensa, o nascimento de cabelos novos será interrompido. Ocorrerá então um efeito reversível e dentro de 3 a 4 meses pode-se voltar ao aspecto anterior ao início do tratamento.

Ainda não é conhecido o exato mecanismo pelo qual Regaine® (minoxidil) estimula o crescimento do cabelo, mas o minoxidil pode estabilizar e reverter o processo de queda de cabelos na alopecia androgênica.

Regaine® (minoxidil) tem causado em ratos o decréscimo do peso fetal, diminuição do número de fetos vivos e aumento de malformações viscerais, esqueléticas e totais ou variações esqueléticas, quando se administram doses 1.575 a 2.100 vezes superiores às doses clínicas. Estes efeitos estiveram associados com toxicidade materna. É improvável que o dano fetal, observado em animais, seja clinicamente significativo.

Não foram detectadas evidências de efeitos sistêmicos durante o tratamento com Regaine® (minoxidil), o que reflete sua fraca absorção, cuja média é de aproximadamente 1,4% (entre 0,3% a 4,5%) a partir do couro cabeludo intacto normal. Sua absorção é de aproximadamente 2%, quando aplicado topicamente sobre o couro cabeludo raspado de pacientes hipertensos. O aumento da quantidade de droga aplicada ou da frequência da aplicação do produto, também resulta em aumento da absorção. O uso de Regaine® (minoxidil) em áreas que estejam sob oclusão (curativo plástico), queimadas pelo sol, e o aumento da superfície da área de aplicação, tem mínimo ou nenhum efeito sobre a absorção do minoxidil tópico. Os resultados dos extensivos estudos farmacocinéticos indicaram que os três fatores mais importantes que determinam o aumento da absorção do minoxidil tópico são: aumento da magnitude da dose aplicada; aumento da frequência de administração e diminuição da barreira protetora do estrato córneo.

Os níveis séricos de minoxidil e seus efeitos sistêmicos, a partir de aplicação tópica de Regaine® (minoxidil), são determinados pela taxa de absorção da droga através da pele. Aproximadamente 95% da droga absorvida sistemicamente é eliminada em quatro dias, após interrupção da

administração tópica do produto. O princípio ativo (minoxidil) e seus metabólitos são eliminados principalmente através da urina.

Regaine® (minoxidil) 5% não irá prevenir a queda de cabelo decorrente do uso de alguns medicamentos prescritos ou não, de problemas nutricionais sérios (baixa concentração sérica de Ferro e alta concentração de vitamina A), hipotireoidismo, quimioterapia, ou doenças que causam cicatrizes no couro cabeludo.

Adicionalmente, Regaine® (minoxidil) não evitará a queda de cabelo devida a danos como cicatrizes ou queimaduras profundas causados por produtos ou métodos de tratamento capilar ou estéticos.

INDICAÇÕES:

Regaine® (minoxidil) 5% está indicado no tratamento da alopecia androgênica (calvície hereditária) em homens adultos. O minoxidil tópico estabiliza a queda de cabelos na maioria dos pacientes com alopecia androgênica e promove um crescimento capilar “de novo”.

CONTRA-INDICAÇÕES:

Regaine® (minoxidil) 5% é contra-indicado em pacientes com história de hipersensibilidade ao minoxidil ou a qualquer um dos componentes da fórmula. Este produto não deve ser usado em pacientes do sexo feminino.

PRECAUÇÕES E ADVERTÊNCIAS:

Regaine® (minoxidil) 5% é um medicamento de venda exclusiva sob prescrição médica.

Deve-se verificar se o couro cabeludo apresenta-se saudável e normal, antes de usar Regaine® (minoxidil).

O uso extensivo de minoxidil tópico não mostra que ocorra absorção de quantidade suficiente para causar efeitos sistêmicos; porém, pode haver uma maior absorção devido ao uso abusivo do produto ou à variação individual e sensibilidade exagerada levando, pelo menos teoricamente, a um efeito sistêmico. Nesse caso, existe a possibilidade da ocorrência de efeitos colaterais, tais como: taquicardia, angina, debilidade ou vertigem, ganho de peso repentino, suor das mãos e pés e edema. Embora esses efeitos não tenham sido associados ao uso tópico de Regaine® (minoxidil), caso ocorram, o tratamento deve ser interrompido e o médico deverá ser contactado. Se necessário, o médico irá instituir o tratamento adequado.

O médico deve ser contactado se ocorrer vermelhidão e/ou irritação do couro cabeludo persistente.

Regaine® (minoxidil) não deve ser usado concomitantemente com outros agentes tópicos, incluindo tretinoína, antralina ou outros que aumentem a absorção cutânea do minoxidil. O mesmo se aplica a inflamações ou outras afecções dermatológicas, onde a diminuição da integridade da barreira epidérmica pode aumentar a absorção percutânea do minoxidil.

Regaine® (minoxidil) contém uma base alcoólica que pode causar ardor, queimação e irritação nos olhos. No caso de contato acidental com superfícies sensíveis (olhos, pele escoriada e membranas mucosas), a área deve ser lavada com grandes quantidades de água fria corrente. A inalação da névoa do spray deve ser evitada. A ingestão acidental da solução pode provocar efeitos adversos graves.

A eficácia e a tolerabilidade deste produto em pacientes com menos de 18 anos não foram estudadas até o presente momento.

Regaine® (minoxidil) 5% não deve ser usado em pacientes do sexo feminino. Estudos clínicos demonstraram que o uso do minoxidil a 5% não proporciona melhores resultados que a solução tópica a 2% em mulheres. Pode ocorrer crescimento facial de cabelos em algumas mulheres. Além disso, o uso do produto pode ser prejudicial durante a gravidez e lactação (Vide

“Farmacologia Clínica”).

INTERAÇÕES MEDICAMENTOSAS:

Não são conhecidas interações medicamentosas associadas com o uso concomitante de medicamentos sistêmicos e Regaine® (minoxidil). O estrato córneo controla e limita a taxa de absorção do minoxidil tópico. Medicamentos de uso local, como por exemplo a tretinoína e a antralina, capazes de alterar a barreira córnea, podem levar a um aumento da absorção de minoxidil tópico, quando aplicados ao mesmo tempo.

REAÇÕES ADVERSAS:

Regaine® (minoxidil) tem sido usado por milhares de pacientes envolvidos em estudos clínicos controlados por placebo. Com exceção das reações dermatológicas, devidas à intolerância cutânea à formulação tópica (por ex. irritação, coceira), não houve reações individuais ou reações sistêmicas significativas, ou clinicamente diferentes do grupo-placebo. Em estudos comparativos entre Regaine® (minoxidil) 5%, 2% e placebo, efeitos dermatológicos em fêmeas foram mais frequentes no grupo de Regaine® (minoxidil) 5%. Os eventos dermatológicos foram do mesmo tipo e severidade, tanto no grupo que recebeu Regaine® (minoxidil) 2% quanto no grupo que recebeu Regaine® (minoxidil) 5%. No entanto, a incidência foi maior no grupo que recebeu Regaine® (minoxidil) 5%. Não ocorreu também aumento de risco devido a eventos médicos relacionados com o uso de minoxidil pelos pacientes, tanto em relação ao sistema cardiovascular e metabólico quanto em outros sistemas e órgãos.

Os eventos já relatados com Regaine® (minoxidil) incluem: hipertricose (crescimento não desejado de cabelos fora do couro cabeludo, inclusive na face de mulheres), eritema local, coceira, pele seca/descamação do couro cabeludo e exacerbação da perda de cabelos. Alguns pacientes relataram aumento do desprendimento capilar após o início do tratamento com Regaine® (minoxidil). Tal fato ocorreu, muito provavelmente, devido à ação de Regaine® (minoxidil) em provocar a transferência dos cabelos da fase de repouso ou telógeno, para a fase de crescimento ou anágeno (os cabelos velhos caem enquanto novos crescem no lugar). Este aumento temporário do desprendimento capilar geralmente ocorre duas a seis semanas após o início do tratamento e diminui dentro de algumas semanas. Caso persista por mais de duas semanas, o paciente deve descontinuar o uso de Regaine® (minoxidil) e procurar o médico.

Também foram observados, embora muito raramente, os seguintes efeitos indesejáveis: dermatite alérgica de contato, foliculite e seborréia.

Existe a possibilidade do minoxidil ser absorvido localmente, podendo nesse caso ocorrer efeitos colaterais sistêmicos (ver “Precauções” e “Informações Técnicas-Farmacologia Clínica”).

POSOLOGIA E ADMINISTRAÇÃO:

EXCLUSIVAMENTE PARA USO EXTERNO

Secar bem o cabelo e o couro cabeludo antes da aplicação de Regaine® (minoxidil).

Aplicar uma dose total de 1 ml de Regaine® (minoxidil) no couro cabeludo, sobre a área calva e áreas circunvizinhas, duas vezes ao dia, iniciando a aplicação no centro da área afetada. O método de aplicação varia de acordo com o tipo de aplicador, conforme indicado abaixo. Após a aplicação de Regaine® (minoxidil), lavar bem as mãos.

A dose total diária não deve exceder 2 ml ou 2 aplicações diárias (1 ml pela manhã e 1 ml à noite).

Não é necessário lavar os cabelos antes de usar Regaine® (minoxidil); se, porém, os cabelos forem lavados antes da aplicação, não se deve utilizar xampu com silicone. Deve-se esperar pelo menos 4 horas após a aplicação de Regaine® (minoxidil) para lavar os cabelos.

Ver maiores detalhes e cuidados sobre o uso do produto no item “Informações ao paciente”.

ATENÇÃO: Regaine® (minoxidil) pode apresentar alteração de coloração (de translúcido para amarelo), sem que isto modifique a qualidade do produto.

Modo de usar:

Bomba spray: Adaptar a bomba ao frasco. Após direcionar o frasco para o centro da área calva, pressionar a bomba uma vez e espalhar Regaine® (minoxidil) com a ponta dos dedos até atingir toda a área a ser tratada. Repetir até o total de 6 vezes para completar a dose de 1 ml da solução.

Conta-gotas: Encher o conta-gotas até a marca de 1 ml, aplicar as gotas de Regaine® (minoxidil) no couro cabeludo e espalhar com a ponta dos dedos até atingir toda a área calva.

ATENÇÃO: As válvulas spray devem ser inutilizadas após 4 meses de uso contínuo, sob risco de entupimento ou mau funcionamento. Não existem restrições quanto ao uso contínuo do conta-gotas.

SUPERDOSAGEM / INGESTÃO ACIDENTAL:

Devido à alta concentração de minoxidil em Regaine® (minoxidil) 5%, a ingestão acidental deste medicamento pode produzir efeitos sistêmicos relacionados com a ação da droga.

Os sinais e sintomas provocados pela superdosagem de minoxidil provavelmente seriam efeitos cardiovasculares associados com a retenção hídrica, ganho de peso repentino, taquicardia, debilidade e vertigem. Hipotensão resultante da administração de minoxidil tem sido relatada em casos raros. Se houver hipotensão exagerada, esta, muito provavelmente, ocorrerá em associação com o bloqueio residual prévio do sistema nervoso simpático (efeitos semelhantes aos da guanetidina ou bloqueio alfa-adrenérgico). O tratamento recomendado é a administração intravenosa de solução salina normal.

Devem ser evitadas as drogas simpatomiméticas, tais como noradrenalina e adrenalina, por estimularem excessivamente a função cardíaca. A fenilefrina, a angiotensina II e a vasopressina, que revertem os efeitos de Regaine® (minoxidil), devem somente ser usadas quando for evidente a perfusão inadequada de um órgão vital.

USO EM PACIENTES IDOSOS:

Aos pacientes idosos se aplicam todas as recomendações acima descritas.

Registro nº MS - 1.2389.0004

Responsável Técnica:

Farm. Bioq. Dra. F. Cutrupi – CRFSP 7.562

Fabricado por:

Pharmacia & Upjohn Co.
Kalamazoo - EUA

Importado e distribuído por:

PHARMACIA BRASIL LTDA.
Av. Dr. Chucri Zaidan, 940 - 7º Andar - São Paulo - SP
CNPJ 71.699.490/0001-04
CAP- Central de Atendimento Pharmacia
Fone: 0800 55-1800

Marca sob licença de:
Pharmacia & Upjohn Company – EUA

VENDA SOB PRESCRIÇÃO MÉDICA

NÚMERO DE LOTE, DATA DE FABRICAÇÃO E PRAZO DE VALIDADE: vide cartucho.
B-01

ANEXO II

Bula do Loniten[®]

Loniten[®]**Minoxidil****FORMA FARMACÊUTICA E APRESENTAÇÃO:**

Frasco individual contendo 30 comprimidos a 10 mg de minoxidil.

USO ADULTO E PEDIÁTRICO.**COMPOSIÇÃO:**

Cada comprimido contém:

Minoxidil	10 mg
Lactose USP	90 mg
Celulose microcristalina NF	23 mg
Amido USP	5,4 mg
Dióxido de silício coloidal NF	0,6 mg
Estearato de magnésio USP	1 mg

INFORMAÇÕES AO PACIENTE:**TODO MEDICAMENTO DEVE SER MANTIDO FORA DO ALCANCE DAS CRIANÇAS.**

- Armazenar o produto à temperatura ambiente, ao abrigo da luz e umidade.
- Prazo de validade: 48 meses após a data de fabricação, como indicado na embalagem externa. Não utilize medicamentos com o prazo de validade vencido, pois pode ser prejudicial para sua saúde.
- LONITEN (minoxidil) é um medicamento para uso oral indicado para o tratamento de pressão arterial alta. Há muitas pessoas com pressão arterial alta, mas muitas delas não necessitam de LONITEN (minoxidil). Este produto é usado somente quando seu médico decide que a sua hipertensão arterial é severa, sua hipertensão arterial está causando danos a órgãos vitais, ou outros medicamentos não foram suficientemente eficazes, ou produziram muitos efeitos colaterais.
- Nunca dê a um amigo ou parente um comprimido de LONITEN (minoxidil) ou de qualquer outro medicamento para pressão alta. Somente o médico deve prescrevê-lo.
- Este produto é bem tolerado, entretanto podem ocorrer algumas reações indesejáveis: inchaço, aumento de peso, aumento da frequência cardíaca e hipertricose (alongamento, engrossamento e pigmentação acentuada dos pêlos do corpo, notada inicialmente na área facial, no período de 3 a 6 semanas após o início da terapia. Pode desaparecer ligeiramente durante um tratamento prolongado, ou cessar no período de 1 a 3 meses após a interrupção do tratamento. Raramente podem ser observados: hipotensão, intolerância gastrointestinal e amolecimento dos seios. Caso ocorra qualquer efeito indesejável, informe seu médico que lhe dará a orientação adequada.
- Para uma correta prescrição, informe ao seu médico caso tenha problemas de rim, fígado, coração ou outras doenças, ou se estiver utilizando outros medicamentos.
- Este produto não deve ser utilizado por pacientes com feocromocitoma.
- Utilize este medicamento apenas como indicado pelo seu médico. Não interrompa o tratamento sem o conhecimento de seu médico.
- LONITEN (minoxidil) não deve ser utilizado na gravidez, a não ser que seu médico assim lhe oriente. Do mesmo modo, deve-se evitar seu uso durante a amamentação. Informe seu médico caso esteja grávida ou pretenda engravidar.

- Crianças menores de 12 anos de idade devem ter especial atenção médica durante o tratamento com LONITEN (minoxidil).

NÃO UTILIZE MEDICAMENTOS SEM O CONHECIMENTO DO SEU MÉDICO. PODE SER PREJUDICIAL PARA SUA SAÚDE.

INFORMAÇÕES TÉCNICAS:

FARMACOLOGIA CLÍNICA:

LONITEN (minoxidil) é um medicamento para uso oral de efeito prolongado, que reduz as pressões arteriais sistólicas e diastólicas elevadas. A redução da pressão sanguínea resulta de um relaxamento seletivo da musculatura lisa arteriolar periférica. LONITEN (minoxidil) é especialmente indicado no tratamento da hipertensão arterial persistente, que é caracterizada por uma resistência arteriolar periférica elevada. LONITEN (minoxidil) não estimula o coração ou a reabsorção de eletrólitos diretamente pelos rins. Entretanto a administração de LONITEN (minoxidil) provoca um aumento imediato do reflexo do rendimento cardíaco; retenção salina e hídrica e aumento da ativação plasmática da renina. Estes efeitos são diminuídos pela administração simultânea de diuréticos e agentes bloqueadores beta-adrenérgicos.

INDICAÇÃO:

Hipertensão arterial não-responsiva às doses toleradas de diurético mais um segundo agente anti-hipertensivo. LONITEN (minoxidil) deve ser administrado concomitantemente com um supressor do sistema nervoso simpático e um diurético para início de terapia.

CONTRA-INDICAÇÕES:

LONITEN (minoxidil) é contra-indicado em feocromocitoma, em pacientes com porfiria e em pacientes hipersensíveis ao minoxidil.

ADVERTÊNCIAS:

Se administrado isoladamente, LONITEN (minoxidil) pode provocar, em poucos dias, retenção significativa de sal e água, produzindo edema dependente, turgência da face, olhos e mãos; distensão das veias do pescoço, hepatomegalia e refluxo hepatojugular positivo.

O raio-X do tórax pode também revelar engurgitamento vascular pulmonar.

A condição clínica de alguns pacientes com insuficiência cardíaca sintomática pode deteriorar nestas circunstâncias. O tratamento diurético isolado ou em combinação com ingestão restrita de sal minimizará esta resposta. Respostas refratárias a estas medidas podem exigir descontinuação temporária da terapia com LONITEN (minoxidil) por 1 ou 2 dias, durante os quais pode haver perda parcial do controle de pressão sanguínea.

Pode haver desenvolvimento de angina pectoris em pacientes com doença não detectada da artéria coronária, a não ser que se previna a taquicardia induzida por LONITEN (minoxidil) com drogas bloqueadoras beta-adrenérgicas ou outros supressores adequados do sistema nervoso simpático. Pacientes com angina pectoris instável ou de surgimento recente devem ser protegidos com estes agentes antes do início da terapia com LONITEN (minoxidil), para se evitar agravamento do quadro. O efeito de redução da pressão sanguínea adiciona-se àquele dos agentes anti-hipertensivos administrados concomitantemente. A interação de LONITEN (minoxidil) com agentes que produzem hipotensão ortostática pode resultar em redução excessiva da pressão sanguínea.

PRECAUÇÕES:

LONITEN (minoxidil) não é recomendado para o tratamento de pacientes com hipertensão lábil, leve, ou controlável por doses toleradas de um diurético associado a um outro agente anti-hipertensivo. Não deve ser usado para terapia prolongada de hipertensão já melhorada por

cirurgia, isto é, coarctação da aorta, aldosteronismo primário ou estenose unilateral da artéria renal.

Retenção de água e sal: LONITEN (minoxidil) deve ser usado em combinação com um diurético para evitar retenção hídrica, edema e, possivelmente, insuficiência cardíaca congestiva. Retenção hídrica e salina levando a aumento de peso de 1 - 1,5 kg pode diminuir a eficácia de LONITEN (minoxidil). O peso do paciente e o balanço hidroeletrólítico devem ser monitorados e, em caso de evidência de retenção de fluidos, deve ser instituído um esquema mais rigoroso. Os pacientes devem ser cuidadosamente instruídos acerca da sua necessidade de uso do diurético e à limitação de sua ingestão de eletrólitos.

Taquicardia: como o minoxidil é um vasodilatador, pode ocorrer taquicardia reflexa e, possivelmente, angina pectoris; recomenda-se, portanto, que seja associado ao tratamento um agente beta-bloqueador ou outro supressor do Sistema Nervoso Simpático para prevenir ou minimizar tal resposta.

Alterações no ECG: Aproximadamente 60% dos pacientes apresentam alterações do eletrocardiograma na direção e magnitude das ondas T logo após o início da terapia com LONITEN (minoxidil). No caso de alterações maiores, pode ser atingido o segmento S-T, porém não há alteração independente nesse segmento, e não há evidência de isquemia do miocárdio. Estas mudanças assintomáticas desaparecem usualmente com a continuidade do tratamento com LONITEN (minoxidil). O eletrocardiograma reverterá à fase do pré-tratamento se a medicação for descontinuada.

Hipertricose: na maioria dos pacientes sob tratamento com LONITEN (minoxidil), se observa alongamento e pigmentação acentuada dos pêlos do corpo (hipertricose), não acompanhada de anormalidades endócrinas. Notada inicialmente na área facial, no período de 3 - 6 semanas após o início da terapia, pode desaparecer ligeiramente durante terapia prolongada. Após a descontinuação do tratamento, cessa o crescimento de pêlos e, em um período de 1 - 6 meses, retorna-se à aparência anterior ao início da terapia. Todos os pacientes devem ser informados deste provável efeito antes de iniciar a terapia com LONITEN (minoxidil).

Pericardite, efusão pericárdica e tamponamento: Embora ainda não exista evidência de relação causa-efeito, há vários relatos de pericardite ocorrendo em associação com minoxidil. Efusão pericárdica e, ocasionalmente, tamponamento, foram observados em cerca de 3% - 5% dos pacientes tratados e que não estavam sob diálise. Em muitos casos, há evidências de outra etiologia potencial, mas em outros casos nenhuma outra causa estava presente. A maioria das efusões observadas em pacientes sem diálise foram atribuídas a fatores tais como uremia, retenção hídrica acentuada, insuficiência cardíaca congestiva, "shunt" aurículo-ventricular aberto ou doença tissular infecciosa, auto-imune ou do tecido conectivo.

Os pacientes tratados com LONITEN (minoxidil) devem ser monitorados periodicamente e, se houver suspeita de efusão pericárdica, deve-se instituir uma terapia apropriada (dose maior de diuréticos, diálise, pericardiocentese ou mesmo cirurgia podem se mostrar necessários). Se a efusão persistir, deve-se considerar a retirada do minoxidil e optar-se por outros meios de controle da hipertensão.

Infarto do miocárdio: Pacientes que sofreram infarto do miocárdio somente devem ser tratados com LONITEN (minoxidil) após o estabelecimento de uma situação pós-enfarte estável.

Lesões cardíacas em animais: demonstrou-se que o minoxidil produz vários tipos de lesões cardíacas em espécies não-primatas. Entretanto, através do grande acúmulo de experiência com o produto e de autópsias em pacientes que tomaram e não tomaram minoxidil, observou-se que essas lesões não ocorrem no ser humano.

Insuficiência renal ou pacientes em diálise: esses pacientes podem requerer doses menores de minoxidil.

Interação com guanetidina: embora o minoxidil por si só não cause hipotensão ortostática, sua administração a pacientes que já recebem guanetidina pode levar a profundos efeitos ortostáticos. Se possível, deve-se suspender a administração de guanetidina antes do início da terapia com

minoxidil. Caso contrário, o minoxidil deve ser administrado em ambiente hospitalar e o paciente cuidadosamente monitorado.

Gravidez e amamentação: A segurança do produto ainda não foi estabelecida para o período de gravidez. Estudos em animais não mostram efeitos teratogênicos, mas LONITEN (minoxidil) somente deveria ser usado durante a gravidez se os benefícios potenciais superarem o risco potencial para o feto. Esta droga é excretada no leite humano; deve-se, portanto, evitar o seu uso durante a amamentação.

EFEITOS COLATERAIS E REAÇÕES ADVERSAS:

A maioria dos pacientes que receberam LONITEN (minoxidil) observaram uma diminuição de eventos clínicos adversos pré-existentes atribuídos à sua doença ou a terapia prévia.

Novos efeitos, ou efeitos com possível aumento, incluem: hipertricose, edema periférico associado ou não a aumento de peso, efusão pericárdica e tamponamento; aumento da frequência cardíaca, declínio temporário de hemoglobina e hematócrito, aumento temporário de creatinina e nitrogênio uréico do sangue. Efeitos colaterais raramente registrados incluem hipotensão, intolerância gastrointestinal, náuseas e vômitos, amolecimento dos seios, trombocitopenia, leucopenia e *rash* cutâneo, incluindo casos raros de síndrome de Stevens-Johnson e vesículas bolhosas.

POSOLOGIA E ADMINISTRAÇÃO:

Dose usual para adultos: 5 - 40 mg/dia. Dose máxima recomendada: 100 mg/dia.

A terapia com LONITEN (minoxidil) pode ser iniciada com dose única ou dividida (duas vezes ao dia). Se a pressão diastólica supina deve ser reduzida menos que 30 mmHg, a medicação deve ser administrada apenas uma vez ao dia; se a pressão diastólica supina necessita ser reduzida mais que 30 mmHg, a dose diária deve ser dividida em duas partes iguais.

A dose deve ser ajustada cuidadosamente de acordo com a resposta individual. Os intervalos entre os ajustes de dose normalmente devem ser de pelo menos 3 dias, pois não se obtém resposta integral a uma dada dose em período mais curto. Quando for necessário um controle mais rápido da hipertensão, os ajustes de dose podem ser feitos a cada 6 horas, se o paciente for cuidadosamente monitorado.

A dose pode ser menor em pacientes sob diálise crônica.

Antes da administração de LONITEN (minoxidil), recomenda-se que a terapia anti-hipertensiva seja ajustada a um regime consistindo de diurético e bloqueador beta-adrenérgico. Quando outros supressores do sistema nervoso simpático forem usados, a dose inicial do produto deve ser reduzida.

Pacientes acima de 12 anos: A dose inicial recomendada é de 5 mg como dose única diária. Se necessário, a dose pode ser aumentada, gradativamente, com três dias de intervalo, para 10 mg, 20 mg e mais tarde para 40 mg/dia em dose única ou dividida (2 vezes ao dia), até o ótimo controle da pressão arterial. A dose usual efetiva varia de 10 a 40 mg ao dia. A dose máxima recomendada é de 100 mg ao dia.

Pacientes até 12 anos: Deve-se levar em conta que a experiência em crianças ainda é limitada. As recomendações a seguir podem ser consideradas apenas uma sugestão para o tratamento e é fundamental um cuidadoso ajuste individual da dose.

A dose inicial recomendada é de 0,2 mg/kg de minoxidil em dose única diária. A dose pode ser aumentada de 0,1 a 0,2 mg/kg/dia, com três dias de intervalo, até se atingir o ótimo controle da pressão arterial. A faixa usual de tratamento é de 0,25 a 1,0 mg/kg/dia. A dose máxima recomendada é de 50 mg/dia.

TERAPIA CONCOMITANTE:

Diurese:

LONITEN (minoxidil) deve ser administrado em conjunto com um diurético adequado em todos os pacientes que não estejam sob diálise. Quando houver retenção excessiva de água, resultando em aumento de peso superior a 1,0 - 1,5 kg, estando o paciente sob tiazida ou clortalidona, deve-se adicionar espironolactona ao esquema terapêutico, ou mudar a medicação para furosemida.

Supressores do sistema nervoso simpático:

É também necessária para muitos pacientes a administração concomitante de um supressor do sistema nervoso simpático, para limitar o aumento da frequência cardíaca induzido por LONITEN (minoxidil), e o agente preferido é o beta-bloqueador. A dose do beta-bloqueador deve ser equivalente a 80 - 160 mg de propanolol por dia, para adultos, em doses divididas. Se forem contra-indicados os beta-bloqueadores, pode ser utilizado metildopa na dose de 250 mg a 750 mg duas vezes ao dia, mas deve-se iniciar sua administração pelo menos 24 horas antes do início da terapia com LONITEN (minoxidil). Tipicamente, os pacientes que recebem um beta-bloqueador no início da terapia sofrem bradicardia e pode-se esperar um aumento na taxa cardíaca quando se adiciona o minoxidil ao esquema terapêutico. É necessário um cuidado especial no ajuste da dose do beta-bloqueador ou de outro supressor do sistema nervoso simpático para a obtenção do máximo de segurança e eficácia.

SUPERDOSAGEM:

Hipotensão resultante da administração de minoxidil tem sido relatada em casos raros. Se houver hipotensão exagerada, esta, muito provavelmente, ocorrerá em associação com o bloqueio residual prévio do sistema nervoso simpático (efeitos semelhantes aos da guanetidina ou bloqueio alfa-adrenérgico). O tratamento recomendado é a administração intravenosa de solução salina normal.

Devem ser evitadas as drogas simpaticomiméticas, tais como norepinefrina e epinefrina, por estimularem excessivamente a função cardíaca. A fenilefrina, a angiotensina II e a vasopressina, que revertem os efeitos de LONITEN (minoxidil), devem somente ser usadas quando for evidente a perfusão inadequada de um órgão vital.

Registro nº MS - 1.2389.0007

Responsável Técnica:

Farm. Bioq. Dra. F. Cutrupi - CRFSP 7.562

Fabricado por: Rhodia Farma Ltda.

Av. das Nações Unidas, 22.428 - São Paulo, SP
CNPJ 60.633.328/0001-77 - Indústria Brasileira

Distribuído por: PHARMACIA & UPJOHN LTDA.

Av. das Nações Unidas, 12.995 - 4º Andar - São Paulo - SP
CNPJ 71.699.490/0001-04

SAC - Serviço de Atendimento ao Consumidor
Fone: 0800-550504

Sob licença de:
Pharmacia & Upjohn Co - EUA

VENDA SOB PRESCRIÇÃO MÉDICA.

Nº DE LOTE, DATA DE FABRICAÇÃO E VALIDADE: Vide cartucho.