



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
INSTITUTO DE QUÍMICA
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA ANALÍTICA

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

**“ MÉTODO CINÉTICO PARA A DETERMINAÇÃO
QUANTITATIVA DE α - METILDOPA EM PREPARAÇÕES
FARMACÊUTICAS ”**

Autor: DÉBORA CRISTINA DALLA VILLA BATISTA

Orientador: Prof. Dr. Matthieu Tubino

Co-orientador: Prof. Dr. José Augusto Rosário Rodrigues

CAMPINAS / 2004

UNIDADE	BC
CHAMADA	Tubino
EX	
OMBO BC	61793
ROC.	16-86-05
C	☐
D	☒
REÇO	11.05
ATA	10-2-05
CPD	

bibid: 342269

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE QUÍMICA
UNICAMP**

B32m

Batista, Débora Cristina Dalla Villa.

Método cinético para determinação quantitativa de α - metildopa em preparações farmacêuticas / Débora Cristina Dalla Villa Batista. -- Campinas, SP: [s.n], 2004.

Orientador: Matthieu Tubino.

Co-orientador: José Augusto Rosário Rodrigues.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Química.

1. Método cinético. 2. α - metildopa.
3. Determinação. I. Tubino, Matthieu. II. Rodrigues, José Augusto Rosário. II. Universidade Estadual de Campinas. III. Título.

AGRADECIMENTOS

Aos amigos e grandes companheiros de uma universidade de grande prestígio e de muita exuberância, que só quem está inserido nela é que consegue apreciar. É na UNICAMP que pude enriquecer meus conhecimentos e seguir adiante.

Quero agradecer primeiramente a Deus, que me deu oportunidade de seguir um caminho que só Ele sabia onde seria o fim.

Ao meu marido Juliano, pelo apoio desde o início, e suportando as faltas e horas em frente ao computador. Tudo pelo meu filho Pedro Henrique, minha razão para caminhar adiante. Aos meus pais Valter e Fátima pelo alicerce por toda a vida. Aos meus sogros Antonio e Janete pela ajuda em muitos momentos. Também agradeço ao meu irmão Leandro pelo companheirismo.

Aos professores da UNICAMP, que ministraram as disciplinas que cursei ao longo do curso, e especialmente ao Prof. Dr. José Augusto pela co-orientação. Gostaria de agradecer especialmente à Acácia, pelo auxílio dentro do laboratório tendo total confiança e amizade.

Por fim agradeço ao meu orientador Prof. Dr. Matthieu Tubino pela compreensão e grande conhecimento demonstrado.

CURRICULUM VITAE

As disciplinas cursadas pelo aluno encontram-se abaixo.

2º Semestre de 2001: QP 268 – Planejamento e Otimização de Experimentos.

1º Semestre de 2002: QP 313 – Métodos Espectroquímicos de Análise.

2º Semestre de 2002: QP 215 – Métodos Cromatográficos de Separação.

FORMAÇÃO ACADÊMICA

- Graduação em Farmácia pela Escola de Farmácia e Odontologia de Alfenas (EFOA) em jul/2000.
- Especialização em Farmácia Industrial pela EFOA, concluída em jul/2001.
- Realizando (2004) o curso de Programa de Formação Pedagógica de Docentes – Habilitação em Química – Instituto Maria Imaculada.

ATIVIDADES ACADÊMICAS

- Estágio na MEDLEY Indústria Farmacêutica Ltda. – Campinas/SP Período: 01/2001 a jun/2001, no setor de desenvolvimento analítico. Carga horária: 800 horas.
- Estágio curricular na Farmácia-Escola da EFOA e ambulatório do SUS – Alfenas/MG. Atividades: atendimento ao público, controle de medicamentos da portaria 344, dispensação de medicamentos, manipulação de cápsulas, cremes, loções, xaropes, cosméticos. Período: 10/08 a 30/11/1999 e 14/03 a 23/06/2000. Carga horária: 165 horas.
- Apresentação do trabalho “Determinação de Ferro Total e Cádmio em Amostras de Água do Córrego do Pântano” em painel no XL Congresso Brasileiro de Química em 23 a 26 de out/2000 em Recife (PE).
- Apresentação do trabalho “Determinação de Ferro Total e Cádmio em Amostras de Água do Córrego do Pântano” oral e em painel na 6ª Jornada de Iniciação Científica de Alfenas – 14 a 16 de jun/2000.

- Apresentação do trabalho "Determinação de Pb(II) em Loções Capilares" em painel no 10º Encontro Nacional de Química Analítica em Santa Maria (RS) – 31 de ago a 03 de set/1999.
- Apresentação do trabalho "Nova Metodologia para Determinação de Chumbo" oral e em painel no I Congresso Científico da EFOA – 18 a 22 ago/1999.
- Apresentação do trabalho "A New Method for Determination of Lead" em painel no III Simpósio y Exposición de la Sección de América Latina y el Caribe de la AOAC International – Chile – 02 a 06 de ago/1999.
- Apresentação do trabalho "Método Cinético para a determinação de α -metildopa em medicamentos" em painel na 27ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química – 30 de maio a 02 de jun/2004.

EXPERIÊNCIA PROFISSIONAL

- Analista de desenvolvimento analítico na Medley Indústria Farmacêutica S/A de jan/2001 a abril/2003. Principais atividades: desenvolvimento de métodos analíticos por HPLC e espectrofotometria para testes de teor e dissolução de produtos farmacêuticos com aplicação em controle de qualidade; contatos com fornecedores de matérias-primas; realização de validação de métodos analíticos de testes de teor e dissolução com elaboração de protocolo e relatório; realização de equivalência farmacêutica para produtos genéricos com elaboração de protocolo e certificados de análise.
- Desde maio/2003: farmacêutica da Prefeitura Municipal de Piracicaba. Principais atividades: dispensação de medicamentos, assistência farmacêutica, controle de estoque de medicamentos.

RESUMO

“MÉTODO CINÉTICO PARA A DETERMINAÇÃO QUANTITATIVA DE α -METILDOPA EM PREPARAÇÕES FARMACÊUTICAS”

Aluno: Débora Cristina Dalla Villa Batista

Orientador: Prof. Dr. Matthieu Tubino

A α -metildopa é um fármaco com propriedade anti-hipertensiva, bastante utilizado e de primeira escolha nos casos de hipertensão durante a gravidez. Sobre o seu mecanismo de ação no organismo, apesar de vários estudos, ainda não está comprovado. Sabe-se que α -metildopa é descarboxilada pela enzima dopadescarboxilase, e convertida até α -metilnoradrenalina, substituindo a noradrenalina, como um falso neuro-transmissor, impedindo a ação da noradrenalina e reduzindo a pressão sanguínea. No presente trabalho foi realizado um estudo sobre a farmacologia de α -metildopa e também sobre os processos de síntese com os mecanismos das reações envolvidas. A forma racêmica da α -metildopa foi sintetizada pela primeira vez por Pfister e colab., em 1955, o que exigiu que fossem desenvolvidos procedimentos para a resolução ótica da α -metildopa, pois somente o isômero levógeno é farmacologicamente ativo.

Na literatura há vários métodos para a determinação de α -metildopa em preparações farmacêuticas. Neste trabalho foi realizado um levantamento destes métodos e descrito o procedimento experimental para cada um. Também propõe-se um método cinético com detecção espectrofotométrica baseado na reação de α -metildopa com íons férricos, estes inicialmente complexados com ácido salicílico. A reação é monitorada num comprimento de onda de 525 nm. Para comparação foi utilizado um método espectrofotométrico de referência contido nas farmacopéias dos Estados Unidos (USP) e Brasileira.

ABSTRACT

“KINETIC METHOD FOR THE QUANTITATIVE DETERMINATION OF α -METHYLDOPA IN PHARMACEUTICS PREPARATIONS”

Author: Débora Cristina Dalla Villa Batista

Adviser: Prof. Dr. Matthieu Tubino

α -Methyldopa is a substance with anti-hypertensive property which is frequently used and is the first choice in the hypertension during pregnancy. Despite various studies, its mechanism of action in organisms has not been established yet. α -Methyldopa is known to be decarboxylated by the enzyme dopadecarboxylase, and converted to α -methylnoradrenaline, substituting noradrenaline, as a false neurotransmitter, which hinders the action of the noradrenaline and reduces blood pressure. In the present work a study on the pharmacology of α -methyldopa and also on the synthesis and the mechanisms of the reactions involved were carried out. The racemic structure of α -methyldopa was synthesized for first time by Pfister et al. in 1955. It was necessary to develop a procedure for the optical resolution of α -methyldopa, because only the levogero isomer is pharmacologically active.

Various methods for the determination of α -methyldopa in pharmaceuticals preparations are described in the literature. In this work, a survey of these methods together with the experimental procedure used for each method is presented. Also, a kinetic method based on spectrophotometric monitoring of the reaction of α -methyldopa with iron (III), which is initially complexed with salicylic acid is proposed. The reaction is monitored at 525 nm. The method was compared with standard spectrophotometric method of the United States Pharmacopoeia (USP) and Brazilian Pharmacopoeia.

SUMÁRIO

Capítulo I – OBJETIVOS.....	1
Capítulo II – INTRODUÇÃO.....	1
1. Farmacologia de α -metildopa.....	4
1.1. Testes “in vivo” para verificar a ação de α -metildopa no organismo.....	5
1.2. O que se conclui sobre a α -metildopa na década de 1990.....	20
1.3. Ação de α -metildopa sobre hipertrofia ventricular esquerda.....	22
1.4. Metabolismo de α -metildopa no organismo e interferências devido ao uso concomitante com sulfatos e ferro.....	22
1.5. O uso de α -metildopa durante a gravidez.....	25
1.6. Farmacocinética de α -metildopa.....	27
1.7. Referências Bibliográficas sobre a farmacologia de α -metildopa.....	28
2. Síntese de α -metildopa.....	31
2.1. Referências Bibliográficas sobre a síntese de α -metildopa.....	77
3. Determinação de α -metildopa – Métodos de Análise	78
3.1. Testes colorimétricos para identificação de α -metildopa.....	80
3.2. Testes cromatográficos para identificação e quantificação de α -metildopa.....	81
3.3. Técnicas espectrofotométricas para identificação e quantificação de α -metildopa.....	87
3.4. Técnicas titulométricas para quantificação de α -metildopa.....	96
3.5. Técnica potenciométrica para quantificação de α -metildopa.....	97
3.6. Teste de dissolução de comprimidos de α -metildopa.....	98

3.7. Procedimento experimental de métodos de determinação de α -metildopa.....	98
3.8. Referências Bibliográficas sobre a análise de α -metildopa.....	126

Capítulo III – PARTE EXPERIMENTAL

1. Material.....	129
2. Procedimento do método proposto para determinação de α -metildopa.....	129
3. Método padrão para análise do padrão de α -metildopa.....	130
4. Método de referência para análise dos comprimidos de α -metildopa.....	131

Capítulo IV – RESULTADOS E DISCUSSÃO

1. Estudo do comprimento de onda a ser utilizado no método proposto.....	132
2. Curva-padrão segundo o método proposto.....	132
3. Estudo da influência da concentração de HCl.....	134
4. Estudo da influência da temperatura.....	136
5. Verificação da pureza do padrão secundário de α -metildopa utilizado.....	137
6. Aplicação do método cinético proposto.....	138

Capítulo V – CONCLUSÕES.....	140
------------------------------	-----

Capítulo VI – PERSPECTIVAS.....	141
---------------------------------	-----

CAPÍTULO I - OBJETIVOS

→ Realizar uma revisão bibliográfica sobre a síntese de α -metildopa, com estudo sobre o mecanismo das reações envolvidas;

→ Levantar o histórico da farmacologia da droga e seus parâmetros farmacocinéticos e farmacodinâmicos.

→ Realizar uma busca dos métodos analíticos já desenvolvidos para determinação de α -metildopa em comprimidos, com descrição do procedimento experimental de algumas técnicas.

→ Em adição aos objetivos acima citados objetivou-se o desenvolvimento de um método analítico quantitativo cinético para determinação de α -metildopa em formulações farmacêuticas comerciais, com detecção espectrofotométrica.

CAPÍTULO II – INTRODUÇÃO

(L)- α -metildopa é um fármaco anti-hipertensivo, que surgiu no mercado na década de 1960 com o nome de “Aldomet”, e é amplamente utilizado nos dias de hoje, e de primeira escolha nos casos de hipertensão durante a gravidez (Guenç e colab., 2000; Patrick e colab., 2001).

A forma racêmica de α -metildopa foi sintetizada pela primeira vez por Pfister e colab., em 1955, o que exigiu que fossem desenvolvidas sínteses para resolução ótica de α -metildopa, pois somente o isômero levógiro seria farmacologicamente ativo (Tristam e colab., 1964).

A síntese de α -metildopa foi baseada na estrutura química da substância endógena dopa (Figura 1), uma precursora da substância noradrenalina, cuja função é atuar nas terminações nervosas e promover vasoconstrição. Com um

grupo metila a mais que dopa, α -metildopa foi sintetizada e posteriormente estudada com o objetivo de testar sua atividade farmacológica.

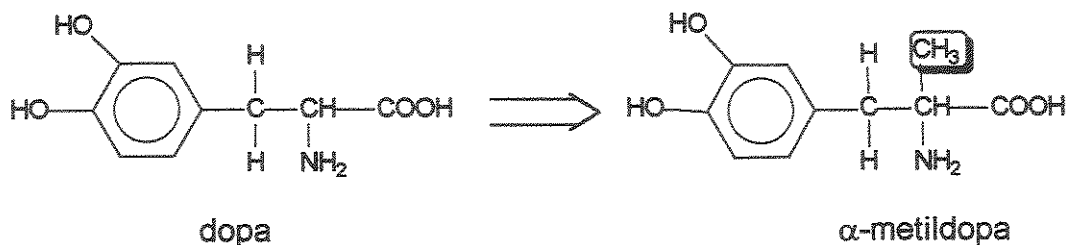


Figura 1. Fórmulas estruturais de dopa e α -metildopa

A Figura 2 indica a fórmula estrutural de α -metildopa (Massa molar = 238,24 g mol⁻¹ na forma sesquidratada; 211,22 g mol⁻¹ na forma anidra) e também sua fórmula molecular. Seu nome é 3-hidroxi- α -metilLtirosina; L- α -3-(3,4-dihidroxifenil)-2-metilalanina; L- α -metil-3,4-dihidroxifenilalanina; ácido L-2-amino-2-metil-3-(3,4-dihidroxifenil) propiônico (The Index Merck, 2001).

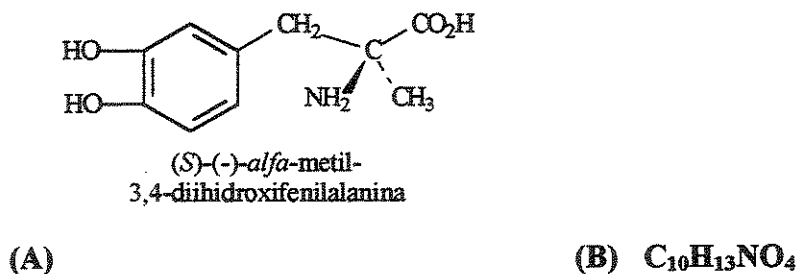


Figura 2. Fórmula estrutural (A) e molecular (B) de α -metildopa

Inicialmente estudou-se a ação de α -metildopa como inibidora da enzima dopadescarboxilase, responsável pela conversão de α -metildopa a α -metildopamina, precursora da noradrenalina. E assim α -metildopa impedia a formação de noradrenalina. Mas estudos posteriores mostraram que α -metildopa também era descarboxilada pela enzima dopadescarboxilase, e convertida até α -metilnoradrenalina, substituindo a noradrenalina, como um falso-transmissor, impedindo a ação da noradrenalina e reduzindo a pressão sanguínea. A Figura 3,

segundo Patrick (2001), indica a conversão de α -metildopa até α -metilnoradrenalina.

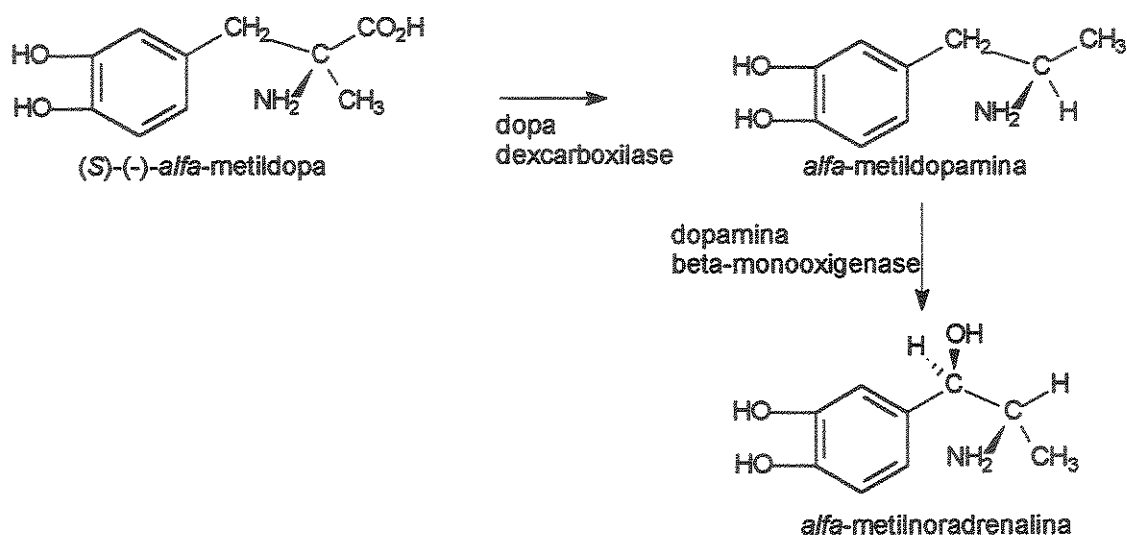


Figura 3. Conversão de α -metildopa até α -metilnoradrenalina

Segundo Bayliss & Harvey-Smith, a α -metildopa tem uma ação periférica mediada pelo sistema nervoso central. Isso foi inicialmente verificado devido à sonolência que α -metildopa provocava nos pacientes.

A forma farmacêutica encontrada para utilização de α -metildopa é comprimido. Há vários métodos de análise para quantificação de α -metildopa, dentre eles, a titulação (Farmacopéia Brasileira, 1996; USP 25, 2002; European Pharmacopoeia, 2002; Phatak e colab., 1982; Salem, 1987), espectrofotometria (USP 25, 2002; Farmacopéia Brasileira, 1996; (Berzas e colab., 1997; Issopoulos, 1990; Vieira & Fatibello, 1998; Nevado e colab., 1995; Helaleh e colab., 1997; Walash e colab., 1985), potenciometria (Athanasiousmalaki & Koupparis, 1984), cromatografia líquida de alta eficiência (Gelber & Neumeyer, 1983; Official Methods of Analysis of the Association of official Analytical Chemists, 1990; Metwally & Belal, 1992; Oliveira e colab., 2002; Rona e colab., 1996). Segundo Os métodos cinéticos com detecção espectrofotométrica são escassos para determinação de α -metildopa (Helaleh e colab., 1998; Milovanovic e colab., 1981).

No presente trabalho foi proposto um método cinético com detecção espectrofotométrica baseado na reação de α -metildopa com íons férricos inicialmente complexados com ácido salicílico.

1. FARMACOLOGIA DE α -METILDOPA

A α -metildopa é um fármaco anti-hipertensivo que surgiu de um planejamento racional, ou seja, baseado em conhecimentos do local e mecanismo de ação no organismo e interação fármaco-receptor (Korolkovas & Burckhalter, 1982). A α -metildopa foi introduzida como inibidor da enzima dopadescarboxilase (Sourkes, 1954), e seu desenvolvimento ocorreu através de uma substituição isostérica na molécula de dopa, substrato da enzima. Houve substituição do átomo de hidrogênio ligado ao carbono alfa da dopa por um grupo volumoso, o metílico.

Sourkes em 1954 pesquisou a atividade de α -metildopa de inibir a enzima dopadescarboxilase, e assim permitir o início de uma relação de α -metildopa com suas propriedades anti-hipertensivas (Oates e colab., 1960). Na verdade, Sourkes realizou experimentos "in vitro" que caracterizaram uma ação bifásica de α -metildopa, ou seja, a uma concentração em torno de 10^{-3} mol/L de α -metildopa, a enzima é inibida completamente, e com baixas concentrações (10^{-7} a 10^{-5} mol/L) a enzima é ativada. As misturas para a determinação da atividade enzimática de dopadescarboxilase consistiam de uma quantidade de substrato *dl*-dopa resultando numa concentração de 0,004 mol/L, 200 mg de extrato renal como fonte enzimática, e determinadas quantias (10^{-6} a 10^{-3} mol/L) do possível inibidor *dl*- α -metildopa. O extrato renal foi fortalecido com excesso de fosfato de piridoxal, que além de ser uma coenzima favorecendo a atividade de dopadescarboxilase, também, comprovado por experimentos, reage não enzimaticamente com dopa e com α -metildopa, com esta última numa proporção bem menor. Um experimento revelou que numa concentração até 10^{-4} mol/L de dopa, todo fosfato de piridoxal reage com dopa e o produto final não exerce efeito inibitório na atividade de dopadescarboxilase. Apesar da utilização de uma mistura de isômeros *D*- e *L*- de

dopa, Sourkes declarou que somente o isômero *L*- é descarboxilado. Com o experimento a inibição enzimática correspondeu a 71% com $1,0 \times 10^{-4}$ mol/L de α -metildopa, e a 98% com uma concentração de $5,0 \times 10^{-5}$ mol/L.

Segundo Sourkes, por outro lado, o mecanismo da ativação enzimática não está claro. Como α -metildopa também reage, numa velocidade menor do que dopa, com a coenzima fosfato de piridoxal, pode-se explicar porque baixas quantidades de α -metildopa ativam a dopadescarboxilase e concentrações maiores a inibem. Quanto mais α -metildopa há na mistura, menos coenzima terá para se ligar com a enzima, e a taxa de descarboxilação é diminuída. Ao contrário, quanto menos α -metildopa, mais coenzima fosfato de piridoxal há para aumentar a atividade de dopadescarboxilase. Mas Sourkes tentou demonstrar que α -metildopa não inibe devido à combinação com fosfato de piridoxal: a taxa de combinação não é suficientemente rápida, exceto para concentrações em torno de 10^{-3} mol/L de α -metildopa, para remover quantias significativas de coenzima da descarboxilase; a inibição persiste até mesmo na presença de alta concentração de fosfato de piridoxal; a quantia de fosfato de piridoxal que sobra na mistura de reação depois do experimento de inibição é independente da concentração do inibidor.

1.1. Testes “in vivo” para verificar a ação de α -metildopa no organismo

Oates e colab. associaram a ação inibitória da enzima *L*-aminoácido-aromático descarboxilase no homem por ação de *dl*- α -metildopa e conseqüente redução da biossíntese das aminas serotonina, triptamina e tiramina com redução da pressão sanguínea em pacientes hipertensos. O efeito sedativo transitório interligou o papel das aminas na função cerebral. Nos experimentos α -metildopa foi administrada em pacientes hipertensos, oralmente, em períodos de 7 a 28 dias, inicialmente com dose única de 2,0 a 6,0 g por dia, e depois em intervalos de 8 horas. Verificaram que a redução da pressão na posição ereta ocorreu em todos

os casos, e foi maioria na posição deitada. Sintomas como sedação, tranquilidade ou fadiga foram observados por um período de 24 a 72 horas após início do tratamento com α -metildopa e duraram no máximo 72 horas.

Para comprovar a ação inibitória da enzima *L*-aminoácido-aromático descarboxilase por *dl*- α -metildopa, foi investigada a descarboxilação dos aminoácidos 5-hidroxitriptofano, tirosina e triptofano através de análise das respectivas aminas serotonina, tiramina e triptamina, na urina dos pacientes. Primeiramente os pacientes receberam o aminoácido precursor. Após coletas das urinas, que ocorreram por 8 horas, os pacientes receberam α -metildopa em doses de 2 g diariamente por dois dias. Duas horas após a última dose, os pacientes receberam novamente os aminoácidos e urinas foram novamente coletadas. De acordo com os resultados o teor das aminas presentes nas urinas, após administração de α -metildopa, diminuiu (Oates e colab., 1960).

Mas essa diminuição pode ter ocorrido porque a própria α -metildopa pode estar sendo descarboxilada pela enzima, como mostraram Porter & Titus num teste "in vivo" em ratos através da detecção de $C^{14}O_2$ no ar expirado após administração de α -metildopa-carboxil- C^{14} e da excreção urinária de α -metildopamina após administração de α -metildopa. Foi mostrado que α -metildopa é um substrato para a enzima descarboxilase embora seja consideravelmente menos descarboxilada "in vitro" do que dopa (cerca de 1/100) (Stone & Porter, 1967).

Até então acreditava-se que *dl*- α -metildopa era um potente inibidor da enzima dopadecarboxilase e agia como antihipertensivo porque impedia a formação de noradrenalina (Cannon e colab., 1962).

Mais um experimento foi realizado para verificar o efeito de *dl*- α -metildopa contra a hipertensão avançada e maligna (Cannon e colab., 1962). Os pacientes com pressão sanguínea alta e complicações renais ou retiniais evidentes foram classificados como hipertensão avançada, enquanto que os hipertensos com papiledema como hipertensão maligna. A medicação foi administrada oralmente em doses de 0,25 a 8,0 g por dia distribuídas em 2 a 4 vezes. Dos 33 pacientes, 31 apresentaram queda da pressão arterial na posição deitado, e mais

marcadamente na posição ereta. Os dois pacientes que não apresentaram queda tinham sofrido simpatectomia toracolombar bilateral (retirada de alguns nervos simpáticos desta região da coluna vertebral), e assim não responderam à droga. A ação foi geralmente lenta e ocorreu após 2 a 4 horas com duração de 6 a 8 horas. Em alguns pacientes a ação máxima ocorreu após o segundo dia de tratamento. Segundo Cannon e colab., a presença de insuficiência renal grave influencia na resposta à α -metildopa em pacientes sensíveis à esta droga, pois indivíduos sofrem avanços na insuficiência renal com o uso de α -metildopa, e isso foi verificado por haver retardamento da excreção renal da droga. Oito dos doze indivíduos com hipertensão maligna morreram em uremia (intoxicação resultante de insuficiência renal), durante o tratamento, indicando que α -metildopa deve ser administrada em doses bem menores para este tipo de paciente. Casos de tolerância à droga foram relatados, um com hipertensão grave após 7 meses de tratamento e o outro com hipertensão maligna após 11 meses de terapia, e, com isso, as doses tiveram que ser aumentadas. A tolerância significa que a dose utilizada da droga não está sendo suficiente para desencadear uma ação farmacológica.

Neste artigo foi relatado que a excreção urinária do maior metabólito de noradrenalina e adrenalina, que é o ácido 3-metoxi-4-hidroxi-mandélico, deveria diminuir com o uso de α -metildopa, já que esta é uma inibidora da dopadescarboxilase impedindo a produção de noradrenalina e adrenalina. No entanto verificaram que não houve redução gritante na excreção deste metabólito, não obtendo evidências de que o efeito farmacológico da droga no homem seja devido à inibição da síntese de noradrenalina. Além disso, análogos de α -metildopa, que "in vitro" possuem atividade muito grande de inibição da enzima decarboxilase, apresentaram pouca ação antihipertensiva em estudos com humanos (Cannon e colab., 1962; Hardman & Limbird, 1996). Segundo Stone & Porter (1967), a inibição da dopadescarboxilase por α -metildopa não é suficiente para produzir a redução de concentração de noradrenalina tecidual.

Talvez, o composto apresente outro mecanismo de ação, como fazer parte do sistema de biossíntese e ser convertido em outra substância, tais como

α -metildopamina ou α -metilnoradrenalina. Talvez, possa também modificar a estocagem, liberação, ou atividade da noradrenalina endógena (Cannon e colab., 1962).

A noradrenalina existe em maior quantidade do que a adrenalina nas terminações nervosas e possui ação vasoconstritora com pouco efeito sobre o coração. Portanto, um controle na produção ou liberação de noradrenalina pode resultar num controle da pressão sanguínea alta. Com isso Pfister e colab. testaram derivados da dopa, como α -metildopa, que poderiam interferir competitivamente com a biossíntese de noradrenalina.

A biossíntese resultando na adrenalina envolve várias etapas, como mostra a Figura 4 (Hardman & Limbird, 1996):

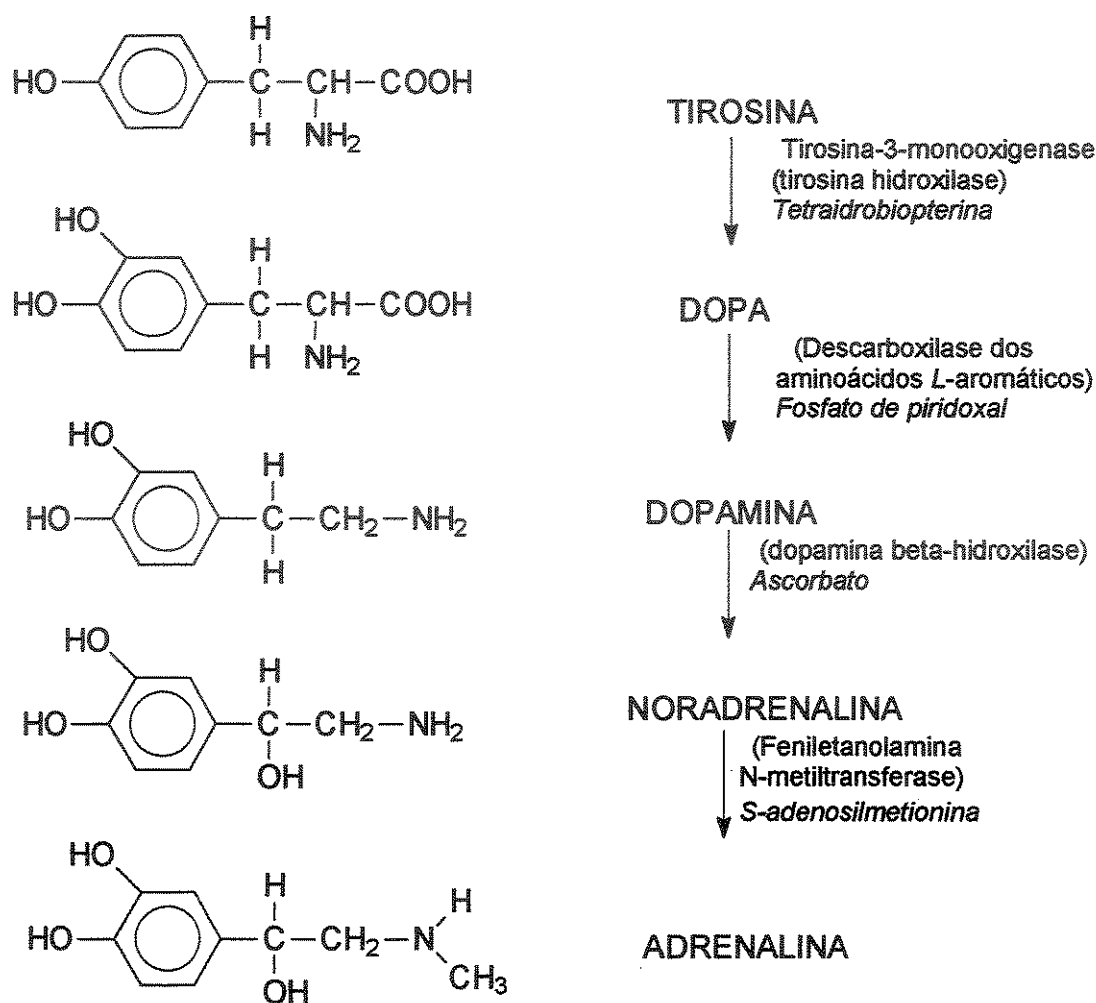


Figura 4. Etapas da biossíntese enzimática da dopamina, noradrenalina e adrenalina

A hidroxilação da tirosina é ativada após estimulação dos nervos adrenérgicos ou medula supra-renal. Dopa é formada e sofre ação da enzima dopadescarboxilase resultando na dopamina. Estas duas etapas ocorrem no citoplasma das células nervosas. Em seguida, a dopamina é transportada para vesículas de armazenamento contendo a enzima dopamina β -hidroxilase, produzindo a noradrenalina. É na medula supra-renal que a noradrenalina armazenada nas vesículas das células sai dessas vesículas, é metilada à adrenalina no citoplasma pela enzima feniletanolamina-*N*-metiltransferase, e a

adrenalina produzida retorna às vesículas até que seja liberada. Nos adultos, a adrenalina constitui cerca de 80% das catecolaminas da medula supra-renal. Por outro lado, as células que não possuem a enzima feniletanolamina-*N*-metiltransferase permanecem com as vesículas armazenando noradrenalina.

Outro estudo com humanos foi relatado, em que pacientes hipertensos receberam α -metildopa em doses iniciais de 250 mg (Bayllis & Harvey-Smith, 1962). Dos vinte pacientes, somente um, que apresentava hipertensão maligna, não apresentou resposta satisfatória com o medicamento. Quatro pacientes desenvolveram resistência e tiveram as doses aumentadas da droga. Neste artigo foram apresentadas algumas vantagens de α -metildopa:

- Reduz a pressão sanguínea tanto na posição deitada quanto na ereta;
- Não provoca, normalmente, o incômodo de uma hipertensão postural sintomática, e nem faz a pressão sanguínea cair excessivamente sob esforço;
- Quando a resposta é satisfatória, é estável e não associada com flutuações repentinas na pressão sanguínea;

Com isso α -metildopa é usada com muito sucesso em casos de isquemia cardíaca e hipertensão (Bayllis & Harvey-Smith, 1962).

Mas também a α -metildopa apresentou desvantagens como:

- Não apresentou efeito significativo em um paciente com hipertensão maligna, mesmo aumentando a dose;
- Alguns pacientes apresentaram tolerância à droga, visto que o início do tratamento foi satisfatório;
- Sonolência foi apresentada pela maioria dos pacientes, principalmente nos primeiros dias de tratamento e quando a dose era aumentada;
- Uma outra desvantagem é a quantidade de doses que devem ser administradas por dia, que chegam a ser de 3 a 4 vezes, e necessitando em alguns casos de um diurético (Bayllis & Harvey-Smith, 1962).

Sobre o modo de ação de α -metildopa, ainda não estava claro até início de 1960. A bradicardia e a hipotensão postural em alguns casos sugeriam bloqueio dos impulsos simpáticos. Em animais, a inibição da descarboxilação é somente

temporária após uma única dose de α -metildopa, e no entanto, a noradrenalina estocada nos tecidos permanece esgotada por vários dias (Bayllis & Harvey-Smith, 1962). Nesse caso, indica que poderia haver outra substância no lugar da noradrenalina.

A sonolência desenvolvida em muitos pacientes sugere que a α -metildopa tenha ação central. Porém, é uma sonolência temporária com um efeito hipotensor contínuo (Bayllis & Harvey-Smith, 1962). Foi afirmado que a perda de catecolaminas cerebrais não é a causa da sedação apresentada. A ação sedativa de α -metildopa já foi utilizada em tratamento de esquizofrenia, com redução dos sintomas, mas com aumento no índice de depressão (Sourkes, 1965).

Em 1963 foi declarado que a atividade hipotensora de 3-(3,4-dihidroxifenil)-2-metilalanina (α -metildopa) residia no isômero ótico com a rotação negativa, $[\alpha]_D^{25} -4^\circ$ (c 2, HCl 0,1 mol/L) (Tristram e colab., 1963). E *L*- α -metildopa foi introduzida na terapêutica com o nome de "Aldomet".

Também em 1963, tentaram explicar o modo de ação de α -metildopa no alívio da hipertensão. De acordo com Day & Rand, é evidente que esta droga pode ser o precursor de α -metilnoradrenalina no corpo, e esta ser estocada nos locais de armazenamento de noradrenalina e liberada como falso neurotransmissor. Devido à baixa potência de α -metilnoradrenalina há uma perda de resposta com a estimulação do nervo simpático, que pode explicar a queda de pressão sanguínea em pacientes hipertensos. Foi demonstrado, "in vitro" e "in vivo", que α -metildopa é descarboxilada produzindo α -metildopamina, e que provavelmente é possível que a enzima β -oxidase a converta a α -metilnoradrenalina. Além disso, foram determinados altos valores de metabólitos 3-metoxila na urina de pacientes sob tratamento com α -metildopa, e estes metabólitos tinham propriedades dos derivados de α -metilnoradrenalina (Day & Rand, 1963).

Smirk realizou outro estudo com pacientes utilizando o isômero levógeno de α -metildopa em doses diárias entre 150 mg a 2,0 g. Havia 19 pacientes e as pressões sistólica e diastólica, para posições tanto deitada quanto ereta,

apresentaram queda após administração de L - α -metildopa. Seis pacientes tiveram suas doses aumentadas devido à tolerância à droga. Sobre efeitos colaterais, distúrbios psiquiátricos ocorreram em alguns casos, como depressão, com descontinuação do tratamento com α -metildopa, pesadelos, inicial sonolência seguida por períodos de insônia.

Mais um estudo em pacientes hipertensos foi realizado com administração oral de "Aldomet" com doses diárias de 250 mg a 4,0 g. Dos pacientes, 12 com hipertensão maligna apresentando alterações na retina com papiloedema, exsudatos e hemorragias, 57 com hipertensão benigna, e 17 com alguma lesão renal. Os resultados mostraram que dentre os pacientes com hipertensão maligna, um morreu com uremia, um parou o tratamento pois apresentava febre há 5 semanas, e os outros dez tiveram a pressão bem controlada. Os pacientes com hipertensão renal apresentaram melhora na pressão arterial, sendo que alguns foram tratados pela combinação com um diurético, potencializando o efeito hipotensivo. Todos os pacientes com hipertensão benigna apresentaram bons resultados com α -metildopa (Hamilton & Kopelman, 1963), e 55% dos pacientes apresentaram tolerância à droga, necessitando de aumento da dose para manter um efeito hipotensivo uniforme.

Sobre efeitos colaterais, a maioria dos pacientes apresentaram sonolência apenas nas primeiras 48 horas de tratamento. Três apresentaram depressão mental, vinte e seis ganharam peso nos dois primeiros meses, e um desenvolveu falha no ventrículo esquerdo melhorando com auxílio de um diurético. A retenção de fluido também foi verificada, podendo, segundo Hamilton & Kopelman, contribuir para o desenvolvimento de tolerância à droga, que ocorreu naqueles pacientes que mostraram aumento de peso, e que pode ser superado com auxílio de diuréticos. Por fim, três pacientes desenvolveram diarreia, que diminuiu com a redução da dosagem diária de α -metildopa.

Em 1963 ainda se buscava uma explicação para o efeito antihipertensivo de L - α -metildopa, pois já estava claro que não era devido à inibição da enzima dopa-descarboxilase. Day observou que em gatos pré-tratados com reserpina, uma substância que destrói as vesículas que armazenam noradrenalina e esta é por

fim degradada, a α -metilnoradrenalina ou seu precursor biológico podiam promover novamente o enchimento dos locais de estocagem de noradrenalina nos tecidos, sendo a α -metilnoradrenalina a amina estocada e conseqüentemente liberada após uma estimulação do nervo simpático. Assim α -metildopa podia causar perda do tônus simpático agindo como precursor de α -metilnoradrenalina que podia funcionar como um transmissor menos eficiente que noradrenalina.

Clementi e colab. demonstraram que α -metildopa não inibia a síntese e armazenagem de adrenalina e noradrenalina na medula adrenal de ratos, pois após destruição de catecolaminas adrenais usando reserpina por três dias, o armazenamento foi totalmente restabelecido em duas semanas mesmo com uma administração contínua de α -metildopa. Esses resultados foram verificados através de observações num microscópio eletrônico dos grânulos de catecolaminas, que talvez correspondessem aos grânulos de α -metilnoradrenalina.

Outro estudo mostra a inabilidade de α -metildopa em bloquear neurônios adrenérgicos em que cachorros pré-tratados com reserpina ou α -metildopa (200 mg/Kg intra-venosamente), recebendo dose de feniletilamina, um potente acelerador cardíaco, mostraram redução desta aceleração num mesmo grau por ambos agentes. Mas após infusão de noradrenalina nestes cães, somente naqueles pré-tratados com reserpina é que houve restabelecimento da resposta à feniletilamina (Stone & Stavorski, 1963). Segundo Hardman & Limbird (1996), foi suposto que aminas atuam indiretamente, após captação nas terminações nervosas adrenérgicas, através do deslocamento da noradrenalina de seus locais de armazenamento nas vesículas sinápticas. A seguir a noradrenalina pode sair da terminação nervosa adrenérgica e interagir com receptores, produzindo seus efeitos simpaticomiméticos. A depleção de reservas teciduais de catecolaminas, que ocorre após tratamento com reserpina ou degeneração das terminações nervosas adrenérgicas, explicaria a ausência de efeito da feniletilamina nessas condições. Assim, pode-se supor a hipótese de Day, pois quem será liberada das vesículas será a α -metilnoradrenalina, que é menos potente.

Em 1964 foi publicado um estudo com α -metildopa administrada intravenosamente em pacientes hipertensos, na quantia de 2 ou 2,5 g (Onesti e colab., 1964), em que a queda da pressão sanguínea foi evidente sugerindo que a droga agiu por relaxamento arteriolar periférico. A resposta hipotensora máxima ocorreu entre 10 e 15 horas após a administração da droga. A ação sobre a frequência cardíaca não apresentou resultados consistentes, pois ora aumentou, ora diminuiu. Verificou-se que a resistência vascular renal diminuiu, sugerindo uma ação favorável de α -metildopa sobre a circulação arterial renal, e a utilização em potencial em pacientes hipertensos com comprometimento renal.

Ingenito e colab. e Ingenito & Procita observaram que introdução intravenosa de α -metildopa não afeta pressão arterial sistêmica, frequência cardíaca e pressão no preparado do membro traseiro de gatos. É muito difícil obter efeito hipotensivo em animais não hipertensos, anestesiados e sob injeção intra-venosa a não ser com doses muito altas de cerca de 200 mg de α -metildopa/kg de peso corpóreo. Pode ocorrer que quantidades significativas da droga tenham sido removidas da circulação antes da quantidade limiar atingir o cérebro.

Além disso, a comprometida utilização de α -metildopa em pacientes com insuficiência renal já havia sido estudada por Cannon e colab.. Cruz e colab. também verificaram diminuição da velocidade de filtração glomerular em pacientes recebendo α -metildopa.

Foi pesquisado também um possível modo de ação de α -metildopa no cérebro. Inicialmente foi verificado que ratos, recebendo *dl*- α -metildopa intraperitonealmente, sofreram uma redução na concentração de noradrenalina e dopamina no cérebro, e foi reconhecido que isso poderia estar ocorrendo não somente pela inibição da descarboxilase mas também relacionado à liberação das aminas armazenadas (Sourkes, 1965). A redução de dopamina cerebral continuou com a efetiva concentração de inibidor de descarboxilase (α -metildopa), durou por 2 a 6 horas e houve rápido restabelecimento de dopamina. Por outro lado o nível de noradrenalina permaneceu reduzido por alguns dias mesmo quando nenhuma α -metildopa havia sido detectada no cérebro (Sourkes, 1965). Segundo Sourkes, a

inibição de dopa descarboxilase não era o modo de ação do ativo α -metildopa, pois um inibidor de descarboxilase, N-(3-hidroxibenzil)-N-metilhidrazina, foi utilizado "in vivo", e ainda permitiu a síntese das aminas dopamina e 5-hidroxitriptamina cerebrais, ao contrário de α -metildopa. Era possível que α -metildopa não agia mantendo a redução dos níveis de noradrenalina, mas como um precursor que, pela ação da enzima descarboxilase, formava α -metildopamina, que como substrato da enzima dopamina- β -oxidase, resultava na formação de α -metilnoradrenalina. Segundo Sourkes a α -metilnoradrenalina age por deslocar noradrenalina cerebral dos locais de armazenamento, e possivelmente também assumindo as suas funções. Estava reconhecido que a inibição de dopadescarboxilase representava o efeito de α -metildopa em diminuir concentrações de serotonina e de dopamina no cérebro, enquanto que o esgotamento de noradrenalina tecidual era causado por metabólitos (aminas) de α -metildopa (Stone & Porter, 1967).

Um efeito hipotensivo periférico da α -metildopa mediado centralmente foi verificado por Ingenito e colab.. A L- α -metildopa foi introduzida, dissolvida em sangue, numa preparação de cérebro de gato, tendo controle neuronal reflexo e/ou vasomotor sobre a circulação corpórea e sobre o membro traseiro vascularmente isolado do gato. Foram medidas a pressão arterial sistêmica e a frequência cardíaca. Ao terminar o experimento, foram retirados o hipotálamo, o meio do cérebro e a medula oblonga, para análise de noradrenalina, α -metildopa e α -metildopamina. Houve queda da pressão arterial sistêmica em 5 a 25 minutos depois que a droga atingiu o cérebro. A queda da frequência cardíaca não tão acentuada quanto a pressão arterial sistêmica, foi certamente mediada via diminuição central de atividade simpática para o coração, pois essas preparações foram vagotomizadas para que certos efeitos reflexos sobre a circulação e respiração fossem evitados. A droga não apresentou efeito sobre a musculatura lisa da circulação cerebral já que não houve alteração na pressão da preparação cerebral. Também após a administração da droga, a resistência vascular do membro traseiro diminuiu 17%. Os níveis de noradrenalina nas partes cerebrais

analisadas foram muito próximos do controle, indicando que não houve esgotamento significativo de noradrenalina cerebral. As determinações de α -metildopamina indicaram níveis detectáveis, de acordo com o método analítico empregado, somente após duas horas da administração de α -metildopa, com maior concentração no hipotálamo, levando a conclusão que o cérebro foi capaz de metabolizar α -metildopa para um "falso transmissor". Desde que não há alterações na noradrenalina cerebral dentro do tempo inicial do efeito hipotensivo mediado centralmente, parece improvável que ocorra esgotamento de noradrenalina ou sua substituição por um falso transmissor (Ingenito e colab., 1970). Mas a hipótese de Day & Rand, em que a hipotensão seria mediada por α -metilnoradrenalina formada metabolicamente da α -metildopa em nervos simpáticos sendo menos ativo que noradrenalina e agindo como falso transmissor, não é descartada, desde que o local de ação seja central.

Ayitey-Smith & Varma a fim de provar que Day & Rand poderiam estar chegando a conclusões incorretas sobre a ação de α -metildopa, que seria através da produção de um falso neurotransmissor simpático fracamente ativo, investigaram alguns aspectos sobre o assunto através de experimentos com ratos normais e imunossimpaticomizados. A α -metildopa foi injetada intraperitonealmente. A hipertensão nos ratos foi provocada pela introdução subcutânea de peletes contendo 40 mg de acetato de desoxicorticosterona e mantendo os ratos sob NaCl 1%. Os ratos imunossimpaticomizados não desenvolveram hipertensão e, no entanto, a dosagem de 200 mg/Kg de α -metildopa baixou a pressão sanguínea. Houve aumento da frequência cardíaca em ambos os grupos de ratos, ao contrário do que ocorreu com Ingenito e colab.. Segundo Ayitey-Smith & Varma, os ratos imunossimpaticomizados não deveriam apresentar queda de pressão arterial se a α -metildopa agisse de acordo com a hipótese do falso neurotransmissor, e talvez a α -metildopa possa agir, com contribuição periférica, reduzindo a resistência vascular sem reduzir o fluxo simpático.

No entanto, a imunossimpatectomia não provoca destruição completa do sistema periférico inteiro. Paynter e colab. observaram que ratos

imunossimpaticomizados exibiram aumento maior sobre a pressão sanguínea sistólica, comparada com ratos normais, após introdução intravenosa de noradrenalina e adrenalina em doses de 0,0625 a 0,5 μ g. Além disso foi declarado também que ratos imunossimpaticomizados tem prejudicada a capacidade para obter vasoconstrição, e que enquanto o animal imunossimpaticomizado é um excelente modelo para estudar a relação entre treinamento físico e alterações nos componentes cardíacos e periféricos do sistema nervoso simpático, a imunossimpatectomia exerce mínima influência sobre níveis de noradrenalina no sistema nervoso central e no tamanho e função da medula adrenal.

O fato de o efeito hipotensivo α -metildopa permanecer em ratos normais mesmo após bloqueio de α -adrenoceptores usando uma droga bloqueadora, revela, segundo Ayitey-Smith & Varma, que α -metildopa não age por bloquear α -adrenoceptores. Mas se α -metildopa age no sistema nervoso central, não haverá influência negativa de algum bloqueador periférico.

Com isso a hipótese de Day & Rand pode ainda prevalecer, sendo que a falso neurotransmissor esteja agindo no sistema nervoso central, e não no sistema nervoso periférico como concluíram Ayitey-Smith & Varma.

Baum e colab. demonstraram a contribuição do sistema nervoso central na resposta hipotensiva de α -metildopa. O experimento utilizou α -metildopa oralmente em doses de 12,5, 25 e 40 mg/kg em ratos com hipertensão renal, e foi analisada a atividade dos nervos do grupo simpático lombar. Quanto maior a dose utilizada, maior foi a queda da pressão sanguínea. A α -metildopa, de acordo com a medida da atividade do nervo, diminuiu o fluxo simpático espontaneamente, a dose alta inibiu o aumento da atividade do nervo provocado tanto pela adição de acetilcolina quanto pela asfixia promovida no experimento.

Até então eram sugeridos mecanismos periféricos e centrais pelo qual a α -metildopa reduzia atividade simpática e pressão sanguínea, embora ainda seja desconhecida a questão sobre qual ação, central ou a periférica, é a mais importante.

Bobik e colab. realizaram um estudo com humanos hipertensos em três tipos de experimentos: recebendo somente 500 mg de α -metildopa oral;

recebendo 500 mg de α -metildopa oral dados 30 minutos após pré-tratamento oral com 14 g de isoleucina, e seguido por mais doses de isoleucina dadas 2 horas (7 g) e 4 horas (5 g) após a dose inicial de isoleucina; recebendo 500 mg de α -metildopa oral mais 200 mg de benserazida e as mesmas doses de isoleucina dadas como no programa anterior. Foi realizado um estudo com placebo para comparações.

A isoleucina é um aminoácido neutro que pode competir com α -metildopa pelo transporte ativo através da barreira hemato-encefálica. E benserazida é uma substância que inibe periféricamente a enzima dopadescarboxilase.

Sobre a farmacocinética de α -metildopa, foram demonstrados os gráficos da biodisponibilidade com tempo após administração versus concentração de α -metildopa no plasma. Nos três casos o tempo de meia-vida foi de duas horas, a isoleucina não afetou a biodisponibilidade de α -metildopa e não há efeito aparente sobre o metabolismo periférico de α -metildopa por dopadescarboxilase, e também benserazida tem pouco efeito sobre a absorção ou eliminação de α -metildopa do plasma.

A excreção urinária, acumulada por um período de 24 horas, de α -metildopamina foi de 72 μmol para α -metildopa sozinha, para adição de isoleucina e α -metildopa foi 68 μmol , para α -metildopa com isoleucina mais benserazida foi 18 μmol . O uso de benserazida a fim de inibir a dopadescarboxilase periférica reduziu significativamente a excreção de α -metildopamina indicando que sua produção foi bastante reduzida.

Também foram medidas a excreção urinária de noradrenalina e seus principais metabólitos (ácido vanililmandélico, 3-hidroxi-4-metoxifeniletlenoglicol, 3,4-dihidroxifeniletlenoglicol e normetadrenalina) apresentando redução de 35% na excreção dos metabólitos após uma única dose de 500 mg de α -metildopa, e noradrenalina e normetadrenalina não tiveram redução significativa. Segundo Bobik e colab. a redução na excreção de metabólitos de noradrenalina (8,9 $\mu\text{mol}/24$ horas) não parece ser uma consequência da substituição de noradrenalina endógena liberada por α -metilnoradrenalina, visto que a excreção

de α -metilnoradrenalina e seu maior metabólito α -metilmetilnoradrenalina totalizou somente 0,86 $\mu\text{mol}/24$ horas após única dose de α -metildopa. A pressão arterial média abaixou após administração de α -metildopa sozinha durando por sete horas, e frequência e volume cardíacos não foram significativamente afetados por de α -metildopa. Então a queda da pressão foi devido, segundo Bobik e colab., à redução na resistência periférica total medida em $\text{mmHg.L}^{-1}.\text{min}^{-1}.\text{m}^{-2}$, efeito que começou com uma hora após a administração de α -metildopa e persistiu por sete horas.

Na administração de isoleucina com α -metildopa, a excreção de noradrenalina e seus metabólitos aumentou para 22,7 $\mu\text{mol}/24$ horas, significando um antagonismo de 90% na redução da excreção de noradrenalina e seus metabólitos. Este antagonismo provavelmente é devido à inibição competitiva pelo transporte de α -metildopa através da barreira hemato-encefálica. Mas isoleucina tem pouco efeito sobre a excreção de α -metilnoradrenalina e de α -metilmetilnoradrenalina, que totalizou 0,85 $\mu\text{mol}/24$ horas. Administração de isoleucina com α -metildopa apresentou menor queda da pressão arterial média e da resistência periférica total, sendo que a pressão na posição deitada tendeu à queda após sete horas da administração de α -metildopa. Esses resultados apóiam a idéia de que grande parte do efeito hipotensivo da α -metildopa é devido à sua ação dentro do sistema nervoso central. E que uma pequena quantidade de α -metildopa tem uma ação periférica visto que os 10% de noradrenalina e metabólitos que são excretados, pode ser devido à inibição da liberação pré-sináptica de noradrenalina.

No caso de benserazida no experimento, houve aumento também na total excreção de noradrenalina e seus metabólitos para 21,3 $\mu\text{mol}/24$ horas, comparado com 16,7 $\mu\text{mol}/24$ horas após α -metildopa sozinha. Houve queda da pressão também após sete horas da dose de α -metildopa, e parte desta queda pareceu ser mediada pela pequena redução na resistência periférica total. O volume cardíaco permaneceu inalterado.

Bobik e colab. inspecionaram sobre os efeitos cardiovasculares de α -metildopa relacionados à noradrenalina e metabólitos como α -metilnoradrenalina em alguns pontos contendo neurônios adrenérgicos da medula espinhal de coelho. Isso porque já era estabelecido que reduções na atividade simpática, pressão sanguínea e frequência cardíaca como conseqüências da administração de α -metildopa eram devido a mecanismos centrais. A α -metildopa foi introduzida ora intracisternalmente (na cisterna magna dentro do sistema nervoso central) ora intravenosamente (veia central do ouvido). Os índices de noradrenalina e de α -metilnoradrenalina foram determinados em cinco áreas contendo grupos de células adrenérgicas dentro do sistema nervoso central. Demonstraram que entre três e oito horas após administração intracisternalmente de α -metildopa, quando os efeitos sobre a pressão sanguínea foram máximos, grande quantidade de α -metilnoradrenalina tinham sido biossintetizadas em três grupos de células adrenérgicas, e quantia de noradrenalina havia reduzido durante este tempo. Numa outra área, o índice de noradrenalina foi transitório, ao passo que na outra não foi afetado, e foi concluído que nessas duas regiões α -metildopa não exerce seus efeitos cardiovasculares.

Notaram que as duas diferentes vias de administração promoveram um metabolismo diferente nos grupos celulares estudados. Por exemplo, na área em que α -metildopa não afetou o índice de noradrenalina pela via intracisterna, pela intravenosa, noradrenalina foi reduzida 70% e α -metilnoradrenalina a maior catecolamina presente.

Acredita-se que α -metildopa exerce seus efeitos cardiovasculares por aumentar a atividade nos neurônios da região bulboespinhal por dois mecanismos: a α -metildopa poderia, indiretamente através da α -metildopamina ou da α -metilnoradrenalina, deslocar a noradrenalina de seus locais de armazenamento, facilitando sua liberação na fenda sináptica, isto podendo ativar α_2 -adrenoceptores pós-ganglionares; ou a grande quantidade no índice de catecolaminas, devido à α -metilnoradrenalina biossintetizada, poderia saturar os locais de armazenamento

e serem liberadas na fenda sináptica ativando receptores pós-ganglionares nos locais específicos dentro do sistema nervoso central.

Das regiões estudadas, o núcleo do tracto solitário foi o mais provável para a α -metilnoradrenalina exercer os efeitos sobre pressão sanguínea e frequência cardíaca. Os efeitos das duas vias de administração foram similares, sendo que após três horas, α -metilnoradrenalina estava presente em maior quantidade, e noradrenalina foi reduzida 50 a 70%.

De acordo com Bobik e colab. muitas hipóteses sobre como α -metildopa exerce o efeito hipotensivo em humanos têm sido derivadas, em sua grande parte, de experimentos com animais (Stone & Porter, 1967; Day, 1963; Clementi e colab., 1963; Stone & Stavorski, 1963; Sourkes, 1965; Ingenito e colab., 1970; Ingenito & Procita 1977; Ayitey-Smith & Varma, 1970; Baum e colab., 1972).

1.2. O que se conclui sobre a α -metildopa na década de 1990

Na literatura a partir da década de 1990 encontra-se que a α -metildopa tem efeito direto sobre o sistema nervoso simpático e diminui resistência vascular periférica (Gunenç e colab., 2002). A bula de "Aldomet" (P.R. Vade-Mécum, 2001) informa que a capacidade de inibir dopadescarboxilase e depletar a noradrenalina dos tecidos animais é atributo somente do L-isômero de α -metildopa. De acordo com Hardman & Limbird a α -metildopa é um agente anti-hipertensivo de ação central, age como pró-droga (fármaco cujo metabólito exerce ação farmacológica), é metabolizada em α -metilnoradrenalina no cérebro e acredita-se que esse metabólito seja capaz de ativar os receptores α_2 -adrenérgicos centrais e de baixar a pressão arterial.

Os receptores α_2 -adrenérgicos localizados nas terminações nervosas pré-sinápticas desempenham funções importantes na regulação da liberação dos neurotransmissores pelas terminações nervosas simpáticas nos sistemas nervosos central e periférico, como inibir liberação de noradrenalina. Nos tecidos periféricos, os receptores α_2 -adrenérgicos pós-sinápticos são encontrados nas

células musculares lisas dos vasos sanguíneos e outros órgãos (onde há contração), adipócitos e células epiteliais secretoras.

No início a α -metildopa foi sintetizada como um análogo da dopamina com a intenção de inibir competitivamente a enzima aminoácido-*L*-aromático descarboxilase, catalisadora da biotransformação da levodopa em dopamina. Ou seja, como antagonista competitivo da levodopa. O fato desse fármaco inibir tal enzima em seres humanos não explica a queda da pressão sanguínea. Foi descoberto que a α -metildopa é metabolizada pela enzima descarboxilase do aminoácido-*L*-aromático nos neurônios adrenérgicos formando a α -metildopamina, que por ação da enzima dopamina- β -oxidase é convertida em α -metilnoradrenalina. Esta é armazenada nas vesículas secretoras dos neurônios adrenérgicos agindo como a noradrenalina, e é liberada como se fosse o verdadeiro neurotransmissor. Assim a α -metil noradrenalina atua no cérebro inibindo o efluxo neuronal adrenérgico no tronco cerebral, resultando numa ação anti-hipertensiva (Hardman & Limbird, 1996). Segundo essa literatura, é provável que a α -metilnoradrenalina atue como agonista α_2 no tronco cerebral diminuindo o efluxo dos sinais adrenérgicos vasoconstritores para o sistema nervoso simpático periférico.

Agindo nos receptores α_2 -adrenérgicos no tronco cerebral, a α -metilnoradrenalina e talvez outros metabólitos da α -metildopa, promovem outras reações além da redução da pressão sanguínea. Inibem os centros responsáveis pela vigilância e estado de alerta resultando numa transitória sedação, podem diminuir a energia psíquica e levar à depressão, inibem os centros bulbares que controlam a salivação e a pessoa pode apresentar secura na boca, outros sintomas são diminuição da libido, sinais parkinsonianos, hiperprolactinemia, e bradicardia grave até parada sinusal em indivíduos com disfunção do nodo sinuatrial (Hardman and Limbird).

Efeitos não provocados devido à ação farmacológica incluem principalmente hepatotoxicidade, que é reversível após o tratamento, e anemia hemolítica apresentando teste de Coombs positivo obrigando à interrupção do tratamento com α -metildopa (Hardman and Limbird, 1996).

1.3. Ação de α -metildopa sobre hipertrofia ventricular esquerda

A α -metildopa foi testada com intuito de reverter hipertrofia ventricular esquerda em pacientes hipertensos. O tratamento com antihipertensivo incluiu utilização do diurético hidroclorotiazida devido à necessidade pela presença de uma hipertensão grave. Foram utilizadas doses de 500 a 750 mg/dia de α -metildopa (doses mais baixas do que um tratamento convencional de hipertensão) a fim de diminuir a massa ventricular esquerda. Quatro dos dez pacientes apresentaram resultados satisfatórios na redução da hipertrofia ventricular esquerda no final de 36 semanas, embora sem alterações significativas na pressão sanguínea com esse tipo de tratamento (Fouad e colab., 1982).

1.4. Metabolismo de α -metildopa no organismo e interferências devido ao uso concomitante com sulfatos e ferro

Segundo Campbell e colab., o maior metabólito de α -metildopa é a sua conjugação com sulfato catalisada por fenol sulfotransferase, sendo que a O-metilação pela catecol-O-metiltransferase e a descarboxilação pela aromático L-aminoácido descarboxilase são caminhos menos importantes para a sua biotransformação. O metabólito α -metildopamina também pode sofrer conjugação com sulfato. É dito que a porcentagem de α -metildopa e α -metildopamina excretadas ligadas com sulfato diminui quando a dose de α -metildopa aumenta, e isso devido às variações na disponibilidade do doador de sulfato (3'-fosfoadenosina-5'-fosfosulfato) para a reação da fenil sulfotransferase.

Campbell e colab. destinaram seus experimentos à verificação se sulfato inorgânico oral poderia alterar o metabolismo de doses clinicamente utilizadas de α -metildopa. Foi encontrado que a utilização de sulfato de sódio junto com α -metildopa aumenta a quantidade de metabólito sulfato de α -metildopa excretado na urina em 32%, diminui a excreção de α -metildopa livre em 35%, e não há alteração significativa nas porcentagens dos metabólitos urinários α -metildopamina e 3-O-metilmethylmetildopa.

O aumento da sulfatação de α -metildopa pode ser devido ao aumento da disponibilidade de 3'-fosforoadenosina-5'-fosforosulfato ou à diminuição da absorção da droga. A relação entre quantidades de α -metildopa e α -metildopamina excretadas como conjugados com sulfato indicam que a ingestão de sulfato de sódio diminui a absorção de α -metildopa e aumenta a proporção de droga conjugada com sulfato com diminuição da α -metildopa livre excretada. O fato da disponibilidade de 3'-fosforoadenosina-5'-fosforosulfato ser aumentada localmente no intestino ou no fígado na presença de sulfato inorgânico, assim como diferenças na atividade da enzima fenolsulfotransferase, é que são responsáveis pelas variações individuais na sulfatação. Com diminuição da absorção de α -metildopa ocorre também diminuição na saturação sobre a enzima fenolsulfotransferase com conseqüente aumento da sulfatação de α -metildopa e α -metildopamina.

Um fator muito importante que poderia ser verificado é se a utilização concomitante de sulfato de sódio (poderoso laxante em doses grandes) ou sulfato ferroso (casos de anemia ou em sua prevenção) pode provocar alterações no controle da pressão sanguínea em pacientes tratados com α -metildopa.

Greene e colab. também verificaram que a administração de sulfato ferroso, antianêmico bastante utilizado inclusive para mulheres grávidas, concomitante com α -metildopa, interfere na absorção desta devido à presença dos íons ferrosos. O que ocorre é que em condições aeróbicas, íons ferrosos sofrem autooxidação na presença de agentes quelantes fortes como as catecolaminas, e o grupamento catecol se liga aos íons férricos formando complexos. E esta reação é fortemente favorecida no pH entre 4 e 9. No entanto, sob condições ácidas (pH 2-5), os íons férricos sofrem uma reação redox interna com catecol, e retornam a íons ferrosos.

De acordo com a Figura 5 abaixo, nesse ciclo redox, grande quantidade de ânion superóxido é produzida, e que na presença de íons ferrosos é rapidamente convertido ao radical hidroxila (extremamente tóxico para o organismo). Em pH ácido, é formado complexo verde entre α -metildopa e ferro (III) na proporção 1:1, que sofre reação redox para formar a quinona e o íon ferroso. Em pH em torno de

2, a autoxidação para íons ferroso é baixa. É indicado que o ciclo redox ocorra no estômago, e que dependendo do tempo que α -metildopa permanece no estômago, uma considerável porção pode estar sendo convertida à inativa quinona. Em $\text{pH} \geq 6$, que corresponde às porções intestinais jejuno e duodeno, cada íon férrico se liga a duas moléculas de α -metildopa. Esse complexo é altamente carregado, peso molecular em torno de 500, e é pobremente absorvido pelo intestino (Greene e colab., 1990).

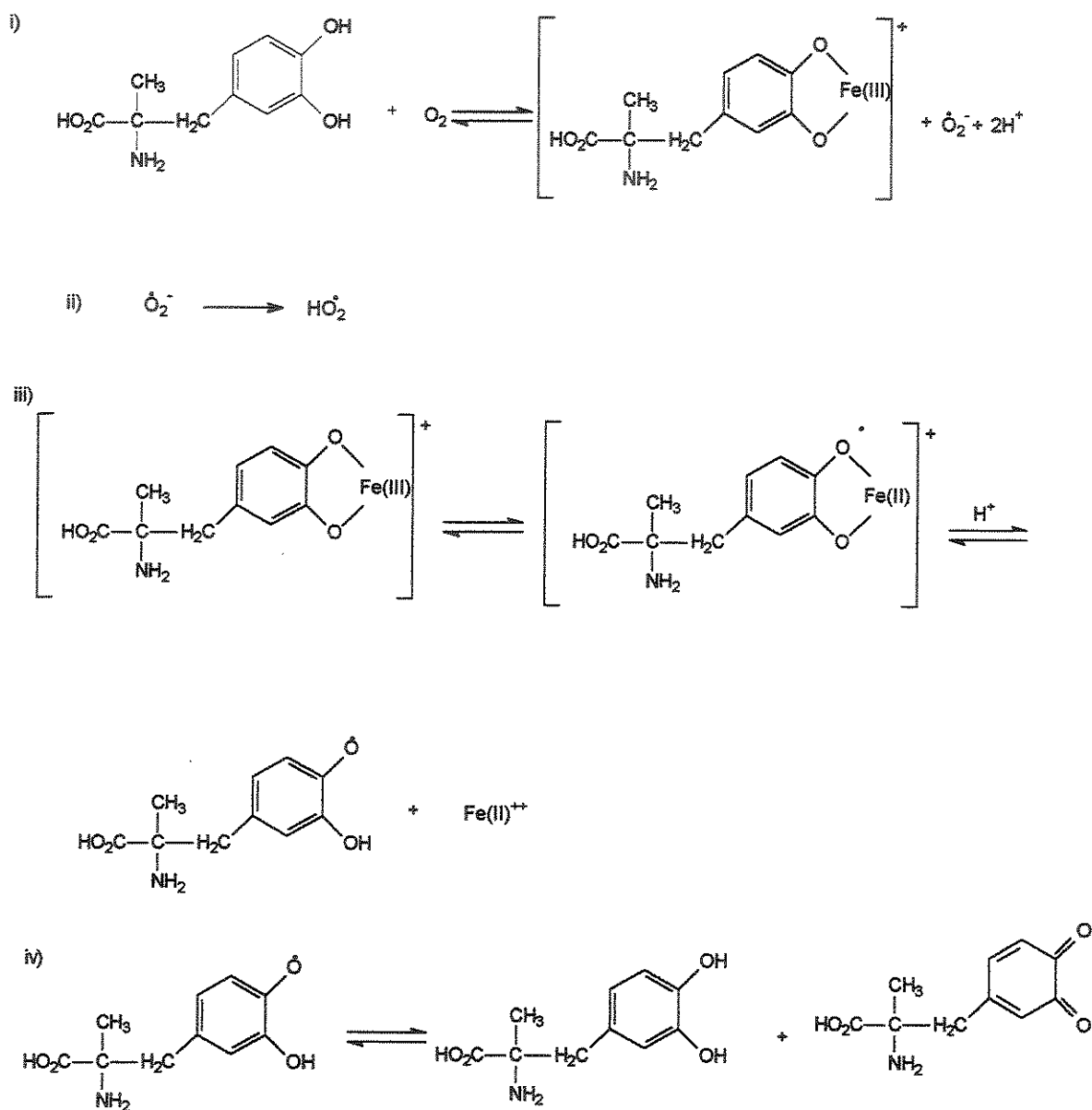


Figura 5. Reação dos íons ferroso e férrico com α -metildopa

Com isso, a ingestão de ferro no tratamento com α -metildopa, prejudica o aproveitamento do antihipertensivo, pois impede sua absorção máxima.

1.5. O uso de α -metildopa durante a gravidez

É também discutida a importância do uso de α -metildopa em hipertensão durante a gravidez, um fator de risco tanto para a mãe quanto para o bebê, pois os dois correm risco de vida, parto pré-maturo ou retardamento no crescimento fetal. Hamilton & Kopelman (1963) trataram dois casos de hipertensão na gravidez. Num deles, o feto morreu nove dias após início do tratamento com α -metildopa, na paciente grávida, de uma hipertensão grave, na 13ª semana de gravidez com exsudato (extravasamento de plasma) e hemorragia retinal (devido à grande pressão na retina ocular). No outro caso, a pressão da mãe foi controlada com α -metildopa até o nascimento da criança por cesárea.

Smith & Piercy relataram um caso de hepatotoxicidade na mulher grávida, que teve início após três semanas de tratamento com α -metildopa a fim de tratar uma hipertensão. Embora α -metildopa seja considerada ter uma ampla margem de segurança, esta mulher apresentou alterações nos níveis de aminotransferase no sangue e também prolongamento do tempo de coagulação. Os sintomas foram resolvidos ao cessar o tratamento com α -metildopa.

El-Qarnalawi e colab. verificaram que 18,5% das grávidas do seu experimento, utilizando α -metildopa para tratar a hipertensão, apresentaram proteinúria até o parto, 68% apresentaram queda significativa na pressão sanguínea, e várias pacientes necessitaram de parto induzido e cesárea urgente devido à pressão sanguínea não controlada. A α -metildopa é a droga mais antiga para hipertensão durante a gravidez. Sua exposição no útero não afeta o crescimento do feto e seu desenvolvimento. Mas as principais desvantagens são um atraso no início da ação, sonolência, depressão, retenção de líquido e congestão nasal. Pode causar anemia hemolítica, lupus eritematoso sistêmico e problemas hepáticos.

Segundo Günenç e colab. α -metildopa é um dos antihipertensivos mais usados em pacientes grávidas com hipertensão e tem efeito direto sobre o sistema nervoso simpático e também diminui o espasmo vascular periférico. Günenç e colab. verificaram que α -metildopa em grávidas hipertensas não afeta resistência vascular fetal mas diminui a resistência da artéria uterina, podendo melhorar a oxigenação e nutrição fetal com progressão do crescimento fetal.

1.6. Farmacocinética de α -metildopa

Sobre a farmacocinética, α -metildopa é absorvida, em parte, no trato gastrointestinal através de um transportador de aminoácidos neutros (Campbell e colab., 1995). O tempo de meia-vida é de 2,0 horas; clearance renal é de 107 ± 35 mL/min. A biodisponibilidade absoluta é de 42%.

Os metabólitos medidos na urina após administração oral e intravenosa de 250 mg de α -metildopa somam 27% e 17%, respectivamente. Sulfato de α -metildopa é o metabólito mais abundante, 20,1% após uma administração oral e 6,7% após uma administração intravenosa de α -metildopa, sugerindo, segundo Skerjanec et al, um significativo metabolismo pré-sistêmico no intestino. Isso indica que a sulfatação ocorrida no intestino, contribui para a parcial absorção de α -metildopa. E a enzima responsável por essa conjugação está presente em grande quantidade no intestino, com maior atividade na mucosa do jejuno.

Vinte e quatro horas após uma dose oral de α -metildopa, as seguintes quantidades são excretadas na urina (Tabela 1):

TABELA 1. A α -METILDOPA E SEUS METABÓLITOS (MÉDIA $\pm$ DESVIO PADRÃO) EXCRETADOS NA URINA APÓS 24 HORAS DA DOSE ADMINISTRADA DE α -METILDOPA (EXPRESSO EM % DA DOSE)

Espécie	Dose intravenosa	Dose oral
α -metildopa	39,8 $\pm$ 8,7	15,1 $\pm$ 6,6
Sulfato de α -metildopa	6,7 $\pm$ 5,3	20,1 $\pm$ 5,7
α -metildopamina	7 $\pm$ 1,6	4,1 $\pm$ 1,9
Sulfato de α -metildopamina	3,5 $\pm$ 1,9	2,6 $\pm$ 0,9
Total	61,5 $\pm$ 6,8	45,3 $\pm$ 12,8

Fonte: Campbell e colab., 1995.

1.7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Ayitey-Smith, E.; Varma, D. R.; **Mechanism of the hypotensive action of methyldopa in normal and immunosymparhectomized rats**, *Br. J. Pharmacol.*, **1970**, 40, 186.
- Baum, T.; Shropshire, A. T.; Varner, L. L.; **Contribution of the central nervous system to the action of several antihypertensive agents (methyldopa, hydralazine e guanethidine)**, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **1972**, nº 1, 182, 135.
- Bayliss, R. I. S.; Harvey-Smith, E. A.; **Methyldopa in the treatment of hypertension**; *Lancet*, **1962**, 1, 763.
- Bobik, A.; Jennings, G.; Jackman, G.; Oddie, C.; Korner, P.; **Evidence for a predominantly central hypotensive effect of α -methyldopa in humans**, *Hypertension*, **1986**, 8, 16.
- Bobik, A.; Oddie, C.; Scott, P.; Mill, G.; Korner, P.; **Relationships between the cardiovascular effects of α -methyldopa and its metabolism in pontomedullary noradrenergic neurons of the rabbit**, *J. Cardiovasc. Pharmacol.*, **1988**, 11, 529.
- Campbell, N. R. C.; Sundaram, R. S.; Werness, P. G.; Loon, J. V.; Weinshilboum, R. M.; **Sulfate and methyldopa metabolism: metabolite patterns and platelet phenol sulfotransferase activity**, *Clin. Pharmacol. Ther.*, **1985**, 37, 308.
- Cannon, P. J.; Whitlock, R. T.; Morris, R. C.; Angers, M.; Laragh, J. H.; **Effect of alpha-methyl dopa in severe and malignant hypertension**, *J. Amer. Med. Ass.*, **1962**, 179, 673.
- Clementi, F.; Fresia, P.; Mortari, A.; Sioli, G.; **α -Methyldopa does not prevent synthesis and storage of catecholamines in rat adrenal medulla**, *Biochem. Pharmacol.*, **1963**, 12, 201.

- Cruz, F.; O'Neill, W. M.; Clifton, G.; Wallin, J. D.; **Effects of labetalol and methyldopa on renal function**, *Clin. Pharmacol. Ther.*, 1981, nº 1, 30, 57.
- Day, M. D.; **Evidence for a peripheral site of action for α -methyldopa (Aldomet)**, *Biochem. Pharmacol.*, 1963, 12, 200.
- Day, M. D.; Rand, M. J.; **A hypothesis for the mode of action of α -methyldopa in relieving hypertension**, *J. Pharm. Pharmacol.*, 1963, 15, 221.
- El-Qarmalawi, A. M.; Morsy, A. H.; Al-Fadly, A.; Obeid, A.; Hashem, M.; **Labetalol vs. methyldopa in the treatment of pregnancy-induced hypertension**, *Intern. J. Gynecol. Obstet.*, 1995, 49, 125.
- Fouad, F. M.; Nakashima, Y.; Tarazi, R. C.; Salcedo, E. E.; **Reversal of left ventricular hypertrophy in hypertensive patients treated with methyldopa**, *Am. J. Cardiol.*, 1982, March, 49, 795.
- Greene, R. J.; Hall, A. D.; Hider, R. C.; **The interaction of orally administered with levodopa and methyldopa therapy**, *J. Pharm. Pharmacol.*, 1990, 42, 502.
- Güenç, O.; Çiçek, N.; Gorkemli, H.; Çelik, Ç.; **The effect of methyldopa treatment on uterine, umbilical and fetal middle cerebral artery blood flows in preeclamptic patients**, *Arch. Gynecol. Obstet.*, 2002, 266, 141.
- Hamilton, M.; Kopelman, H.; **Treatment of severe hypertension with methyldopa**, *Br. Med. J.*, 1963, Jan. 19, 151.
- Hardman, J. G.; Limbird, L. E.; *Hardman and Limbird's The Pharmacological Basis of Therapeutics*. Mc Gram Hill, ed. 9, 1996.
- Ingenito, A. J.; Barret, J. P.; Procita, L.; **A centrally mediated peripheral hypotensive effect of α -methyldopa**, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 1970, nº 3, 175, 593.
- Ingenito, A. J.; Procita, L.; **Some paradoxical aspects of the cardiovascular pharmacology of alpha-methyldopa**, *J. Clin. Pharmacol.*, 1977, Fev./March, 95.
- Korolkovas, A.; Burckhalter, J. H.; *Química farmacêutica*. Rio de Janeiro: Guanabara Dois, 1982.
- Mingoia, Q.; *Química farmacêutica*. São Paulo: Editora da Universidade de São Paulo, 1967.
- Oates, J. A.; Gillespie, L.; Udenfriend, S.; Sjoerdsma, A.; **Decarboxylase inhibition and blood pressure reduction by α -methyl-3,4-dihydroxy-DL-phenylalanine**, *Science*, 1960, June 24, 131, 1890.
- Onesti, G.; Brest, A. N.; Novack, P.; Kasparian, H.; Moyer, J. H.; **Pharmacodynamic effects of alpha-methyldopa in hypertensive subjects**, *Am. Heart J.*, 1964, nº 1, 67, 32.
- Paynter, D. E.; Tipton, C. M.; Tchong, T.; **Response of immunosympathectomized rats to training**, *J. Appl. Physiol.*, 1977, 42 (6), 935.
- P.R. Vade-Mécum. Brasil 2001/2002*. São Paulo: Soriak, ed. 7, 2001.

- Skerjanec, A.; Campbell, N. R. C.; Tam, Y.; Robertson, S.; Burgess, E.; **Methyldopa kinetics before and after ingestion of methyldopa for eight weeks**, *Eur. J. Pharmacol.*, **1995**, 48, 397.
- Smirk, H.; **Hypotensive Action of Methyldopa**, *Br. Medical Journal*, **1963**, Jan 19, 146.
- Smith, G. N.; Piercy, W. N.; **Methyldopa hepatotoxicity in pregnancy: A case report**, *Intern. J. Gynecol. Obstet.*, **1995**, 51, 197.
- Sourkes, T. L.; **Inhibition of dihydroxyphenylalanine decarboxylase by derivatives of phenylalanine**, *Arch. Biochem. Biophys.*, **1954**, 51, 444.
- Sourkes, T. L.; **The action of α -methyldopa in the brain**, *Brit. med. Bull.*, **1965**, n° 1, 21, 66.
- Stone, C. A.; Porter, C. C.; **Biochemistry and pharmacology of methyldopa and some related structures**, In *Advances in Drug Research*, ed. by N. J. Harper and A.B. Simmonds, vol. 4, Academic Press, London, **1967**, 71.
- Stone, C. A.; Stavorski, J. M.; **Comparative effects of methyldopa and reserpine on nerve- and phenethylamine-induced cardio-acceleration in the dog**, *Biochem. Pharmacol.*, **1963**, 12, 201.

2. SÍNTESE DE α -METILDOPA

A primeira síntese de α -metildopa foi realizada, em 1955, por Pfister e colab.. De acordo com a Figura 6 (página 35), há dois caminhos para a produção da forma racêmica de α -metildopa partindo de 3,4-dimetoxifenilacetonitrila, sendo um via 3,4-dimetoxifenilacetona, hidantoína e α -metil-3,4-dimetoxifenilalanina com rendimento de 32,2%, e outro via 3,4-dimetoxifenilacetona, aminonitrila e α -metil-3-hidroxi-4-metoxifenilalanina com rendimento de 3,1%.

O produto da síntese de α -metildopa demonstrada por Pfister e colab., necessita de uma resolução ótica porque o isômero (*R*)-(+)-biologicamente inativo é produzido e disponível em igual quantidade com o componente ativo, (*S*)-(-)- α -metildopa (Slates e colab., 1963).

Esta afirmação foi baseada em Tristam e colab., que demonstraram que a atividade hipotensora de α -metildopa (**6**) reside no isômero ótico com a rotação negativa, $[\alpha]_D^{25} -4^\circ$ (*c* 2, HCl 0,1 mol/L) e que tem configuração *S*.

Para produzir (*S*)-(-)- α -metildopa, Tristam e colab. desenvolveram duas maneiras. A primeira seqüência de reações para a resolução de α -metildopa está esquematizada na Figura 7 (página 43), a partir do intermediário **5** da síntese de Pfister e colab. (1955), utilizando (-)-feniletilamina para resolver **9** e rendendo 22,5 %. A segunda, de acordo com a Figura 8 (página 47), ocorre a partir da própria *dl*- α -metildopa, utilizando (-)-quinina para resolver **11** e apresentando rendimento de 31,2%.

(*R*)-(+)- α -metildopa que é formada na mistura racêmica de α -metildopa apresentada por Pfister e colab. e obtida através das etapas de resolução, pode ser utilizada para sintetizar o composto precursor **3** e ressintetizar a mistura racêmica várias vezes, a fim de aumentar a quantidade obtida de (-)- α -metildopa. Slates e colab. converteram (*R*)-(+)- α -metildopa no seu precursor 3,4-dimetoxifenilacetona (**3**) como mostra a Figura 9 (página 51), com rendimento de 82,3% . A partir do precursor (*S*)-(-)-**5** de (*S*)-(-)- α -metildopa, também pode-se produzir **3**, e render 8,4% (Figura 10, página 55). Slates e colab., partindo de um

composto derivado de α -metildopa, o triacetato de α -metildopa **11**, produziram a cetona 3,4-diacetoxifenilacetona **16** com rendimento de 75,2% (Figura 11, página 58). Forlini e colab. prepararam 3,4-diacetoxifenilacetona por oxidação eletrolítica.

Segundo Reinhold e colab., a assimetria de (S)-(-)- α -metildopa é introduzida na formação dos intermediários α -aminonitrila ou hidantoína, e a α -aminonitrila é utilizada para resolução. Assim, outra maneira de eliminar o inativo terapeuticamente (*D*)-isômero é sintetizar (S)-(-)- α -metildopa a partir de um intermediário assimétrico ((*d*l)- α -amino- α -vanililpropionitrila), que é resolvido, resultando na cristalização só do desejado (*L*)-isômero em mais de 50 %. Por fim, hidrolizando o grupo nitrila e clivando o grupo 3-metoxi, (S)-(-)- α -metildopa é produzida com rendimento de 70,3% (Figura 12, página 59).

Outras sínteses produzem (S)-(-)- α -metildopa e (R)-(+)- α -metildopa separadamente, como mostra a Figura 13 (página 64), a partir do aminoácido (S)-alanina (Seebach e colab., 1985). E León-Romo e colab. também produziram (S)-(-)- e (R)-(+)- α -metildopa, a partir de uma hidantoína quiral **32**, com rendimento de 24,7% de (S)-(-)- α -metildopa e de 24,0% de (R)-(+)- α -metildopa (Figuras 14 e 14^a, páginas 67 e 68).

Essas sínteses são utilizadas em escala laboratorial, desconhecendo a utilização delas industrialmente. A α -metildopa não é sintetizada no Brasil.

Métodos de Separação de Enantiômeros numa Mistura Racêmica

Um composto na forma racêmica (*dl*) consiste numa mistura contendo partes equimoleculares de dois enantiômeros. A resolução é um processo de separação de uma forma racêmica nos respectivos enantiômeros. O método geral de resolução de um par *dl* é deixá-lo reagir com um reagente quiral (agente de resolução). Isso converterá os dois enantiômeros em dois diastereoisômeros, que poderão ser separados através de técnicas como cristalização fracionada (Allinger e colab., 1976).

Outro método de separação de isômeros óticos é baseado na separação por diferença de partição entre moléculas (Philippa, 2001). Usa-se uma superfície

porosa como um gel de poliamida ou resina trocadora de íons. Os solutos a serem separados são classificados como caotrópicos e cosmotrópicos, de acordo com sua partição entre os microdomínios. No processo, caotrópicos, como os *L*-aminoácidos são retidos no gel de poliamida e podem ser eluídos usando uma solução de um caotrópico forte (por exemplo, K^+ , Rb^+ , Cs^+ , HCO_3^- , $H_2PO_4^-$, NO_3^- , HSO_4^- e íon tetrametilamônio. Solutos que podem ser usados para eluir cosmotrópicos inclui Mg^{2+} , Ca^{2+} , H^+ , Li^+ , Na^+ , SO_4^{2-} , HPO_4^{2-} , F^- , OH^- e solventes hidrofílicos como etanol, propanol e álcool benzilbutanol.

As resinas trocadoras de cátions e ânions contêm microdomínios cuja estabilidade numa resina trocadora de cátion aumenta com a mudança do contra-íon de Na^+ , Li^+ ou H^+ para K^+ , Rb^+ ou Cs^+ e especialmente para Ca^{2+} ou Mg^{2+} . A estabilidade dos microdomínios numa resina trocadora de ânion aumenta com a mudança do contra-íon de OH^- , F^- para Cl^- , Br^- ou I^- e especialmente para SO_4^{2-} . Os caotrópicos como os *L*-aminoácidos podem ser eluídos de resinas trocadoras de íons com soluções aquosas de cosmotrópicos, tais como Mg^{2+} , Ca^{2+} , H^+ , Li^+ , Na^+ , SO_4^{2-} , HPO_4^{2-} , F^- , OH^- e solventes hidrofílicos como etanol e propanol.

Os cosmotrópicos como os *D*-aminoácidos podem ser eluídos de resinas trocadoras de íons com soluções aquosas de caotrópicos, tais como K^+ , Rb^+ , Cs^+ , HCO_3^- , $H_2PO_4^-$, NO_3^- , HSO_4^- e íon tetrametilamônio. No entanto, todos os solutos, tanto cosmotrópicos como caotrópicos, podem ser eluídos de resinas trocadoras de íons neutralizando-as.

Ishiguro & Imura separaram os isômeros óticos de *D,L*-fenilalanina e *D,L*-isoleucina por eletroforese capilar através de beta-ciclodextrina como seletor quiral (Ishiguro & Imura, 2002).

A resolução ótica das misturas racêmicas dos aminoácidos triptofano, fenilalanina e tirosina foi realizada por ultrafiltração usando uma membrana polimerizada de plasma, preparada polimerizando 1-mentol numa membrana de acetato de celulose com poro de 0,2 μm de diâmetro, exposta numa radiação de plasma por 60 minutos. A membrana é permeável aos *D*-isômeros das misturas testadas (Tone e colab., 1995).

1. Síntese de acordo com Pfister e colab. (Figura 6)

O composto **1**, condensado com acetato de etila na presença de etóxido de sódio, forma **2**.

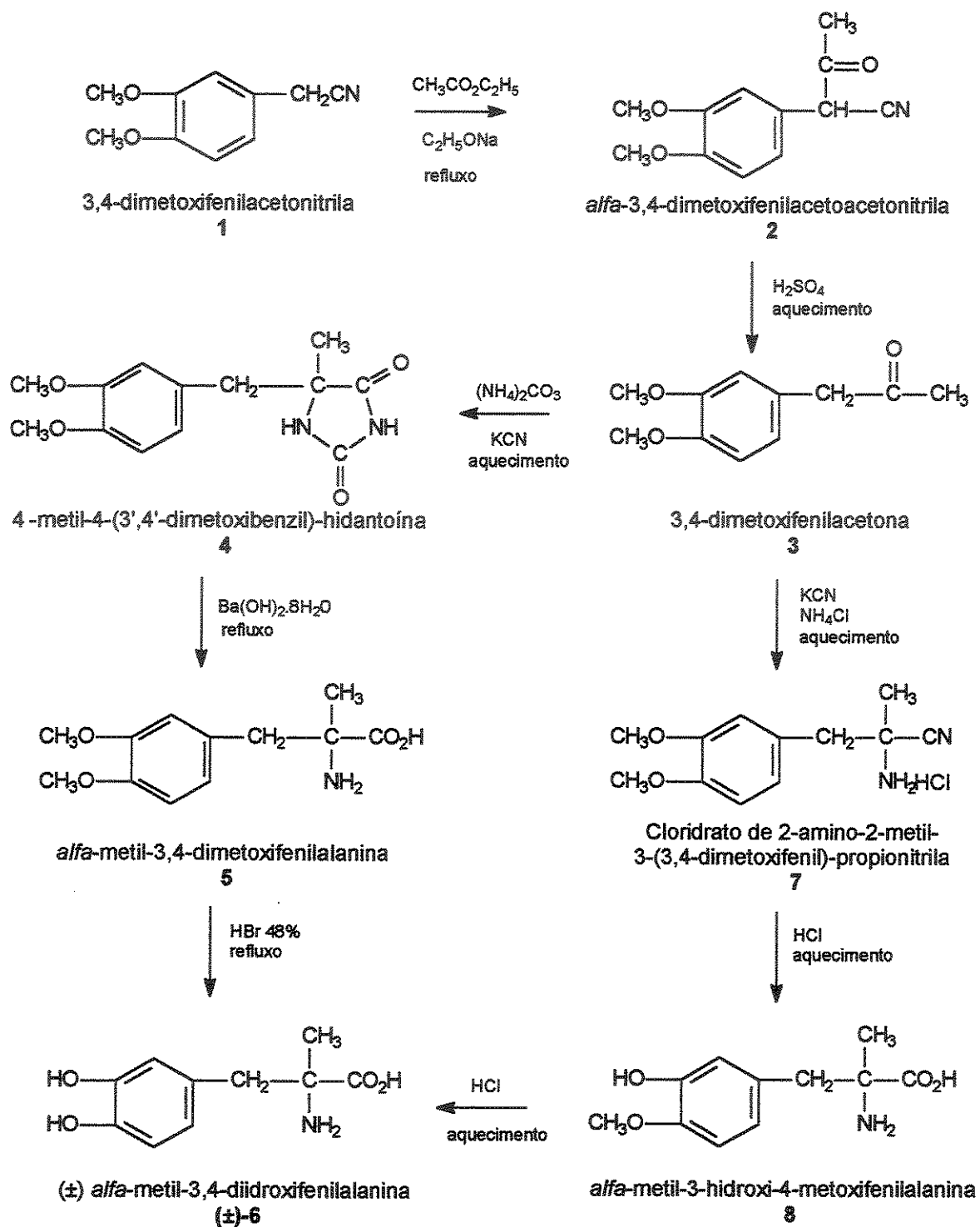
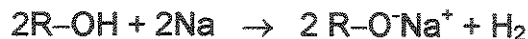


Figura 6. Síntese de acordo com Pfister e colab.

Sódio metálico e etanol formam alcoóxido de sódio. Esta reação envolve o deslocamento do hidrogênio do álcool e é, por isso, uma reação de oxidação-redução. O sódio, metal alcalino, é um agente redutor poderoso e sempre desloca os átomos de hidrogênio ligados aos átomos de oxigênio:



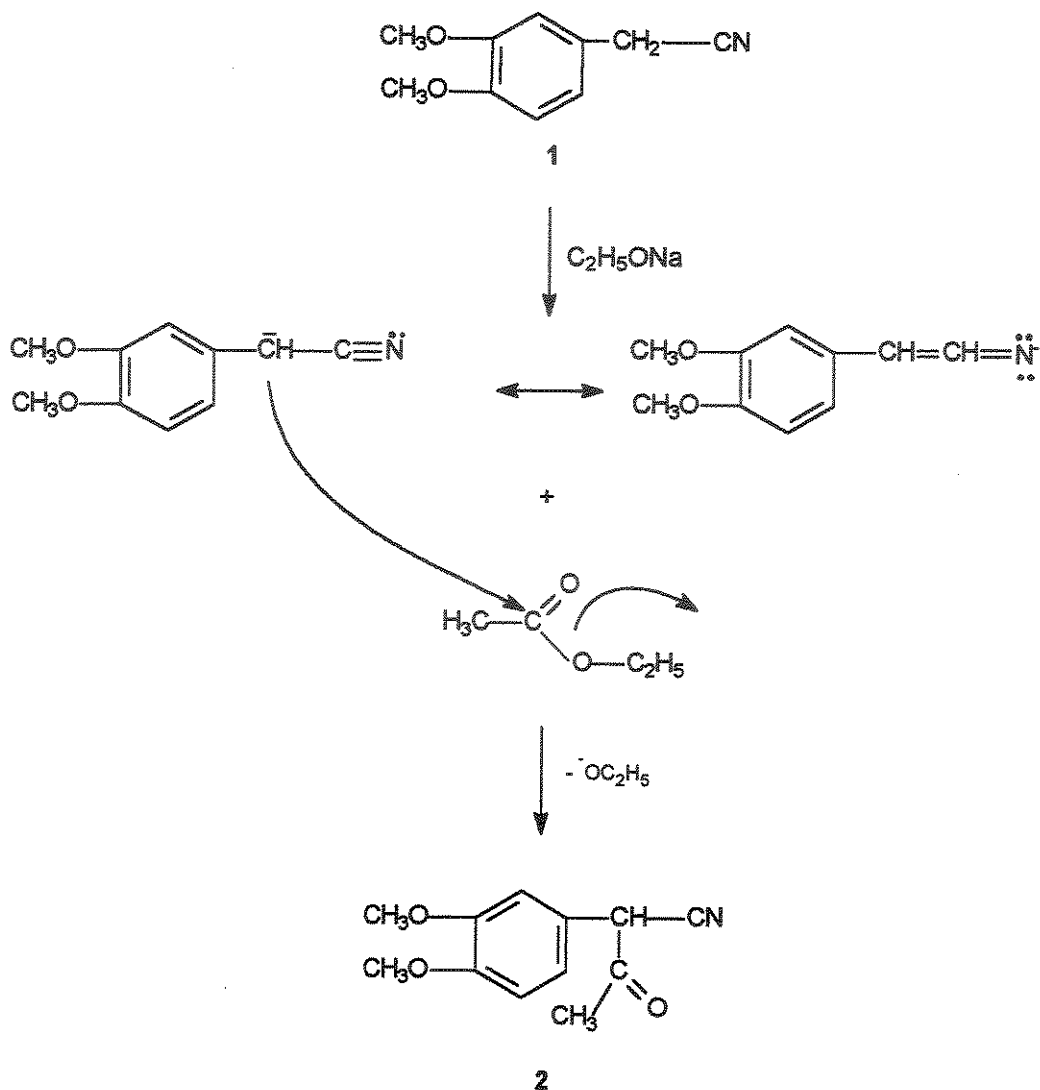
O álcool é usado freqüentemente nas reações orgânicas, pois sendo um pouco menos polar que a água, dissolve compostos orgânicos menos polares. O álcool como solvente se comporta como uma base de Lewis e tem a vantagem de dispor de íons alcoóxidos, que irão oferecer o par de elétrons na futura ligação.

O alcoóxido usado deve ser o mesmo que o da porção alcoólica do éster para prevenir formação de misturas de produto por reações entre ésteres. No caso foi utilizado etóxido de sódio e acetato de etila.

A fenilacetonnitrila, composto 1, é consideravelmente mais ácida que acetonnitrila e é mais facilmente desprotonada. Portanto, na reação sai um hidrogênio do carbono benzílico, retirado pelo etóxido de sódio que atua como uma base.

A energia condutora da reação é a formação de um sistema enolato estável que atuará como um nucleófilo. Visto que a reação é facilmente reversível, é governada por controle termodinâmico (resfriamento a 10°C).

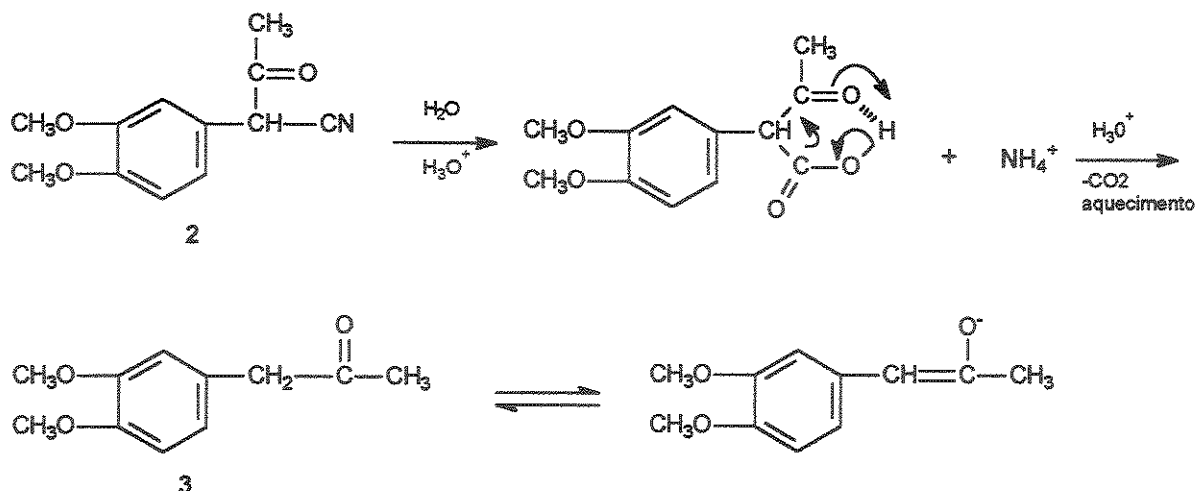
Após desprotonação da fenilacetonnitrila, o carbono da carbonila do acetato de etila se liga ao carbono substituindo o H, formando o enolato. Após purificação por recristalização com metanol, o composto 2 apresenta ponto de fusão de 98-100°C.



Esquema da reação de síntese do composto 1 para o composto 2.

A seguir, através de sucessivas hidrólises à quente com ácido sulfúrico, é formado o óleo 3 que é purificado, por destilação à vácuo, apresentando ponto de ebulição 142°C.

Nesta reação, o grupo nitrila é hidrolisado na presença de ácido ao seu correspondente ácido carboxílico e cátions NH_4^+ são formados. O ácido carboxílico, por sua vez, é descarboxilado lentamente por aquecimento. Na síntese, a solução permanece 3 horas em banho-maria.

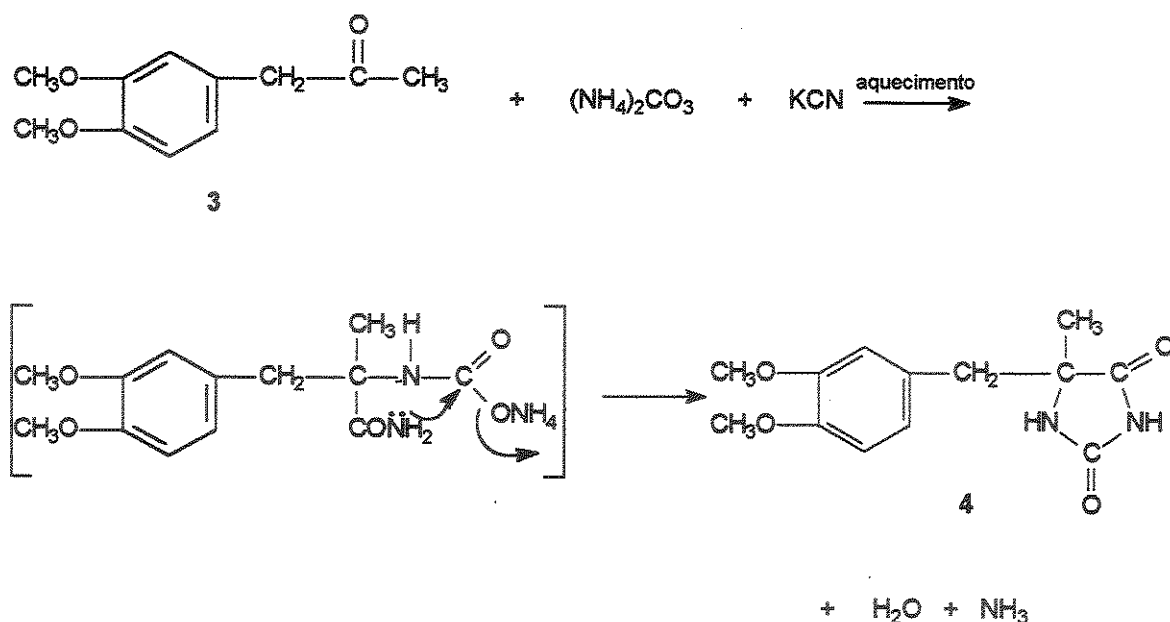


Esquema da reação de síntese do composto 2 para o composto 3.

1.1 – Síntese via 3,4-dimetoxifenilacetona, hidantoína e α -metil-3,4-dimetoxifenilalanina.

O composto 3, tratado com carbonato de amônio e cianeto alcalino, resulta na hidantoína 4, que após duas recristalizações com água apresenta ponto de fusão entre 241,5 e 243,5°C. Nesta etapa, foram necessárias 10 horas de aquecimento a 55-60°C e mais 10 horas de agitação à temperatura ambiente para a cristalização da hidantoína.

Nesta reação, a aminonitrila é formada devido à presença de cianeto de potássio, e tratada com carbonato de amônio produz hidantoína, que é hidrolisada facilmente para o aminoácido.



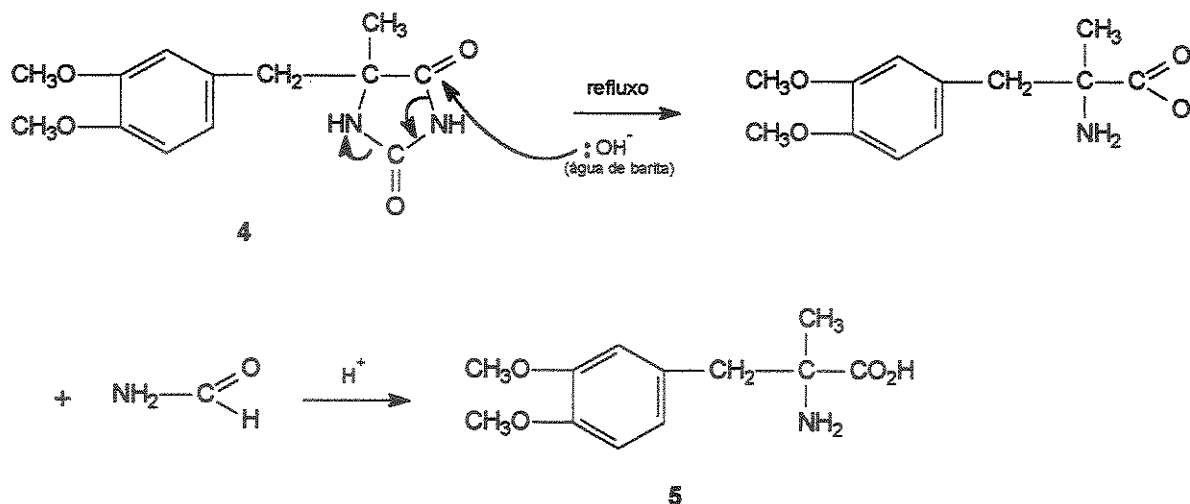
Esquema da reação de síntese do composto 3 para o composto 4.

O composto 4, por sua vez, hidrolisado com água de barita sob refluxo, formando 5. São necessárias 68 horas de refluxo.

Em meio alcalino, é obtido o sal do ácido carboxílico. E a adição de um ácido forte, no caso ácido sulfúrico, completa a reação.

A forma do aminoácido predominante numa solução depende do pH da solução e da natureza do aminoácido. Em soluções muito ácidas, todos os aminoácidos estão presentes, primordialmente, como cátions; em soluções alcalinas estão presentes como ânions. Em um certo pH intermediário (ponto isoelétrico), a concentração do íon dipolar é máxima e as concentrações dos ânions e cátions são iguais. No caso desta etapa, com a adição de ácido sulfúrico até pH 1,6, produz aminoácido em forma de cátion. Após, o pH é elevado a 8,8 com dietilamina, prevalecendo aminoácidos em forma de ânion. E por fim o pH é ajustado para 6,0 com ácido acético glacial, ponto isoelétrico do aminoácido 5.

Purificado por cristalização com água, o composto 5 apresenta ponto de fusão entre 282,0 e 283,5°C.

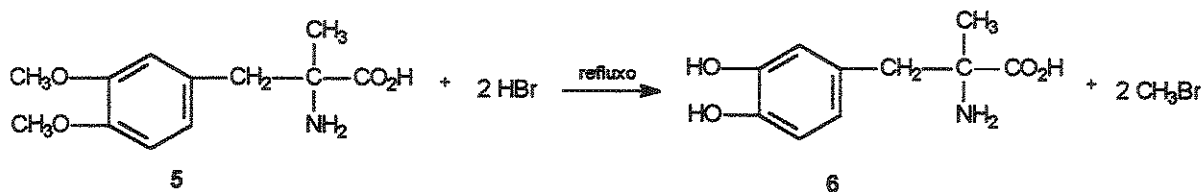


Esquema da reação de síntese do composto 4 para o composto 5.

Finalmente, a desmetilação de **5** é feita sob refluxo durante 55 horas com ácido bromídrico em solução a 48%, obtendo-se o sólido ($\pm$)-**6**.

Nesta reação, o éter alquílico arílico reage com um ácido forte (HBr), e são produzidos um haleto de alquila e um fenol. O fenol não continua a reação para dar haleto de arila porque a ligação carbono-oxigênio é muito forte e os cátions fenila não se formam com facilidade.

O pH é ajustado para 8,4 com dietilamina, prevalecendo aminoácidos em forma de ânion. E após, é ajustado para 6,0 com ácido acético glacial, ponto isoelétrico do aminoácido ($\pm$)-**6**. O produto ($\pm$)-**6**, logo que é obtido, é lavado dez vezes com acetona quente e cinco vezes com éter. Após purificação em meio aquoso utilizando SO_2 e posterior tratamento com óxido de alumínio, o produto final ($\pm$)-**6** apresenta ponto de fusão entre 300 e 301°C.



Esquema da reação de síntese do composto 5 para o composto 6.

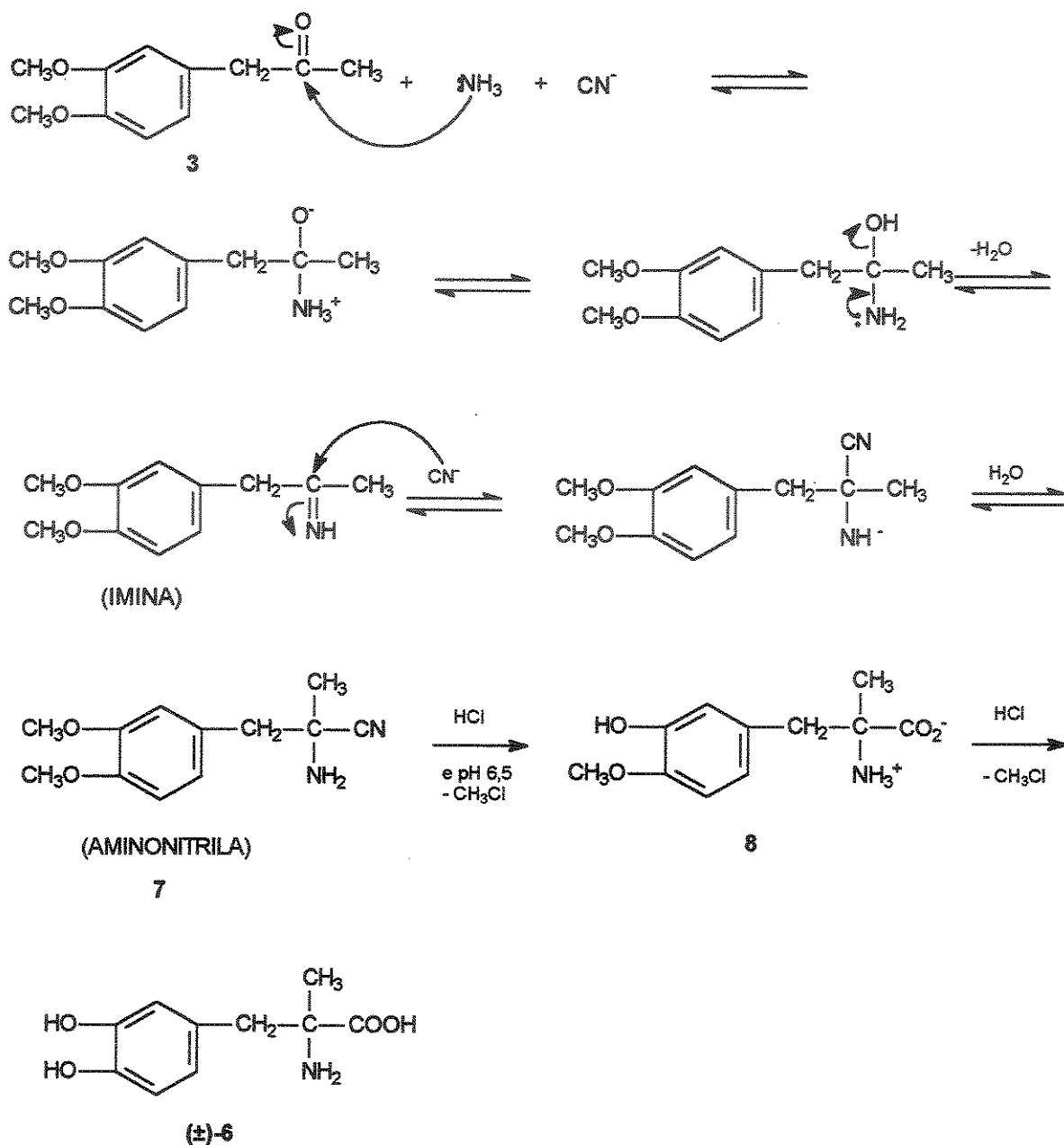
O teste com nitrato de prata para *orto* e *para*-difenois (Wildi, 1951) pode ser utilizado para identificar o composto ($\pm$)-**6**, e deve ser fortemente positivo. Este teste consiste na dissolução de 1,0 g de nitrato de prata em 8,0 mL de água destilada, e a amostra é preparada dissolvendo num tubo de ensaio 5-10 mg do composto a ser analisado em 5,0 mL de etanol 95%. Três gotas da solução de nitrato de prata são adicionadas no tubo e a mistura é agitada por 15 minutos. Devem ser produzidos um espelho prateado e uma coloração. Excluindo luz e ar, a α -metildopa (composto **6**) descolore muito vagarosamente. Nesta reação α -metildopa é oxidada produzindo uma quinona e os íons prata são reduzidos à Ag^0 (espelho de prata).

1.2 – Síntese via 3,4-dimetoxifenilacetona, aminonitrila e α -metil-3-hidroxi-4-metoxifenilalanina.

O outro caminho para a produção de ($\pm$)-**6** consiste em, a partir de **3**, tratada com cianeto de potássio e cloreto de amônio com aquecimento à 55-60°C por 5,5 horas, resulta em **7** (ponto de fusão: 103-106°C). Este, aquecido com HCl em banho-maria por 18 horas, resulta em **8**, correspondente à clivagem parcial do grupo metoxi. Este é então filtrado, e numa solução aquosa, o pH é ajustado para 6,5. O produto **8** é lavado com etanol e com éter, e recristalizado com água, apresentando forte coloração com FeCl_3 e ponto de fusão entre 295 e 296°C. O composto **8** é tratado com HCl e aquecimento à 150°C por 4 horas, produzindo α -metildopa (ponto de fusão: 299,5-300°C).

A reação de cetona com amônia e cianeto de hidrogênio produz α -aminonitrila. A hidrólise do grupo nitrila da α -aminonitrila converte-se em α -aminoácido. A primeira etapa desta síntese envolve, possivelmente, a formação inicial de imina entre a cetona e a amônia, seguida pela adição de cianeto de hidrogênio.

Como na prática o trabalho com o HCN é perigoso, efetua-se a reação misturando-se o composto carbonilado com o íon cianeto e acidificando-se a solução, para assim obter o cianeto de hidrogênio.



Esquema da reação de síntese do composto 3 até o composto 6.

2. Síntese de acordo com Tristam e colab. (Figuras 7 e 8)

2.1 – Resolução a partir do intermediário 5 da síntese de Pfister e colab., utilizando (-)-feniletilamina para resolver 9 (Figura 7).

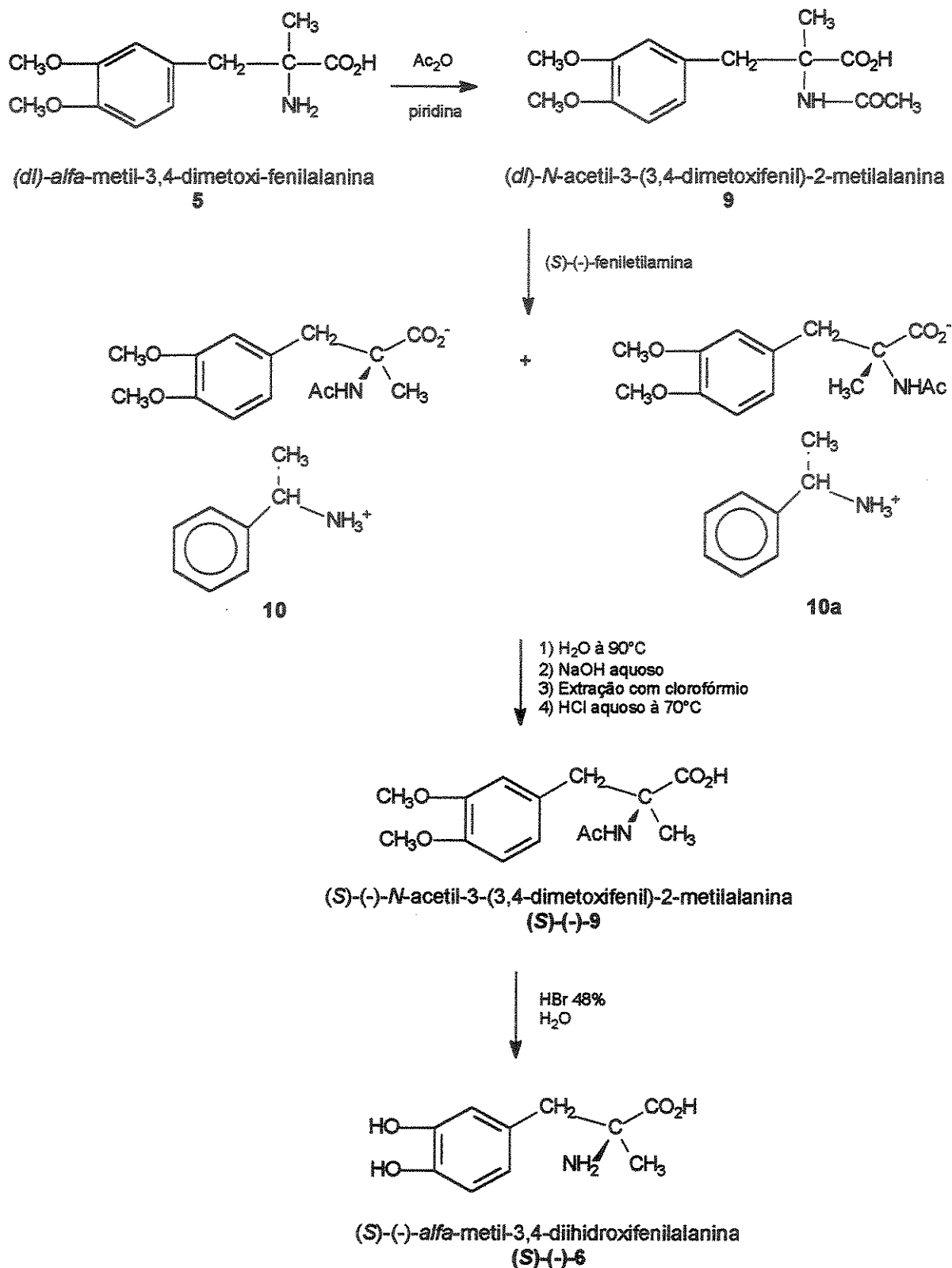
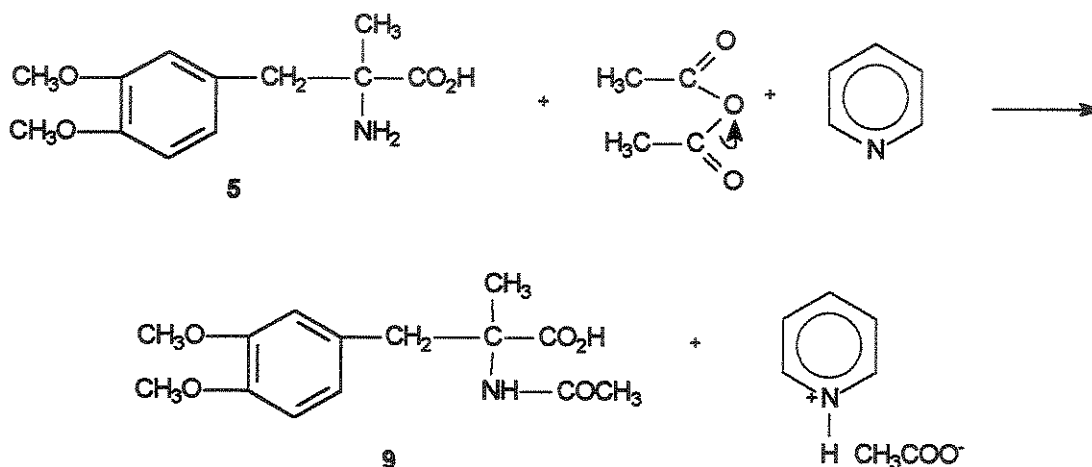


Figura 7. Resolução a partir do intermediário 5 da síntese de Pfister e colab., utilizando (-)-feniletilamina para resolver 9

Na Figura 7 segue a primeira seqüência de reações para a resolução de α -metildopa. O composto **5** racêmico é convertido para o derivado *N*-acetilado **9**, sob adição de anidrido acético na presença de piridina. Essa mistura é aquecida à 90°C por 3 horas.

As aminas primárias reagem com anidridos para produzir amidas. Esta reação é comumente feita com o anidrido acético, que é um agente de acilação barato e conveniente, geralmente usado com piridina para facilitar a saída de CH_3COOH .

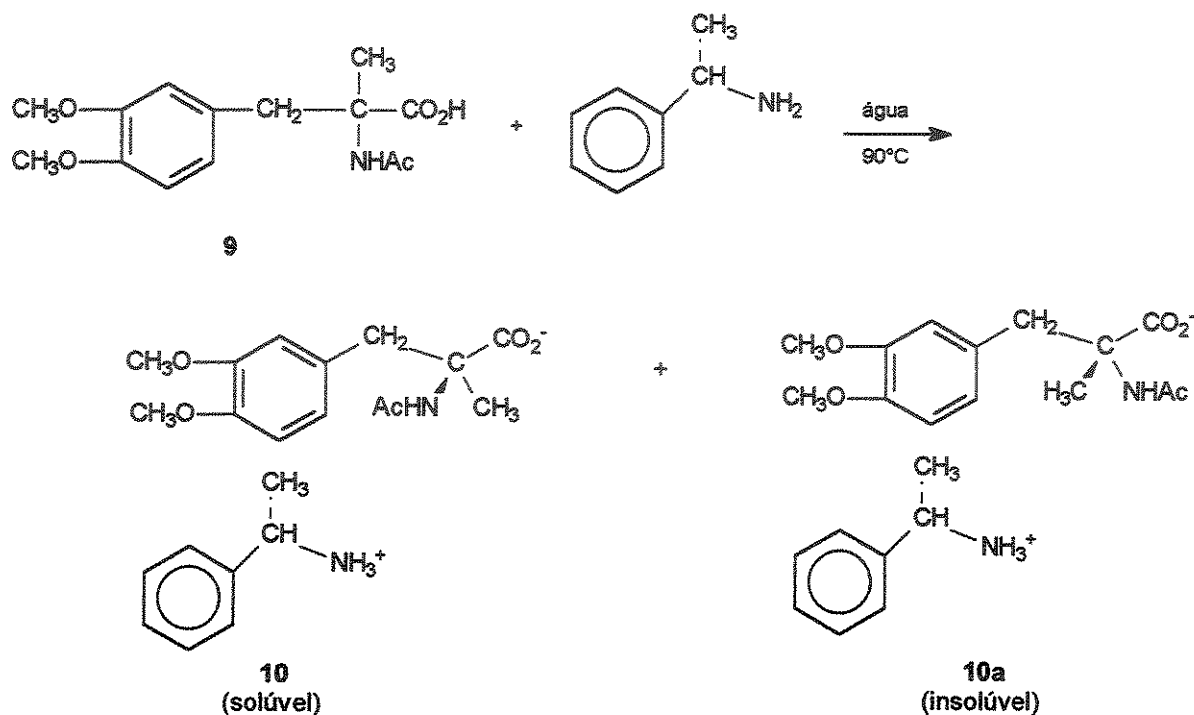
O produto **9** é cristalizado com adição de ácido clorídrico, esse precipitado é envelhecido à 5°C por 1 hora, lavado sucessivas vezes com água e etanol e seco sobre pentóxido de fósforo. No final, **9** apresenta ponto de fusão entre 213 e 215°C.



Esquema da reação de síntese do composto 5 para o composto 9.

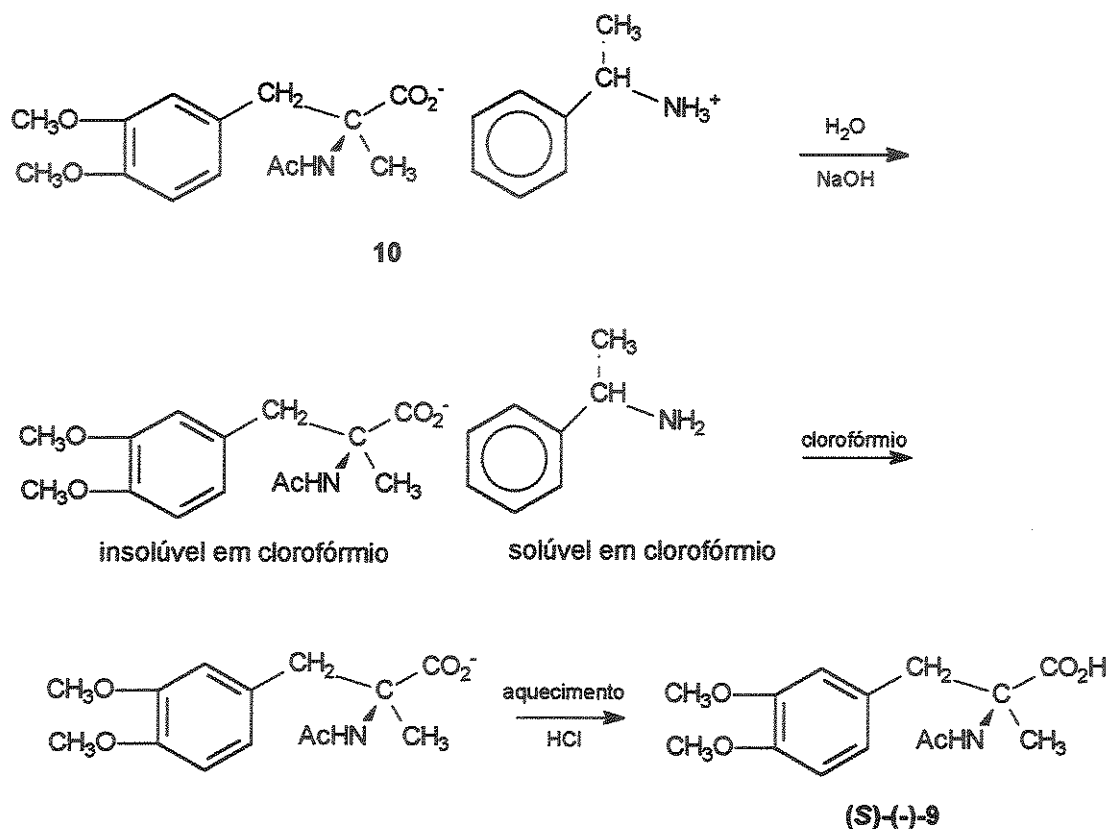
As aminas enantiomericamente puras podem ser usadas para resolver formas racêmicas de compostos ácidos, agindo como agentes de resolução. Neste procedimento, um enantiômero de uma amina, (-)-1-feniletilamina, é adicionado à solução da forma racêmica **9**. Os dois sais que se formam são diastereoisômeros, sendo que o sal correspondente ao isômero *L*- (**10**) é solúvel na água, e o outro correspondente ao isômero *D*- (**10a**) é insolúvel. Assim, adicionando água à 90°C à mistura dos sais, o sal de interesse é dissolvido, e a

solução filtrante obtida é esfriada e envelhecida à 8°C por 40 horas. O sal **10** obtido após o processo de envelhecimento é recristalizado com água, e apresenta ponto de fusão entre 212 e 215°C e $[\alpha]_D^{25} +69^\circ$ (c 1, metanol).



Esquema da reação de síntese do composto 9 para os compostos 10 e 10a.

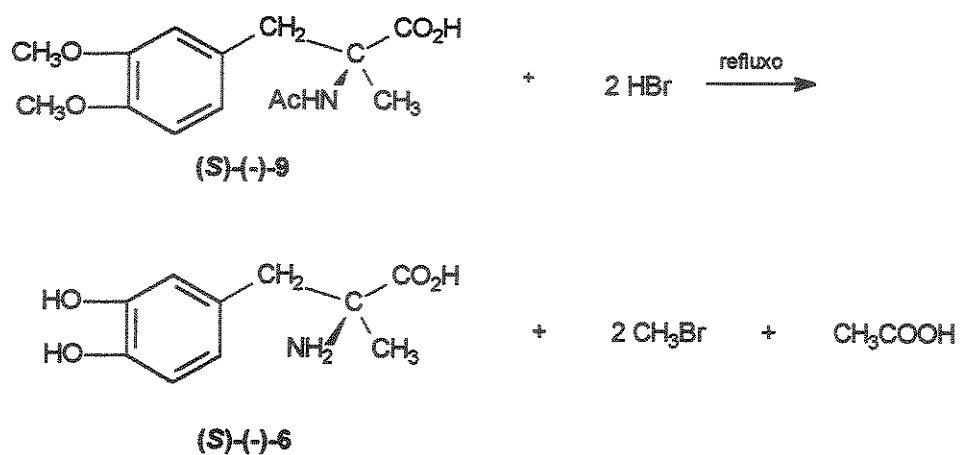
É preparada uma solução aquosa com o sal **10** e adicionado hidróxido de sódio recuperando o agente resolutor que é insolúvel na água, enquanto que o aminoácido permanece solúvel na forma de ânion. A solução sofre extração com clorofórmio, após é aquecida, e HCl diluído é adicionado para a liberação do enantiômero desejado (**S**)-(-)-**9**, que é imediatamente cristalizado, e apresenta ponto de fusão entre 192 e 194°C $[\alpha]_D^{25} -55^\circ$ (c 1, metanol).



Esquema da reação de síntese do composto 10 para o composto 9.

A desmetilação de (S)-(-)-9 é feita sob refluxo por 12 horas com ácido bromídrico em solução a 48%. O pH é ajustado para 6,4, prevalecendo íons dipolares do aminoácido (S)-(-)-6. Após secagem o sólido (S)-(-)-6, este apresenta ponto de fusão entre 306 e 308°C, $[\alpha]_D^{25} -4^\circ$ (c 2, HCl 0,1 mol/L).

Nesta reação, os grupos metila são substituídos por hidrogênios formando fenol, e o grupo *N*-acetila é hidrolisado na presença de água e calor e íons H_3O^+ .



Esquema da reação de síntese do composto 9 para o composto (S)-(-)-6.

2.2 – Resolução a partir de da própria *d*/ α -metildopa, utilizando (-)-quinina para resolver 11 (Figura 8).

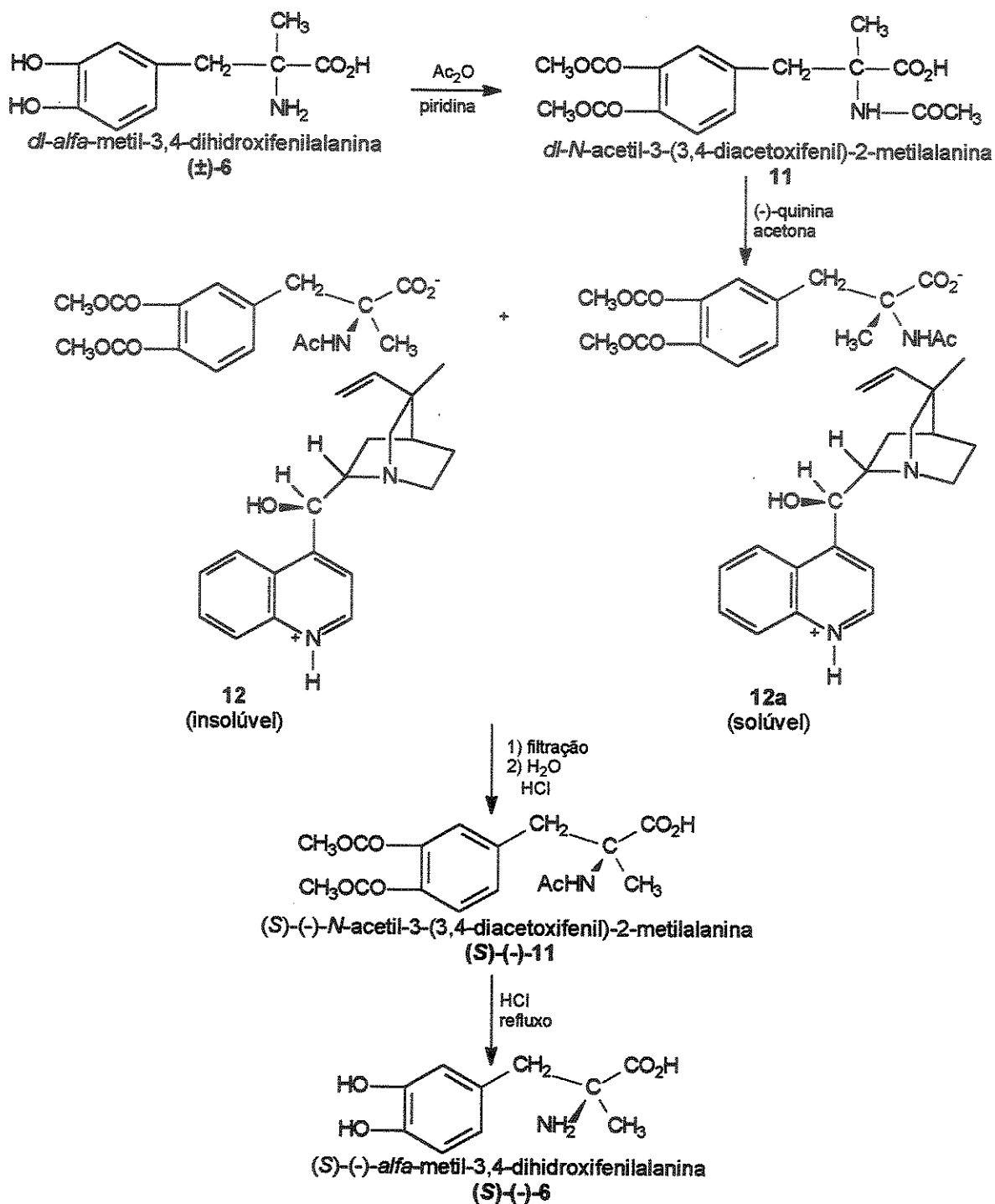
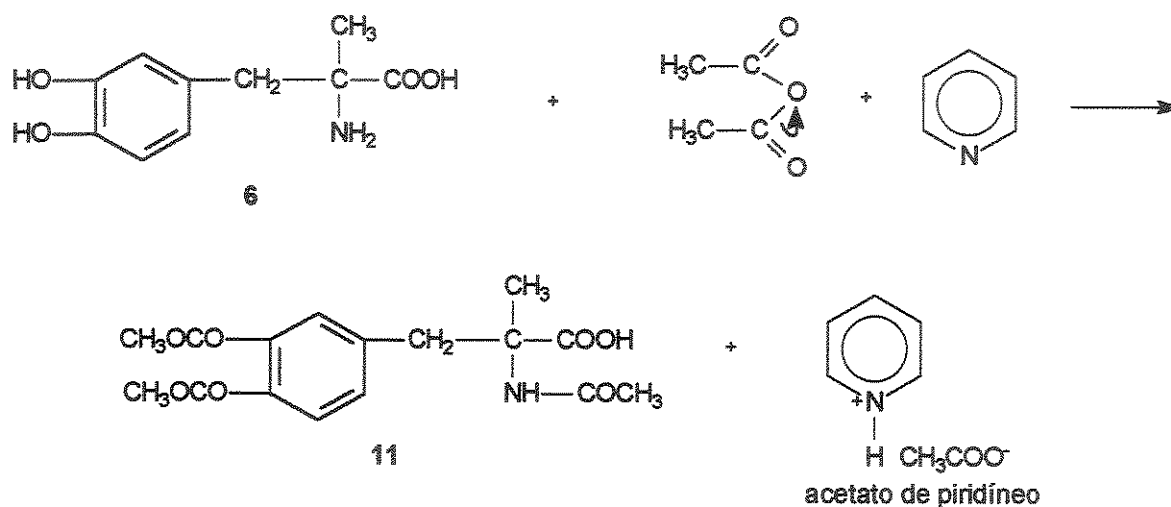


Figura 8. Resolução a partir de da própria *dl*- α -metildopa, utilizando (-)-quinina para resolver 11

Outra opção de resolução de α -metildopa apresentada por Tristam e colab., é apresentada através da Figura 8. Nesta, o composto racêmico **6** é convertido para o derivado *N*-acetilado **11**, sob adição de anidrido acético na presença de

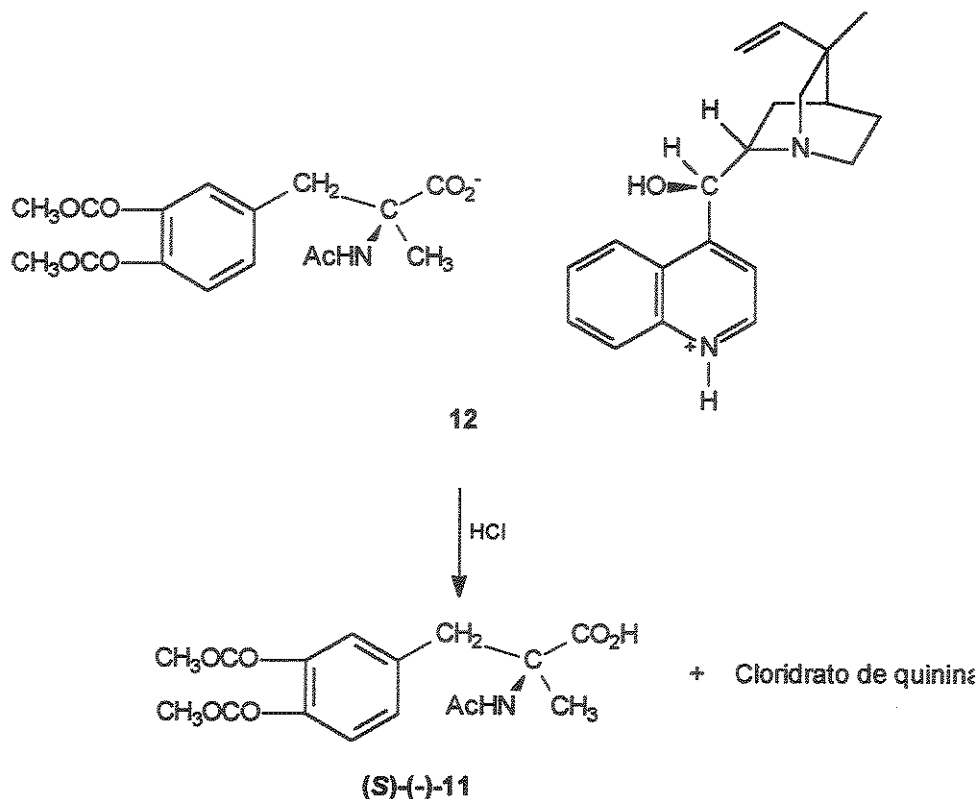
piridina. Essa mistura permanece em banho-maria à 96°C por 3 horas. O produto **11** apresenta ponto de fusão entre 197 e 199°C.



Esquema da reação de síntese do composto 6 para o composto 11.

Aminas oticamente ativas, de ocorrência natural, como a (-)-quinina, são usadas bastante como agentes de resolução. Esta é então utilizada para reagir com **11** na presença de acetona, resulta nos sais diastereoisômeros referentes aos enantiômeros *L*- e *D*-, sendo que este último é um cristal solúvel em acetona. Devido ao sal do enantiômero desejado (forma *L*-) ser cristalino e insolúvel em acetona, é filtrado e seco, e apresenta ponto de fusão entre 164 e 166°C e $[\alpha]_D^{25} - 72,7^\circ$ (c 1, etanol 96%).

É preparada uma solução em ácido clorídrico com o sal **12** à 0-5°C. Após, é adicionado mais ácido clorídrico, recuperando o composto (**S**)-(-)-**11** que precipita, permanece em repouso durante uma noite à 0-5°C, é filtrado, lavado com água e seco. (**S**)-(-)-**11** apresenta ponto de fusão entre 181 e 183°C e $[\alpha]_D^{25} - 74,5^\circ$ (c 1, etanol 96%).



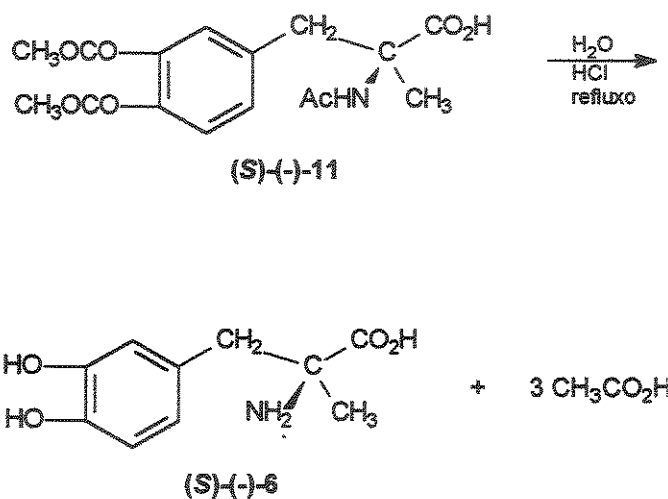
Esquema da reação de síntese do composto 12 para o composto (S)-(-)-11.

A desmetilação de (S)-(-)-11 é feita sob refluxo com ácido clorídrico, obtendo-se um óleo residual que é tratado com álcool t-butílico para remover o HCl. Após dissolução com água, ajusta-se o pH para 7,0, ponto isoelétrico de (S)-(-)-11. (S)-(-)- α -metildopa é então produzida, purificada com dióxido de enxofre, com ponto de fusão em torno de 295°C e $[\alpha]_D^{25} -3^\circ$ (c 2, HCl 0,1 mol/L).

A hidrólise de ésteres é normalmente catalisada por ácidos, que deixam o carbono da carbonila mais positivo e portanto, mais susceptível ao ataque pelo nucleófilo.

A única reação de substituição nucleofílica do grupo acila que uma amida sofre é hidrólise. Amidas são consideravelmente estáveis em água, mas a ligação amida é rompida sob aquecimento na presença de ácidos fortes. Conseqüentemente, este rompimento produz uma amina e um ácido carboxílico.

A reação ácido-base que ocorre após rompimento da ligação amida torna a hidrólise totalmente irreversível.



Esquema da reação de síntese do composto (S)-(-)-11 para o composto (S)-(-)-6.

3. Síntese de acordo com Slaters e colab.: conversão de (R)-(+)- α -metildopa no seu precursor 3,4-dimetoxifenilacetona (3) como mostra a Figura 9 .

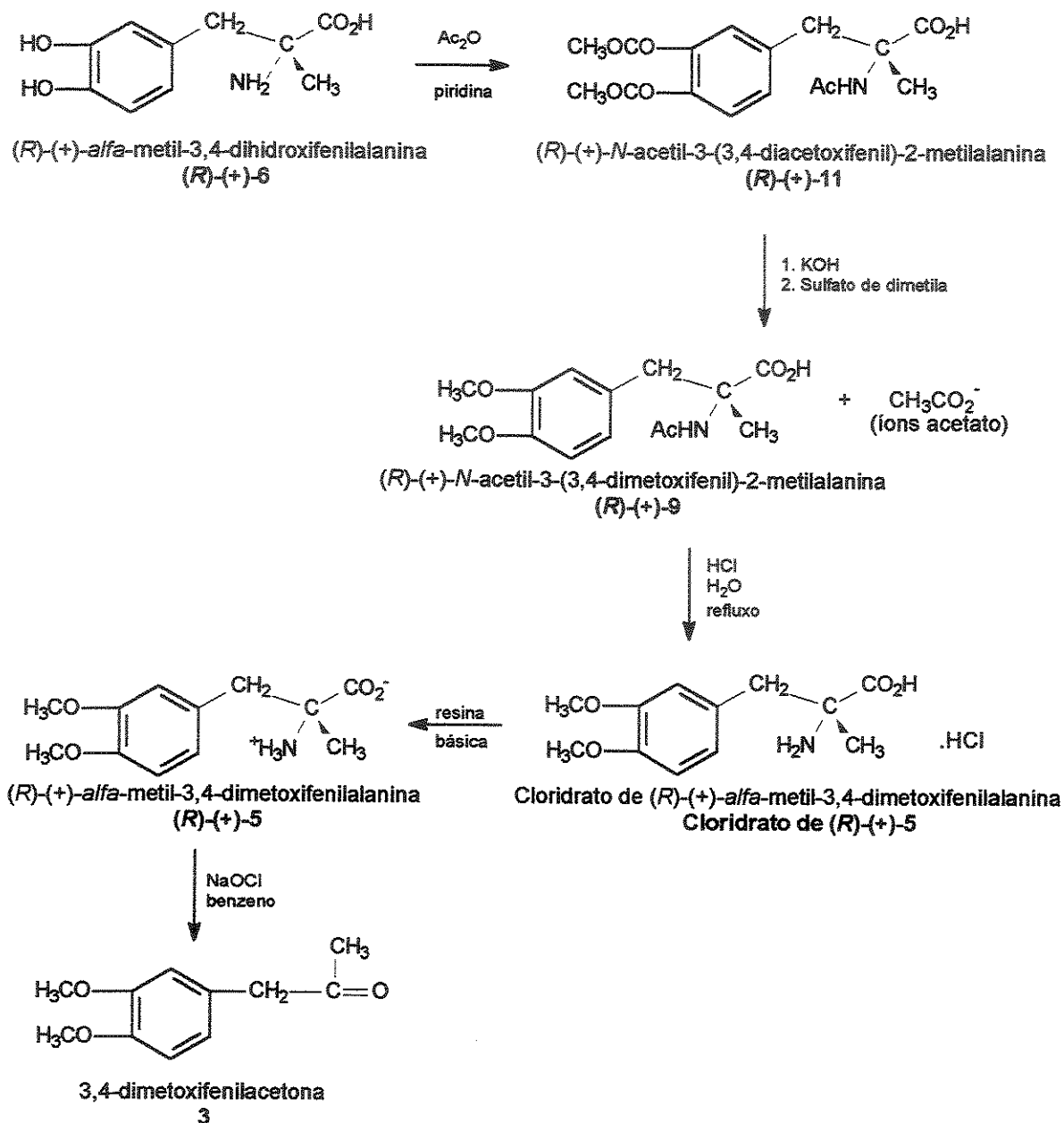
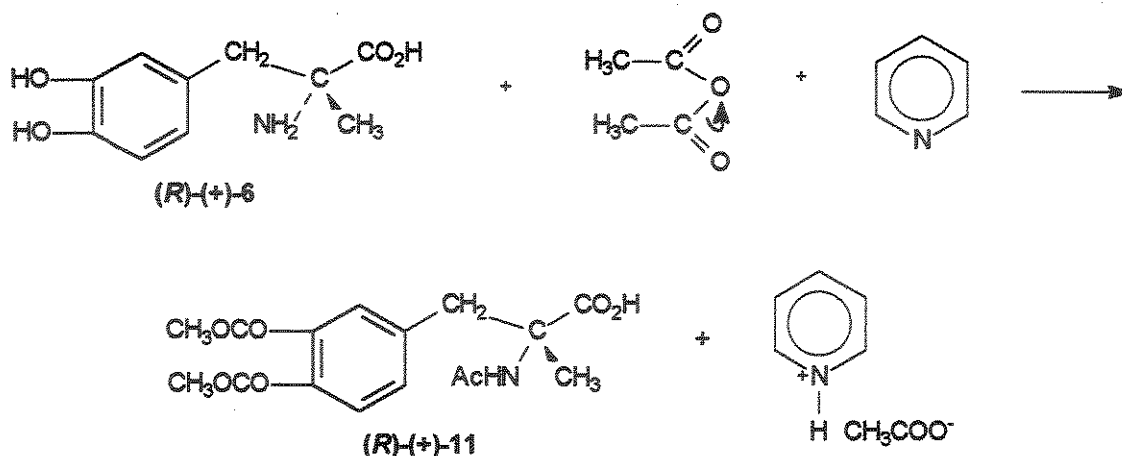


Figura 9. Síntese de acordo com Slates e colab.: conversão de (R)-(+)- α -metildopa no seu precursor 3,4-dimetoxifenilacetona (3)

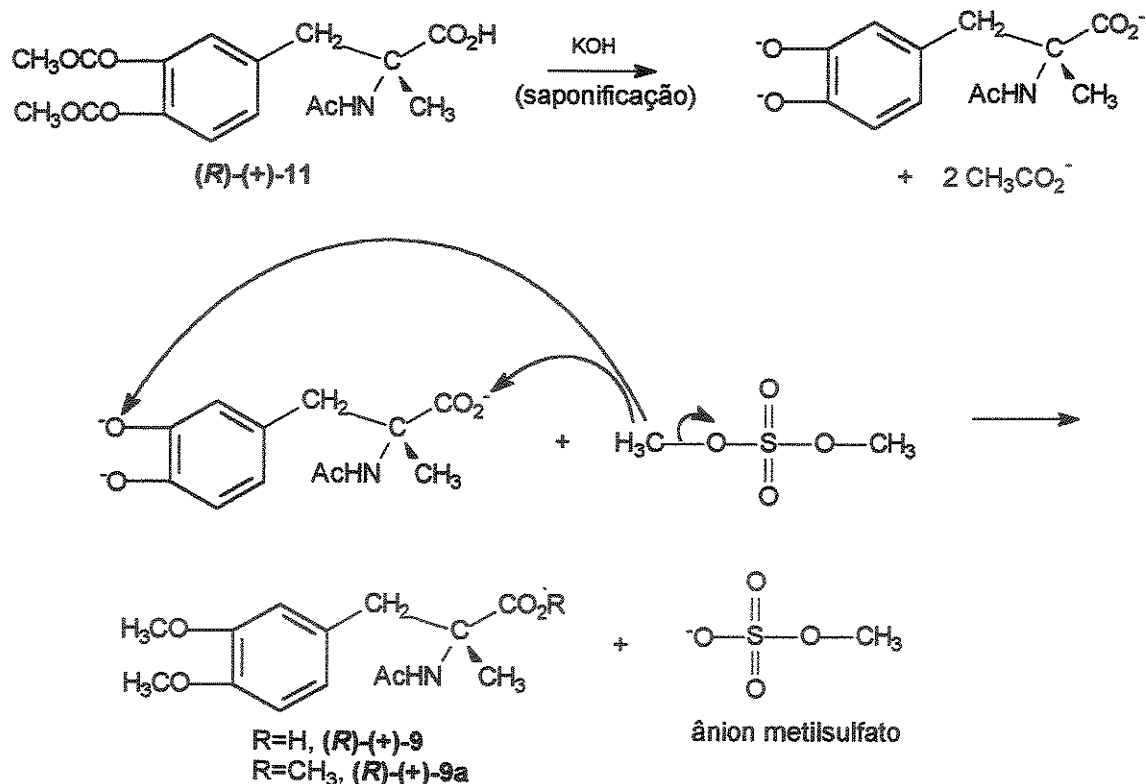
A partir de (R)-(+)-6 há a conversão para o derivado N-acetilado (R)-(+)-11, sob adição de anidrido acético na presença de piridina. A mistura de reação é mantida à temperatura ambiente por 16 horas. O produto é cristalizado com adição de ácido clorídrico formando (R)-(+)-11, apresentando ponto de fusão entre 178 e 180°C e $[\alpha]_D -45,6^\circ$ (acetona).



Esquema da reação de síntese do composto (R)-(-)-6 para o composto (R)-(-)-11.

O composto (R)-(+)-11 é então metilado com dimetil sulfato e KOH produzindo 95% de (R)-(+)-9 + 5% do correspondente metil éster (R)-(+)-9a.

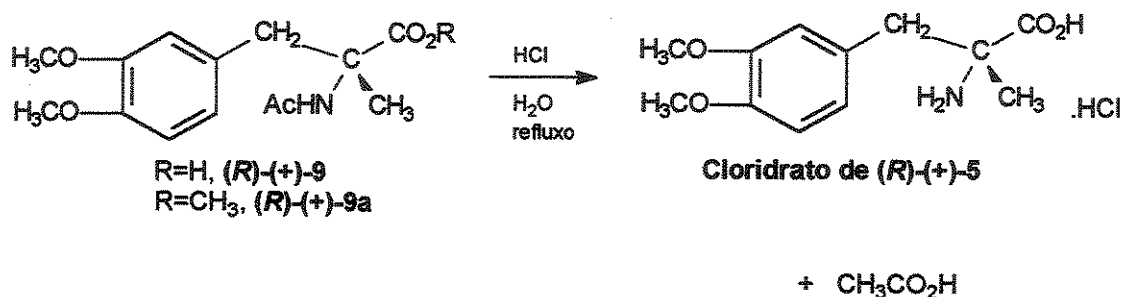
Para a preparação de éter metílico, sulfato de dimetila é freqüentemente usado substituindo os haletos de metila mais caros. Nucleófilos atacam dimetilsulfato no carbono num processo S_N2 . O KOH aquoso adicionado nesta reação é um reagente saponificante utilizado para favorecer a reação de substituição.



Esquema da reação de síntese do composto (R)-(-)-11 para o composto (R)-(-)-9.

Os produtos (R)-(+)-9 e (R)-(+)-9a sofrem hidrólise sob refluxo com HCl para cloridrato de α -metildopa dimetilica, com ponto de fusão entre 235 e 238°C.

A amida sofre hidrólise num mecanismo já explicado anteriormente.



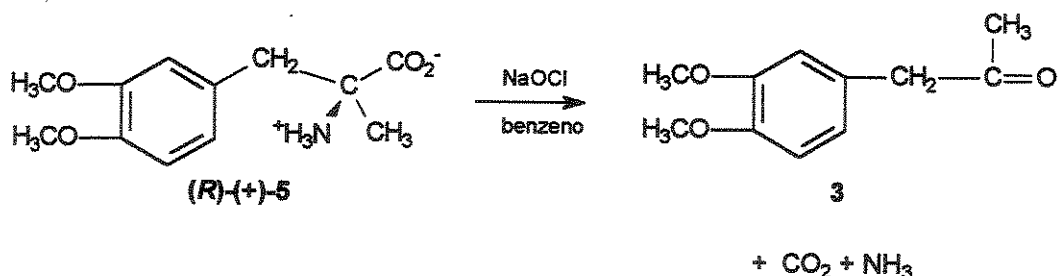
Esquema da reação de síntese do composto (R)-(-)-9 para o Composto Cloridrato de (R)-(-)-5.

O cloridrato de $(R)\text{-(+)-5}$ é submetido a uma resina básica. Se uma solução ácida, contendo aminoácidos, passar através de uma coluna recheada por resina trocadora de cátions, os aminoácidos são adsorvidos na resina, pela ação das forças atrativas entre os grupos sulfonato da resina, com carga negativa e os aminoácidos, com carga positiva. Com filtração da resina, o filtrado contém os aminoácidos $(R)\text{-(+)-5}$ livres que apresentam ponto de fusão entre 246 e 249°C. Após recristalização com álcool isopropílico o aminoácido apresenta ponto de fusão entre 250 e 254°C.



Esquema da reação de síntese do composto Cloridrato de $(R)\text{-(+)-5}$ para o composto $(R)\text{-(+)-5}$.

A transformação de $(R)\text{-(+)-5}$ para a cetona **3** é efetuado por oxidação com hipoclorito de sódio com 90% de rendimento.



Esquema da reação de síntese do composto $(R)\text{-(+)-5}$ para o composto **3.**

4. Síntese de acordo com Slaters e colab.: conversão do precursor $(S)\text{-(+)-5}$ de $(S)\text{-(+)-}\alpha$ -metildopa para 3,4-dimetoxifenilacetona (3**) como mostra a Figura 10.**

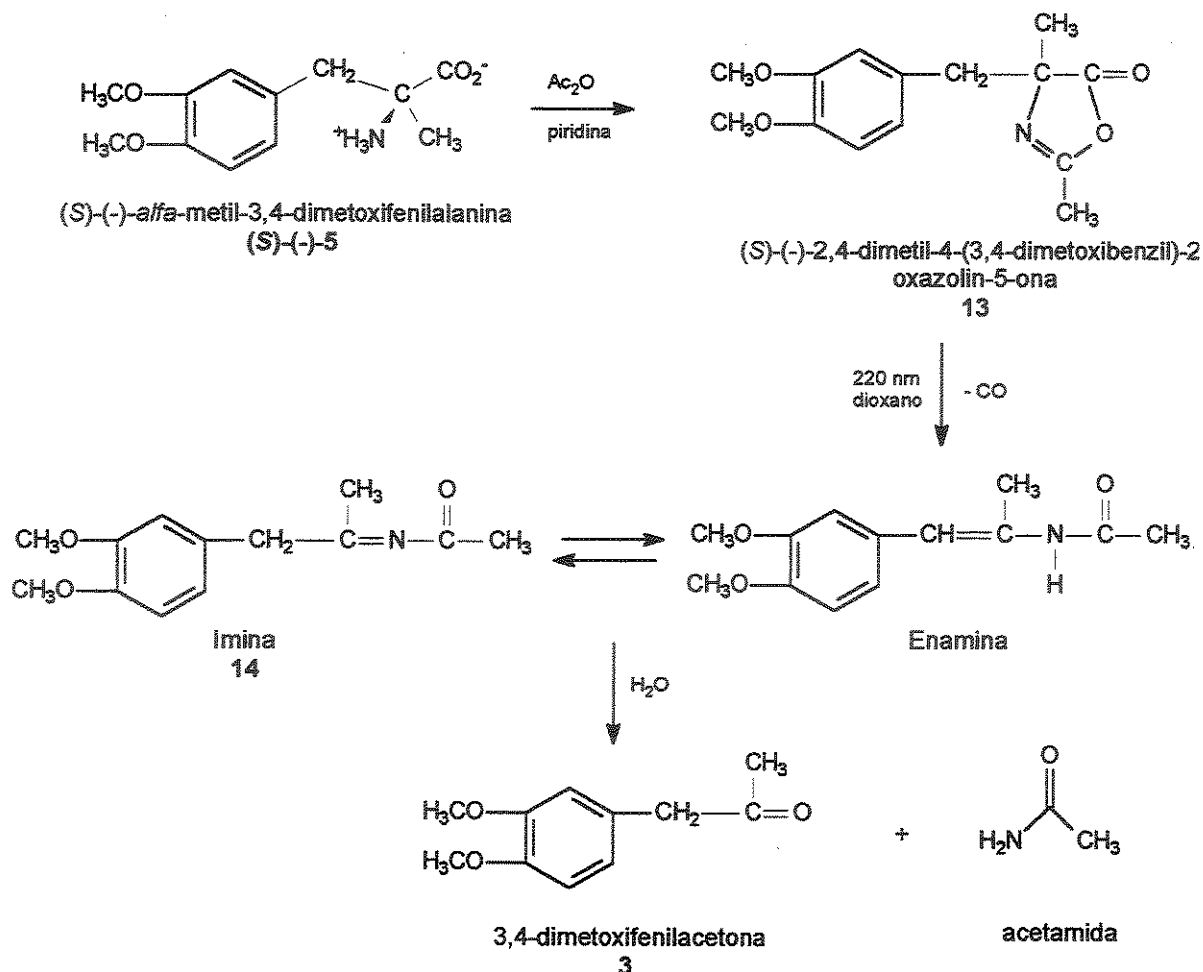
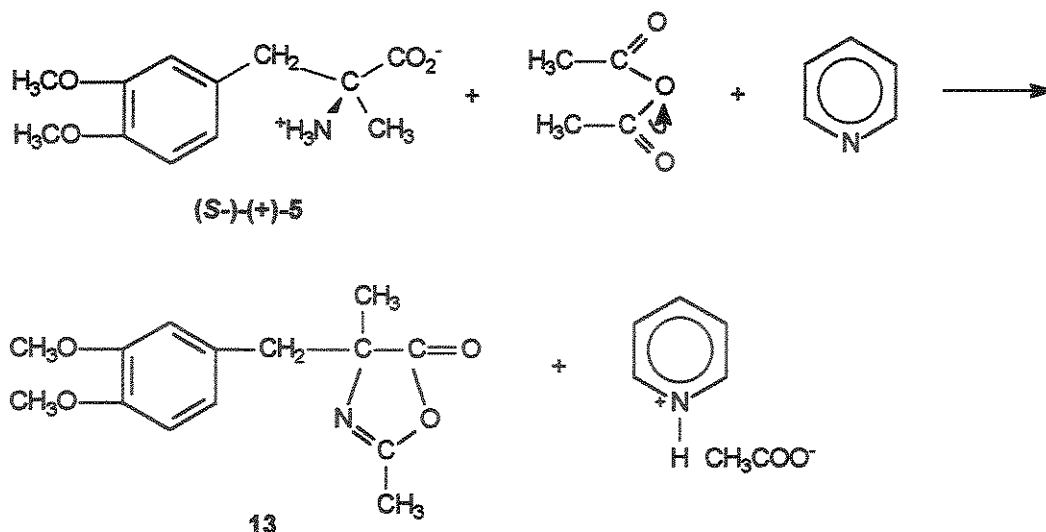


Figura 10. Síntese de acordo com Slates e colab.: conversão do precursor $(S)-(-)\text{-}5$ de $(S)-(-)\text{-}\alpha$ -metildopa para 3,4-dimetoxifenilacetona (3).

A acetilação de $(S)-(-)\text{-}5$ com anidrido acético em piridina produz diretamente a azalactona 13 na ausência de um trabalho hidrolítico.

Durante a acetilação do grupo amino, uma azalactona pode ser formada devido ao excesso de anidrido acético ou a um tempo extenso de reação empregados. Nesse caso, utiliza-se 100 g de composto com 400 mL de anidrido acético, permanecendo esta mistura em descanso durante uma noite. A forma 13 é isolada como um composto cristalino de ponto de fusão $91\text{-}92^\circ\text{C}$ e $[\alpha]_D -84,2^\circ$ (acetona).

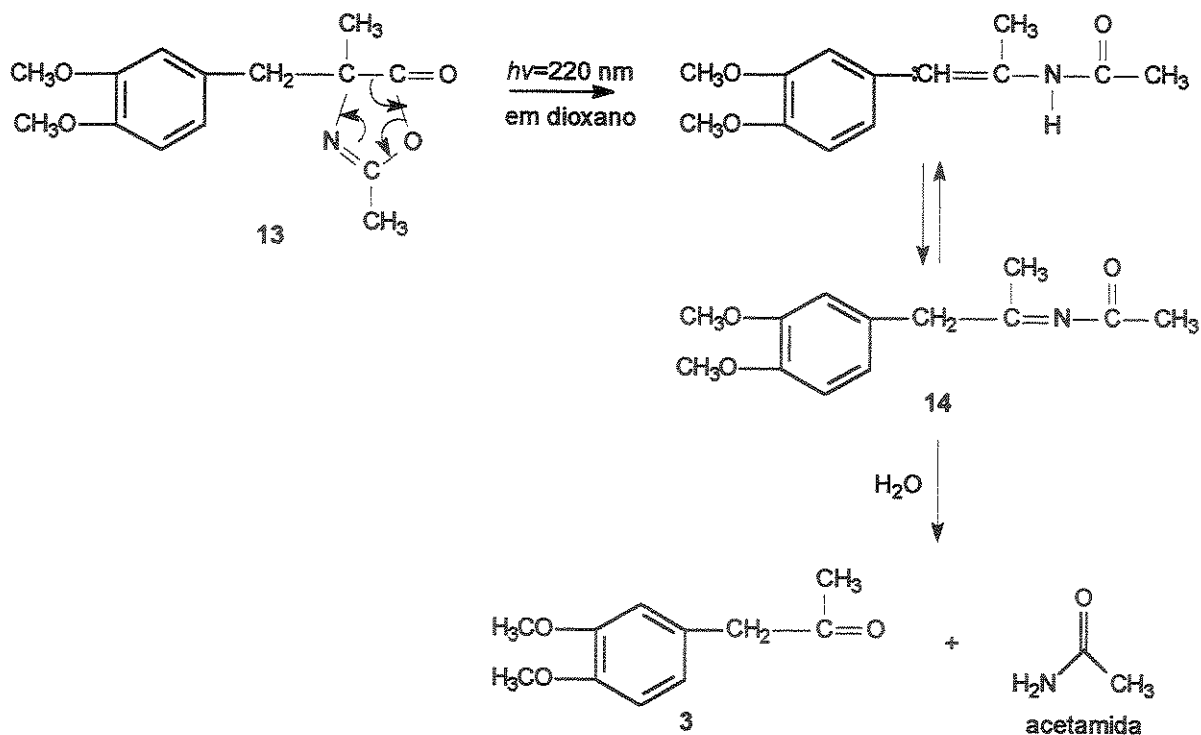


Esquema da reação de síntese do composto (S)-(-)-5 para o composto 13.

A radiação UV em 220 nm sobre a azalactona 13 em solução de dioxano, converte 13 via 14 (ou seu tautômero enamina) para 3,4-dimetoxifenilacetona (3) com liberação de CO. A radiação é interrompida após 3 dias num ponto correspondente a 85% de conversão, e neste ponto a solução perde 85% de sua atividade ótica.

A energia de luz entre 600 e 200 nm é de 48 a 96 kcal mol⁻¹ (200-400 kJ mol⁻¹), que é da ordem de magnitude de energias de ligações covalentes. Ao incidir uma radiação ultravioleta sobre uma molécula poderá ocorrer uma clivagem fotoquímica com formação de radical formando outra molécula. Isso ocorre pois com a excitação de uma molécula a energia extra deve ser perdida, sendo uma das maneiras a reação química.

Na obtenção final, a hidrólise da imina produz a cetona.



Esquema da reação de síntese do composto 13 para o composto 3.

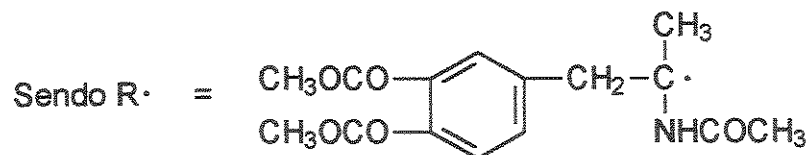
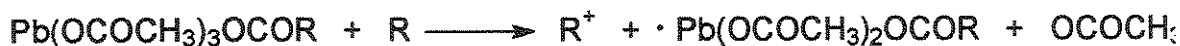
5. Síntese de acordo com Slaters e colab.: conversão do composto derivado de α -metildopa, o triacetato de α -metildopa 11 para 3,4-dimetoxifenilacetona (3) como mostra a Figura 11 .

A reação para o precursor cetona é efetuada por oxidação com tetracetato de chumbo do composto 11 em solução de acetonitrila e piridina.

Ácidos carboxílicos são descarboxilados com tetracetato de chumbo. O mecanismo é do tipo radical-livre (Solomons, 1996). Primeiramente há um intercâmbio de grupos ésteres:



Segue-se o mecanismo do radical-livre:



O tetracetato de chumbo fornece bons resultados em solventes orgânicos. No caso foram utilizados a acetonitrila e piridina.

O intermediário acetato de cetimina **15** (ou seu tautômero enamina) é hidrolisado com ácido diluído para fornecer a cetona **16**. A reação mais característica de uma imina é a hidrólise rápida a um composto carbonilado, sendo a reação catalisada por ácidos.

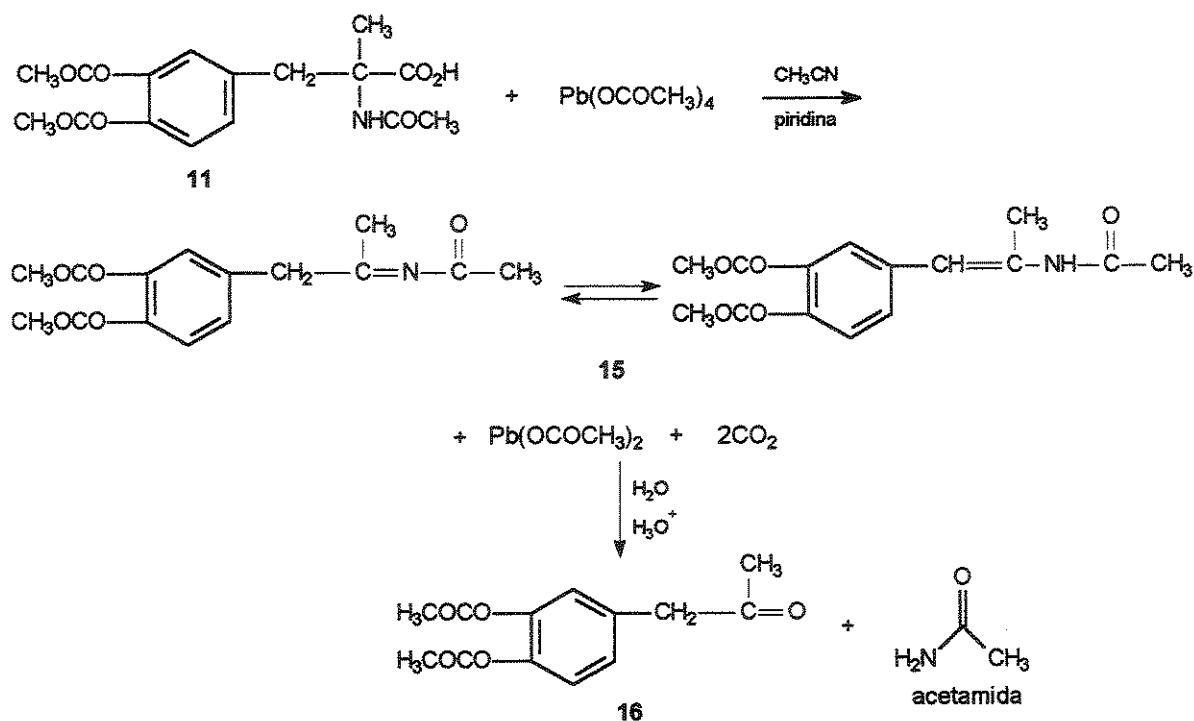


Figura 11. Síntese de acordo com Slaters e colab.: conversão do composto derivado de α -metildopa, o triacetato de α -metildopa **11 para 3,4-dimetoxifenilacetona (**3**)**

6. Síntese, segundo Reinhold e colab., de (S)-(-)- α -metildopa através da resolução do intermediário assimétrico (dl)- α -amino- α -vanililpropionitrila (($\pm$)-18).

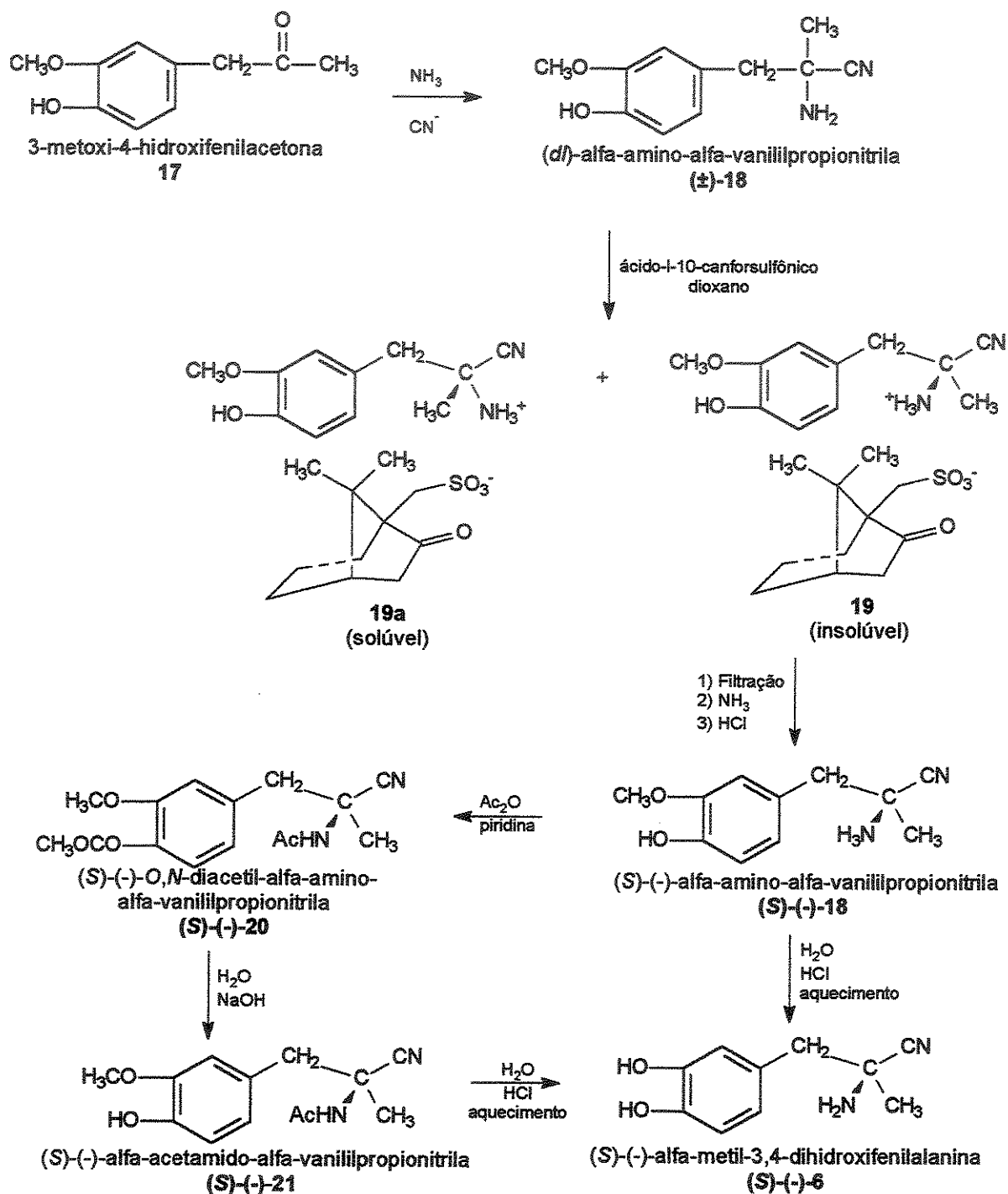
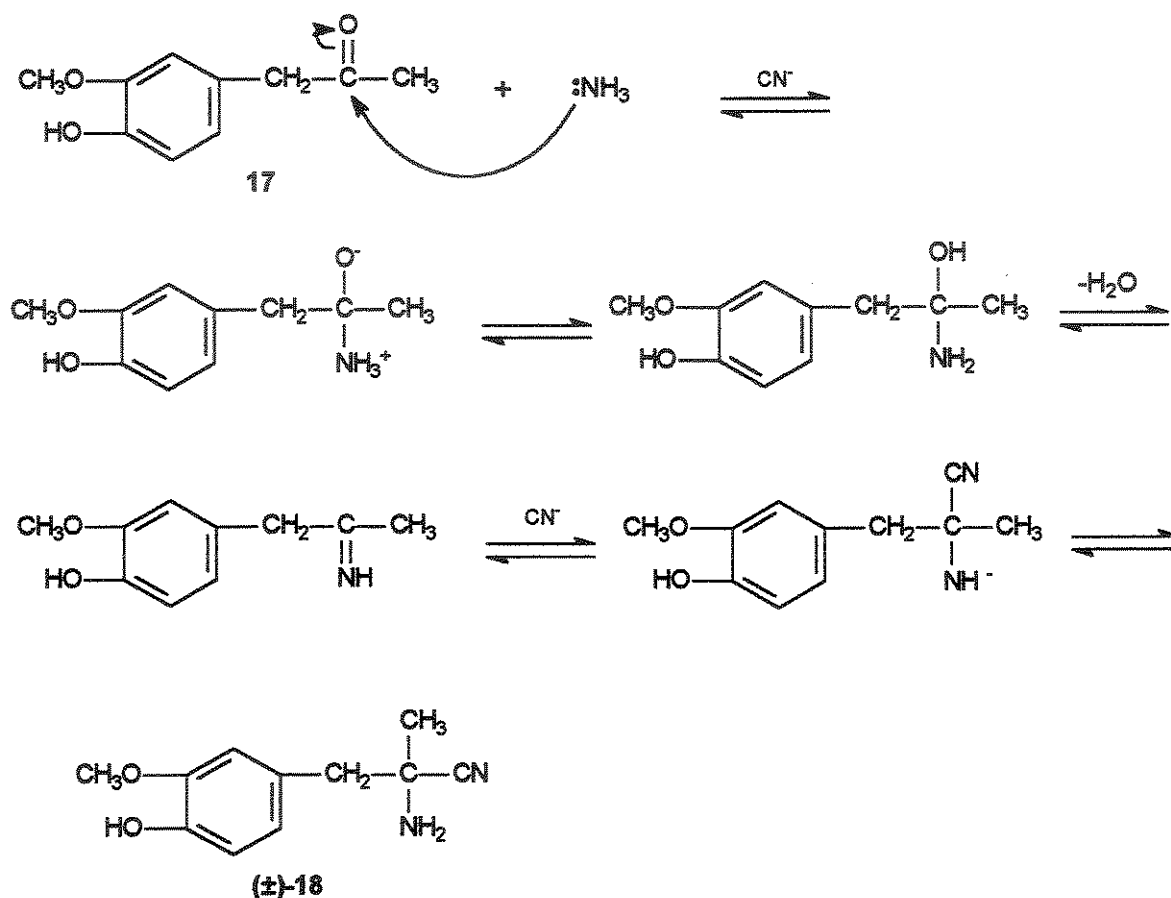


Figura 12. Síntese, segundo Reinhold e colab.

De acordo com a Figura 12, a partir de **17** prepara-se a α -aminonitrila ($\pm$)-**18** com adição de amônia e cianeto de hidrogênio num mecanismo já explicado anteriormente. A mistura deve ser agitada durante 18 horas. O produto apresenta ponto de fusão entre 125,5 e 127°C.

Outro procedimento também a partir de **17** para formar ($\pm$)-**18**, é através da adição de amônia diluída, cianeto de potássio e cloreto de amônio pelo mesmo mecanismo anterior, ou seja, presença de amônia e íons cianeto.

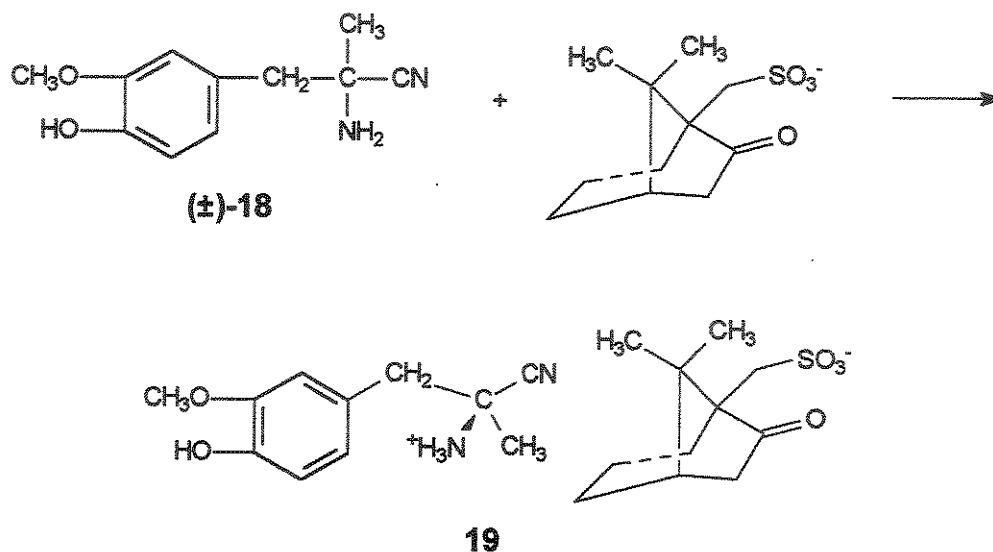


Esquema da reação de síntese do composto **17 para o composto ($\pm$)-**18**.**

Utilizando o agente de resolução ácido (*L*)-10-canforsulfônico para reagir com a aminonitrila ($\pm$)-**18** à 5°C por 16 horas, resulta nos sais diastereoisômeros referentes aos enantiômeros (*L*)- e (*D*)-. No processo de separação dos sais a cristalização foi realizada utilizando dioxano como solvente mais conveniente. O

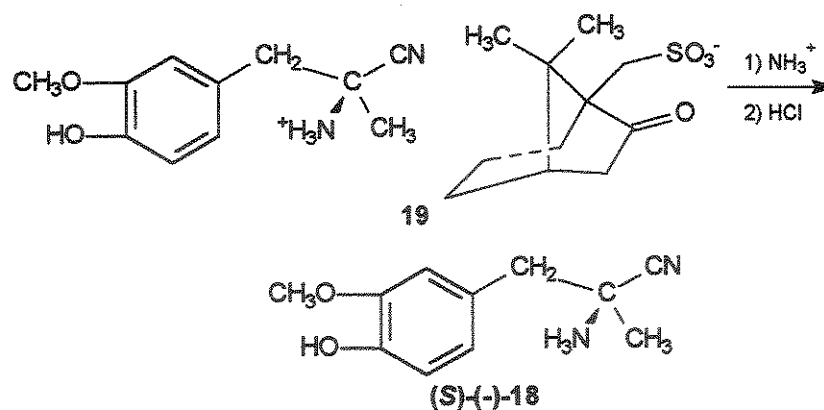
sal do enantiômero desejado **19** (forma (L)-), que é insolúvel em dioxano, é então filtrado.

Normalmente, a cristalização fracionada é necessária e o processo é longo e tedioso. Isso torna o método inconveniente. Este, por exemplo, consiste num processo de digestão por 90 horas.



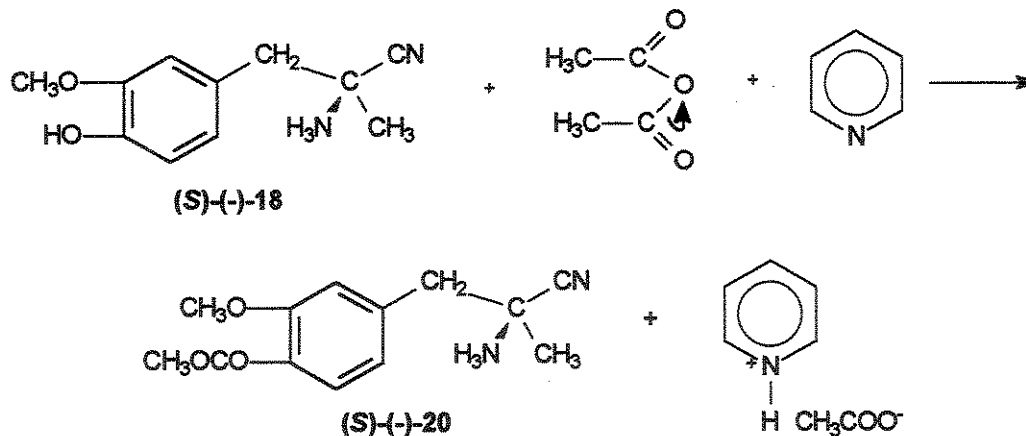
Esquema da reação de síntese do composto (±)-18 para o Composto 19.

É preparada uma solução em éter com o sal **19**. Após, é adicionado vapor de amônia, recuperando o composto ácido (L)-10-canforsulfônico que precipita e é removido por filtração. A solução contendo a aminonitrila resolvida em forma de cátion é adicionada de ácido clorídrico, onde há a recuperação da aminonitrila que precipita como cloridrato de (-)-**18**. Este precipitado é misturado com éter e vapor de amônia com formação de cloreto de amônio, que passa por processo de filtração. O sólido de (-)-**18** apresenta ponto de fusão entre 125 e 128°C e $[\alpha]_D^{25} +8,9^\circ$ (c 2, dioxano).



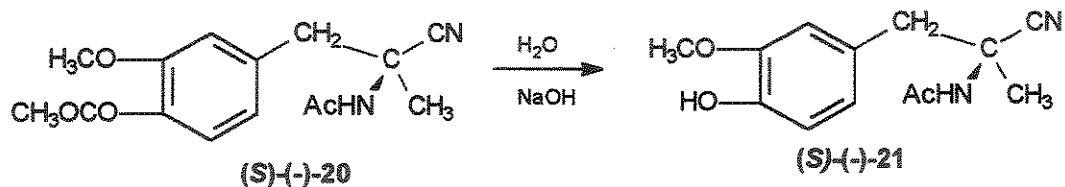
Esquema da reação de síntese do composto 19 para o composto (S)-(-)-18.

O composto (S)-(-)-18 é convertido para o derivado (S)-(-)-20 (ponto de fusão entre 121,5 e 123,5°C) sob adição de anidrido acético na presença de piridina.

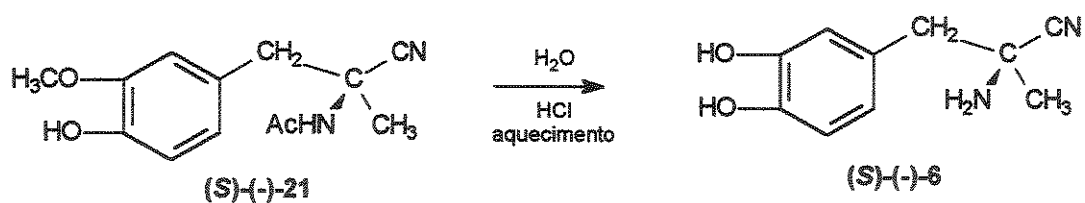


Esquema da reação de síntese do composto (S)-(-)-18 para o composto (S)-(-)-20.

O composto (S)-(-)-20 sofre hidrólise sob adição de NaOH 10% formando (S)-(-)-21 de ponto de fusão entre 204,0 e 206,0°C.

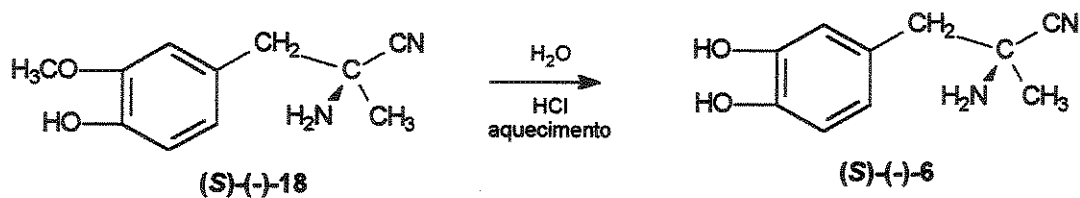


Por fim, o composto **(S)-(-)-21** sofre hidrólise com ácido clorídrico à 130°C por 5 horas produzindo a **(S)-(-)-6** (ponto de fusão entre 302,0 e 304,0°C).



Esquema da reação de síntese do composto (S)-(-)-21 para o composto (S)-(-)-6.

Realizando uma hidrólise com ácido clorídrico 45% do intermediário assimétrico **(S)-(-)-18** também fornece a **(S)-(-)-6**.



Esquema da reação de síntese do composto (S)-(-)-18 para o composto (S)-(-)-6.

7. Síntese de (S)-(-)- e (R)-(+)- α -metildopa segundo Seebach e colab. (Figura 13).

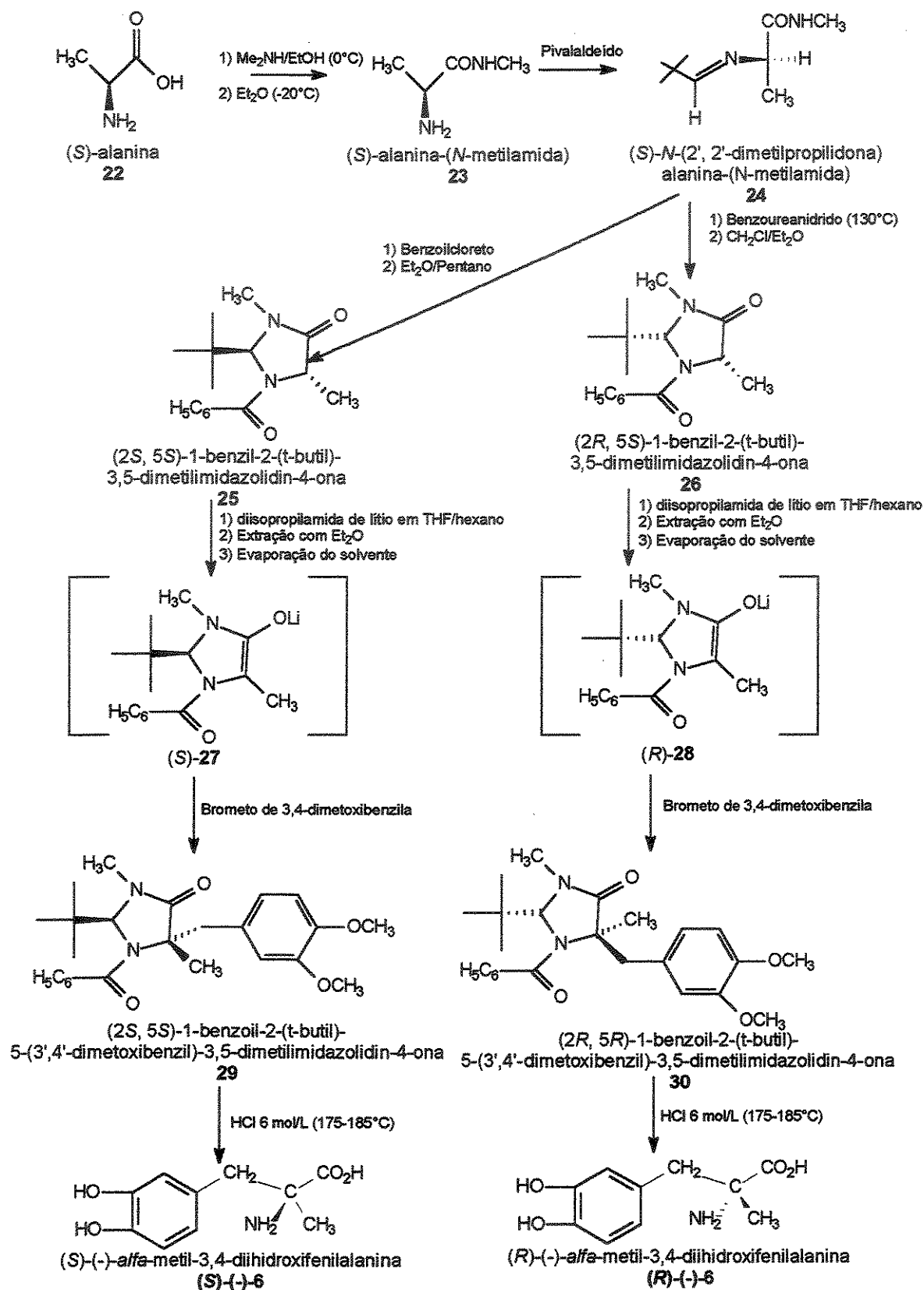


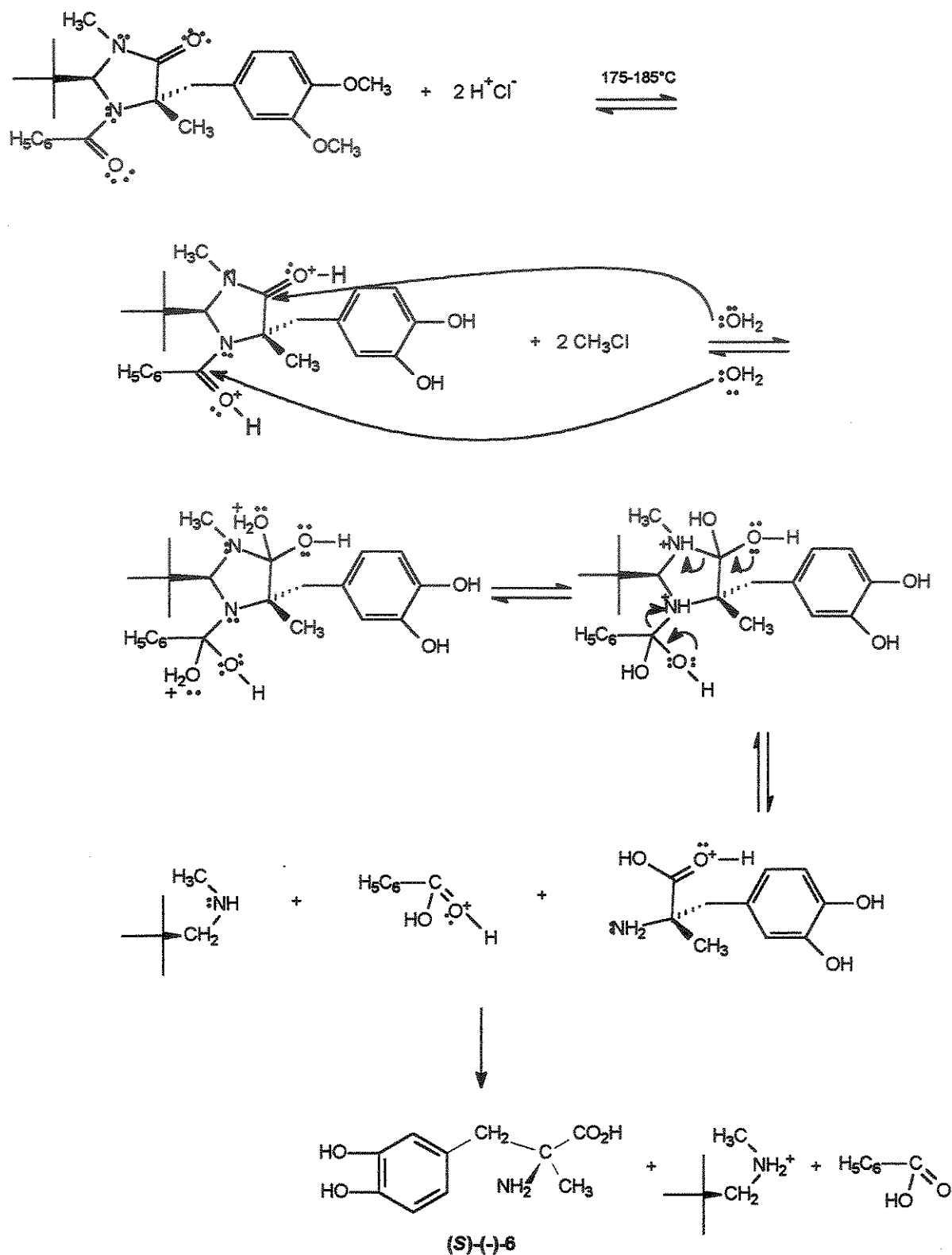
Figura 13. Síntese de (S)-(-)- e (R)-(+)- α -metildopa segundo Seebach e colab.

Seebach e colab. prepararam (S)-(-)- e (R)-(+)- α -metildopa a partir do aminoácido (S)-alanina. Este é convertido para imidazolidinonas quirais que formam enolatos enantiômeros. Cada um é alquilado fornecendo os enantiômeros de imidazolidinonas 5,5-dissubstituídas, que após clivagem do anel heterocíclico e dos grupos metil-éter, formam (S)-(-)- e (R)-(+)- α -metildopa.

A seqüência de reações está esquematizada de acordo com a Figura 13. A primeira reação consiste em converter (S)-alanina **22** para as imidazolidinonas **(2S,5S)-25** e **(2R,5S)-26**. O procedimento pode ser compreendido de acordo com Naef & Seebach (1985).

Em seguida, **(2S,5S)-25** e **(2R,5S)-26** separadamente são dissolvidas em THF e tratadas à -78°C com excesso de diisopropilamida de lítio, formando os enolatos **(S)-27** e **(R)-28** que são alquilados com brometo de 3,4-dimetoxibenzila, passam por processo de cromatografia flash (etanol/pentano 5:1) produzindo respectivamente **(2S,5S)-29** com $[\alpha]_{\text{D}}^{25} +74,9^{\circ}$ (c 0,4, CHCl_3) e **(2R,5R)-30** com $[\alpha]_{\text{D}}^{25} -78^{\circ}$ (c 0,5, CHCl_3).

Finalmente **(2R,5R)-30** sofre hidrólise na presença de HCl 6 mol/L sob aquecimento por 4 horas produzindo cloridrato de **(R)-(+)-6**, enquanto que, pelo mesmo processo **(2S,5S)-29** produz cloridrato de **(S)-(-)-6**. Nesta reação ocorre hidrólise das ligações amida e desmetilação no anel aromático como segue abaixo.



Esquema da reação de síntese do composto 29 para o composto (S)-(-)-6.

Para obter o aminoácido puro, (2*S*,5*S*)-29 e (2*R*,5*R*)-30 são expostos a uma resina trocadora de íons acídica, e os aminoácidos estando na forma de cátions (pH ácido) ficam retidos na resina. Após são realizadas lavagens na resina com solução de NH₃ para liberar o aminoácido. O solvente é removido sob vácuo.

8. Síntese de (S)-(-)- e (R)-(+)- α -metildopa segundo Léon-Romo e colab., a partir de uma hidantoína quiral (Figuras 14 e 14a).

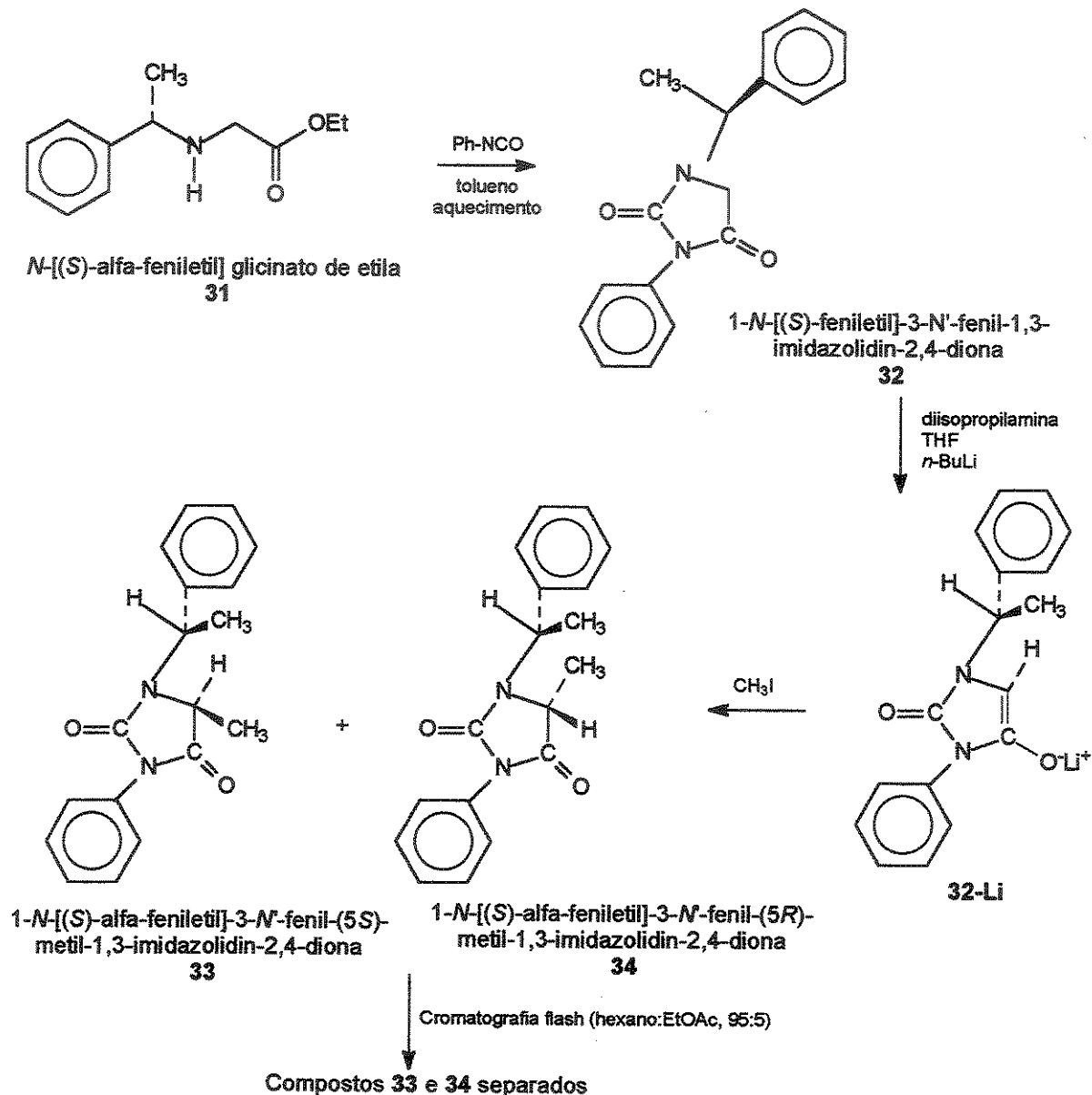


Figura 14. Síntese de (S)-(-)- e (R)-(+)- α -metildopa segundo Léon-Romo e colab. (2002), a partir de uma hidantoína quiral

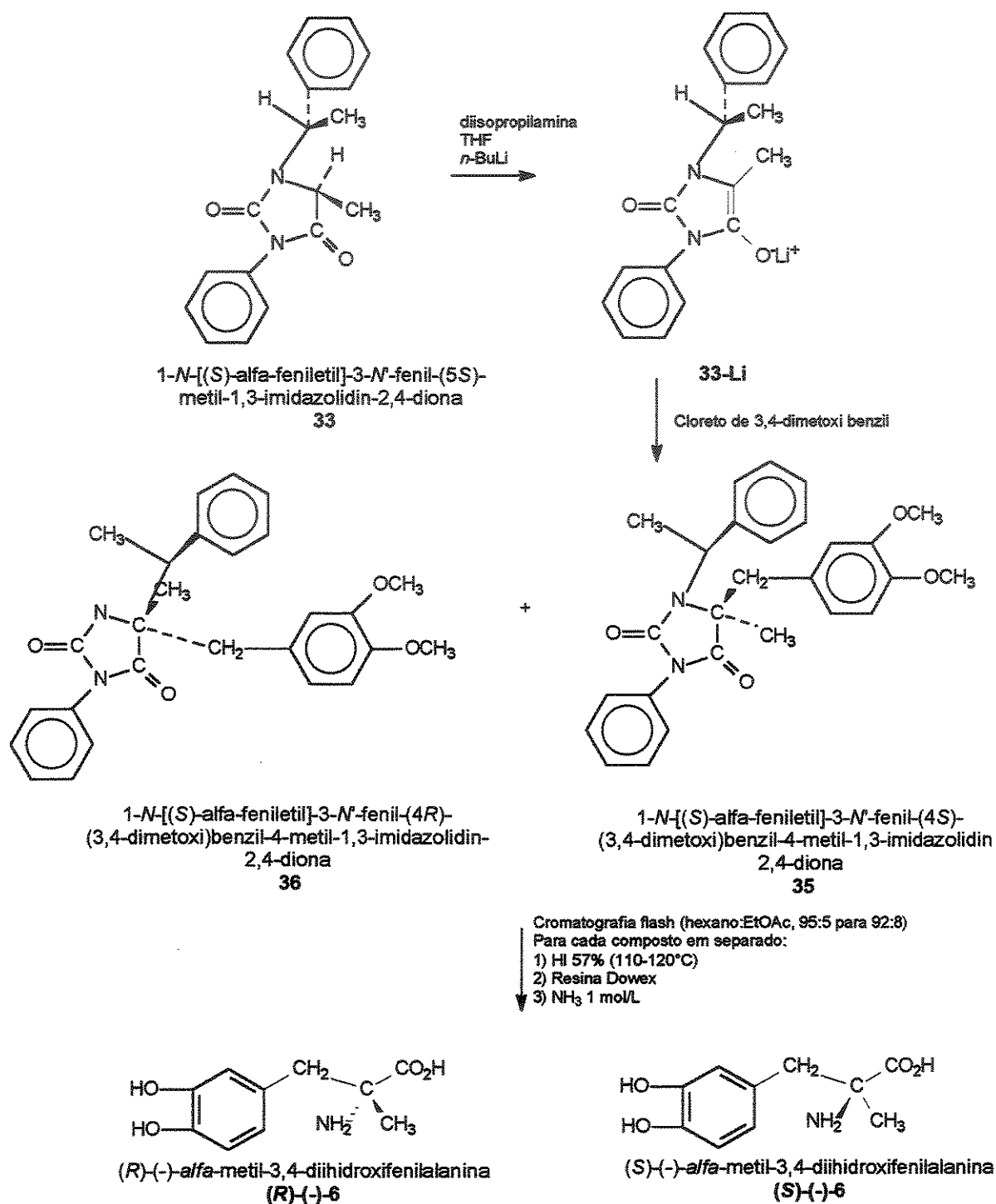
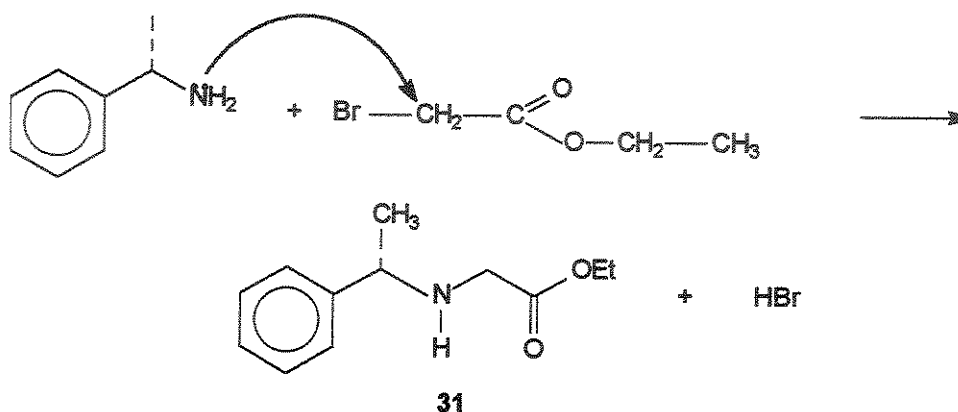


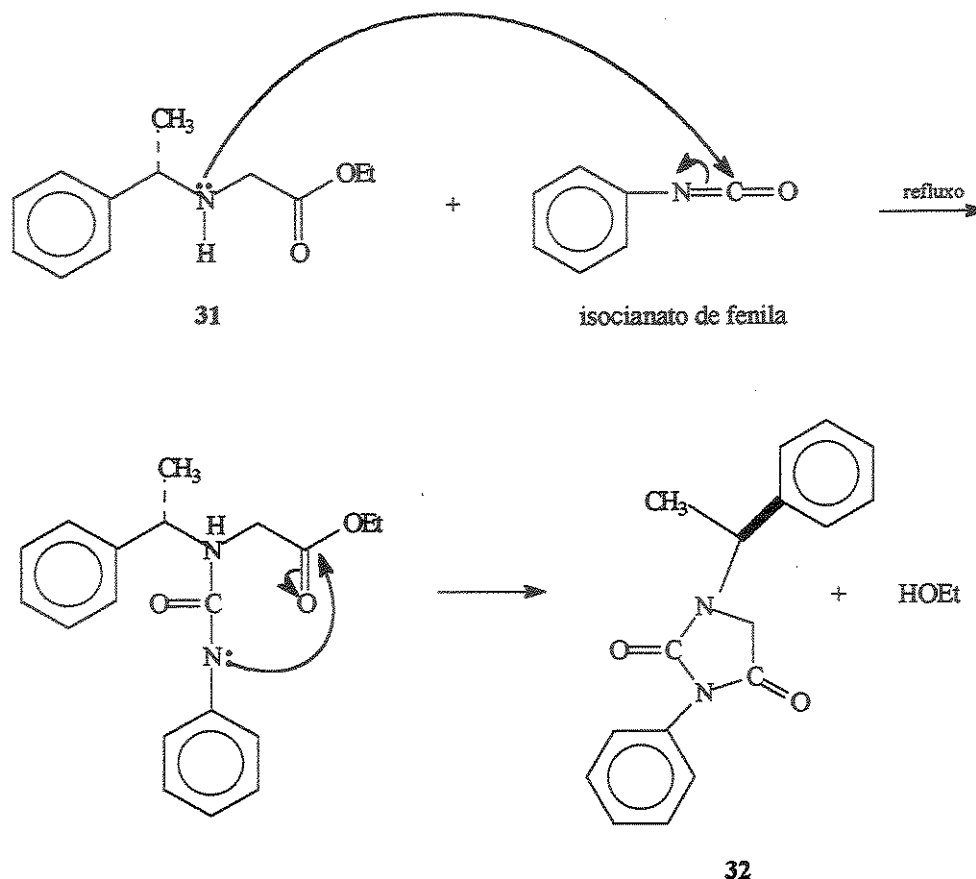
Figura 14a. Síntese de (S)-(-) e (R)-(+)- α -metildopa segundo Léon-Romo e colab. (2002), a partir de uma hidantoína quiral

De acordo com a Figura 14, primeiramente a hidantoína **32** é preparada da reação de isocianato de fenila e **31**. (*S*)-feniletilamina, reage com ($\pm$)-bromoacetato de etila numa reação de substituição nucleofílica resultando no composto **31** (Porzi; Sandri; 1996).

Então o isocianato reage com a amina secundária para produzir a uréia substituída **32**. O grupamento éster sofre substituição nucleofílica sendo que o ataque ocorre no carbono da carbonila, e resulta na substituição do grupo $-OR$ pelo grupo $-NR'$.



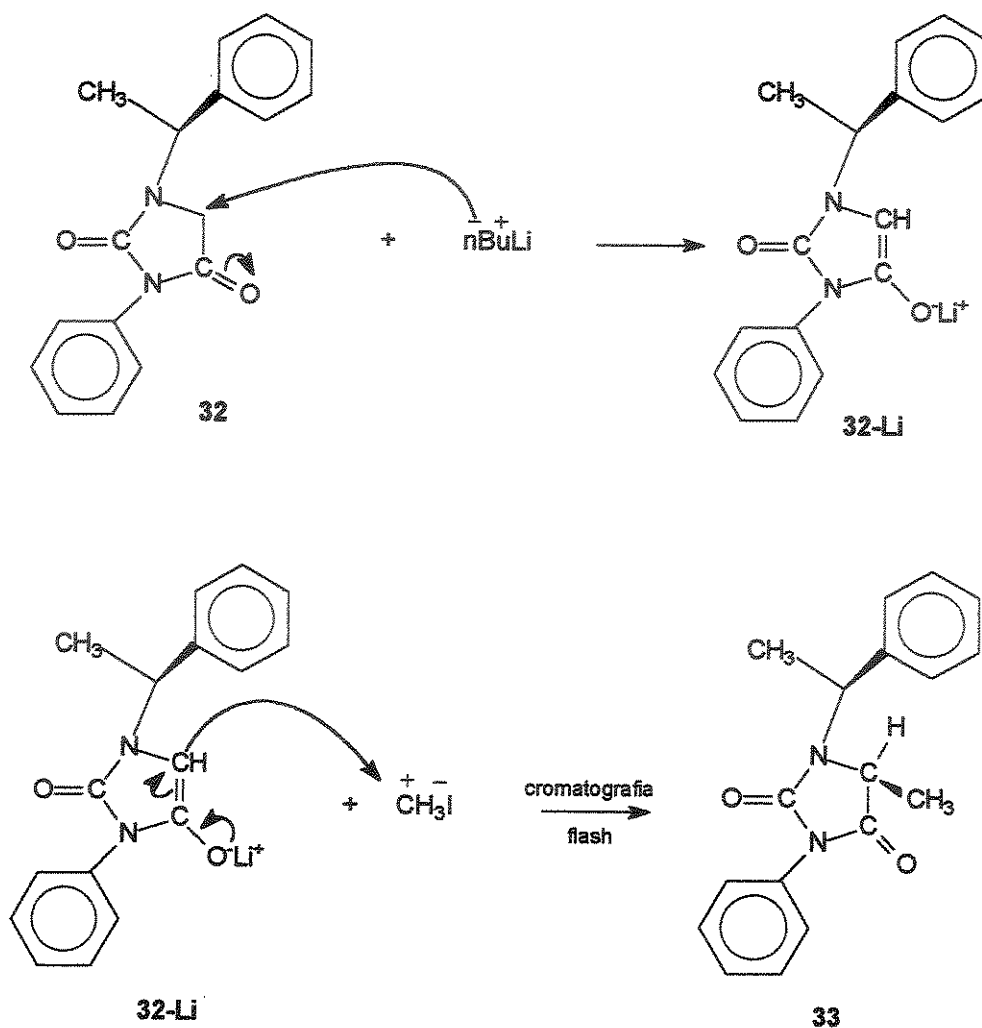
Esquema da reação de síntese do composto(feniletilamina para o composto 31.



Esquema da reação de síntese do composto 31 para o composto 32.

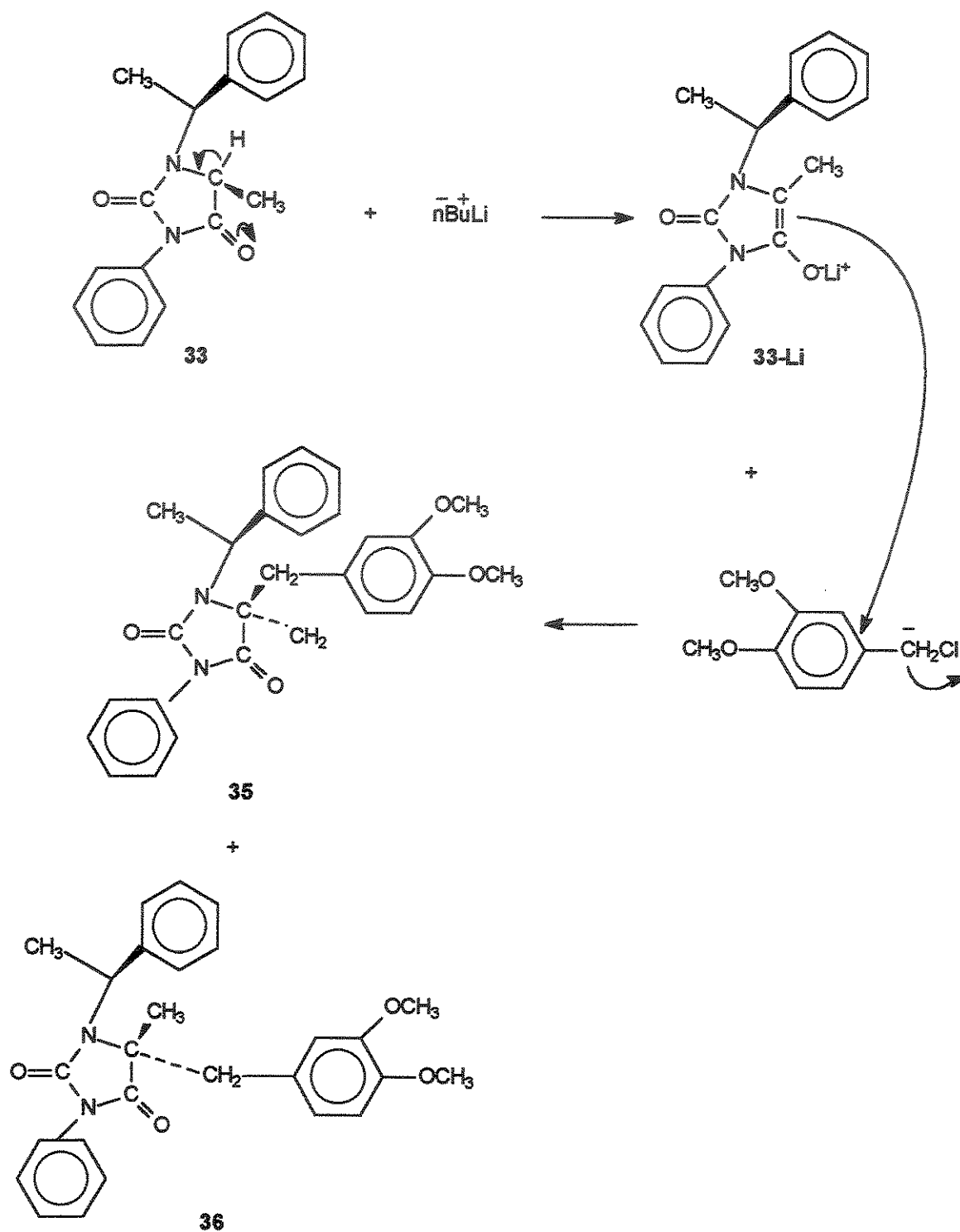
Em seguida a hidantoína **32** é metilada. Primeiro reage com butillítio em diisopropilamina e tetrahydrofurano como solventes. O lítio age como eletrofílico e é adicionado ao oxigênio do grupo carbonila. Os solventes utilizados são compatíveis com o organolítio (Hendrickson e colab., 1970).

Com a formação do enolato de lítio **32-Li**, é adicionado iodometano, numa reação de adição conjugada, produzindo uma mistura diastereoisomérica de 1-N-[(S)- α -feniletil]-3-N'-fenil-(5S)-metil-1,3-imidazolidin-2,4-diona (**33**) e 1-N-[(S)- α -feniletil]-3-N'-fenil-(5R)-metil-1,3-imidazolidin-2,4-diona (**34**), na proporção 93:7, cujos compostos são separados por cromatografia flash.



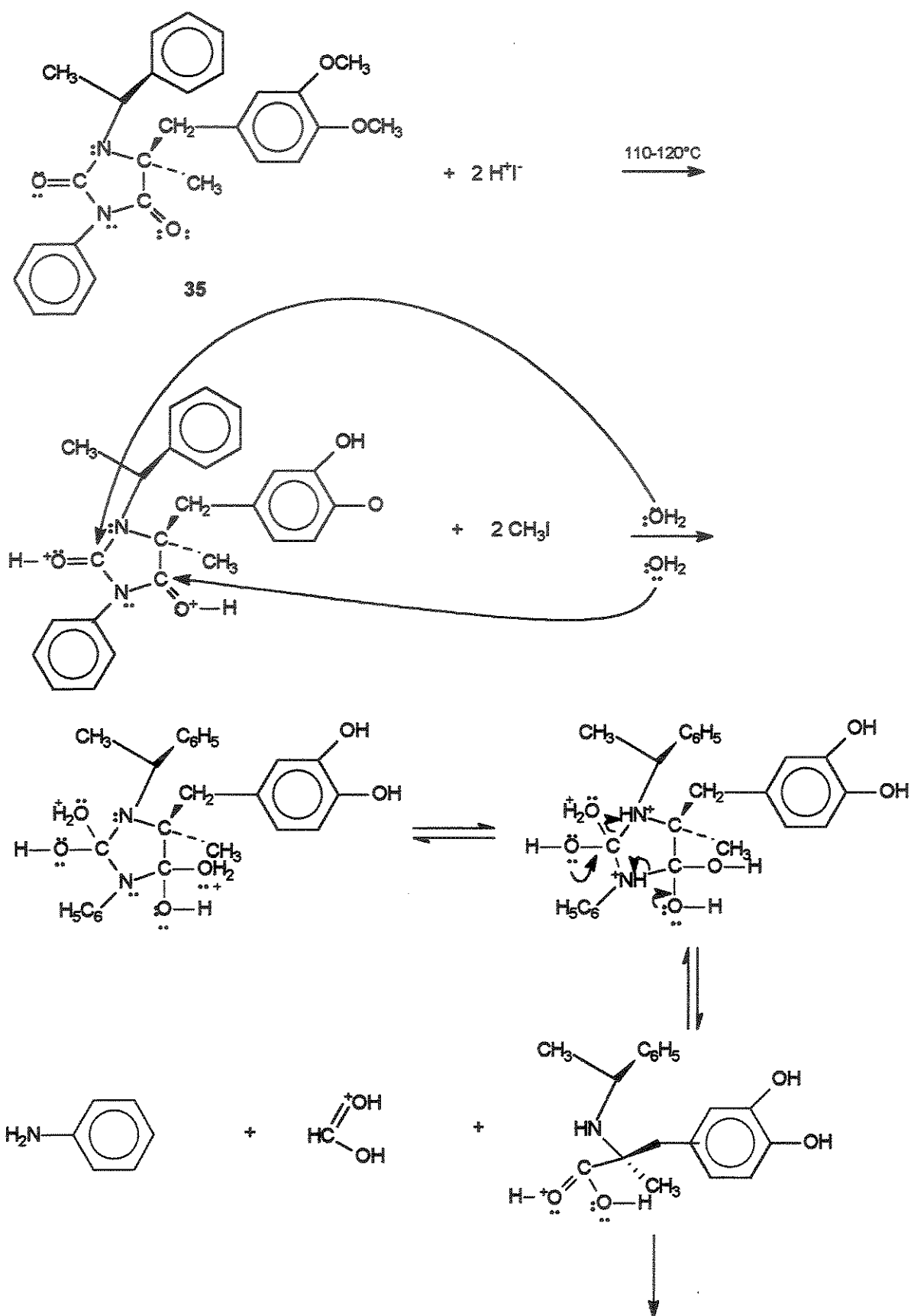
Esquema da reação de síntese do composto 32 para o composto 33.

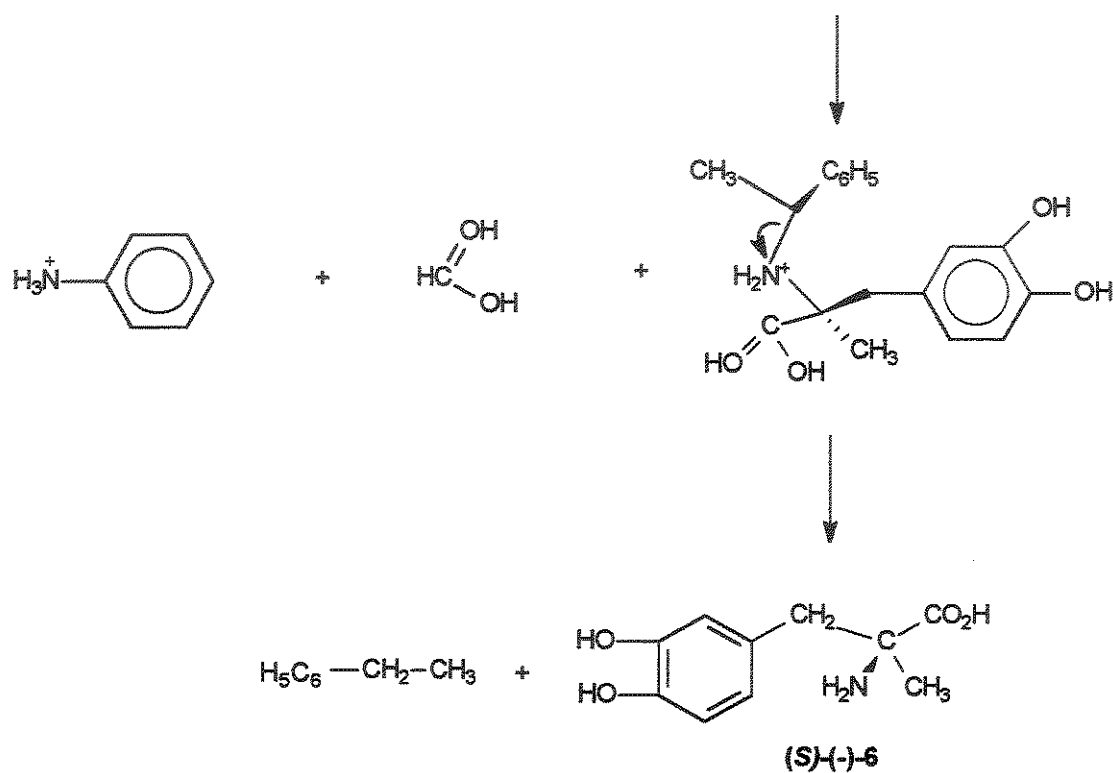
Seguindo de acordo com a Figura 14a, o isômero (*S,S*)-**33** da hidantoína é novamente alquilado. Reage-o com $n\text{-BuLi}$ na presença de diisopropilamina e tetrahydrofurano, formando o enolato de lítio da hidantoína metilada **33-Li**. Cloreto de (3,4-dimetoxi)-benzila é adicionado, formando uma mistura diastereoisomérica de 1-*N*-[(*S*)- α -feniletil]3-*N'*-fenil-(4*R*) (**36**) e (4*S*)-(3,4-dimetoxi)benzil-4-metil-1,3-imidazolidin-2,4-diona (**35**), na proporção 1:1, separados por cromatografia flash.



Esquema da reação de síntese do composto (S,S)-33 para os compostos 35 e 36.

Finalmente cada diastereoisômero da hidantoína dialquilada é hidrolisada na presença de HI como catalisador. Com isso ambos grupamentos amida são clivados, o grupo feniletila é removido e ocorre desmetilação no anel aromático. Para obter o aminoácido puro, a mistura é exposta a uma resina trocadora de íons acídica, e os aminoácidos estando na forma de cátions (pH ácido) ficam retidos na resina. Após são realizadas lavagens na resina com solução de NH_3 para liberar o aminoácido (*S*)-(-)-6.





Esquema da reação de síntese do composto 35 para o composto (S)-(-)-6.

2.1. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS SOBRE A SÍNTESE DE α -METILDOPA

- Allinger, N. L. e colab.; *Organic Chemistry*. New York: Worth Publishers, 1976.
- Forlini, F.; Gatti, N.; Foa, M.; **Process for 3,4-dimethoxyphenyl-acetone preparation; International Application Published under the Patent Cooperation Treaty (PCT)**, nº EP0247526, 02 dezembro 1987.
- Hedrickson, J. B. e colab.; *Organic chemistry*. USA: McGraw-Hill, Inc., ed. 3, 1970.
- Ishiguro, G.; Imura, H.; **Enantiomer separation and complexation equilibrium of dansyl-D,L-amino acids with beta-cyclodextrin in capillary electrophoresis; Bunseki Kagaku**, 2002, 51, 10, 871.
- León-Romo, J. L.; Virues, C. I.; Aviña, J.; Regla, I.; Juaristi, E.; **Preparation of (R)- and (S)- α -methyldopa from a chiral hydantoin containing the α -phenylethyl group; Chirality**, 2002, 14, 144.
- Martens, J.; Gunther, K.; Schickedanz, M.; **Resolution of optical isomers by thin-layer chromatography: enantiomeric purity of methyldopa; Arch. Pharm.**, 1986, 319, 6, 572.
- Naef, R.; Seebach, D.; **Herstellung enantiomerenreiner cis- oder trans-konfigurierter 2-(terc-butyl)-3-methylimidazolidin-4-one aus den aminosäuren (S)-alanin, (S)-phenylalanin, (R)-phenylglycin, (S)-methionin und (S)-valin; Helv. Chim. Acta**, 1985, 68, 135.
- Pfister, K.; Stein, G. A.; Bronner, H. A.; **α -Methyldopa α -amino acids. Derivatives of DL-phenylalanine; J. Am. Chem. Soc.**, 1955, 77, 700.
- Philippa, W.; **Methods for the separation of isomers; International Application Published under the Patent Cooperation Treaty (PCT)**, NZ nº WO03048080, 12 junho 2003.
- Porzi, G.; Sandri, S.; **Tetrahedron: Enantioselective synthesis of (R)- and (S)- α -aminoacids using (6S)-6-methyl-morpholine-2,5-dione derivatives; Asymetry**, 1996, nº 1, 7, 189.
- Reinhold, D. F.; Firestone, R. A.; Gaines, W. A.; Chernerda, J. M.; Slettinger, M.; **Synthesis of L- α -methyldopa from asymmetric intermediates; J. Org. Chem.**, March 33, 1968, 1209.
- Seebach, D.; Aebi, J. D.; Naef, R.; Weber, T.; **α -Alkylation of amino acids without racemization. Preparation of either (S)- ou (R)- α -methyldopa from (S)-alanine; Helv. Chim. Acta**, 1985, 68, 144.
- Slates, H. L.; Taub, D.; Kuo, C. H.; Wendler, N. L.; **Degradation of α -methyl-3,4-dihydroxyphenylalanine (α -methyldopa); J. Org. Chem.**, 1964, 29, 1424.
- Solomons, T. W. G.; *Química Orgânica*. Rio de Janeiro: LTC Livros Técnicos e Científicos Editora S.A. ed. 6, v. 2, 1996.
- Tone, S.; Masawaki, T.; Hamada, T.; **The optical resolution of amino-acids by ultrafiltration membranes fixed with plasma-polymerized L-menthol; J. Membrane Sci.**, 1995, 103, 1-2, 57.
- Tristram, E. W.; Broeke, J. T.; Reinhold, D. F.; Slettinger, M.; Williams, D. E.; **α -Methyldopa. Resolution and configuration; J. Org. Chem.**, 1964, 29, 2053.
- Wildi, B. S.; **Silver Nitrate as a test for ortho and para dihydric phenols; Science**, 1951, 113, 188.

3. DETERMINAÇÃO DE α -METILDOPA – MÉTODOS DE ANÁLISE

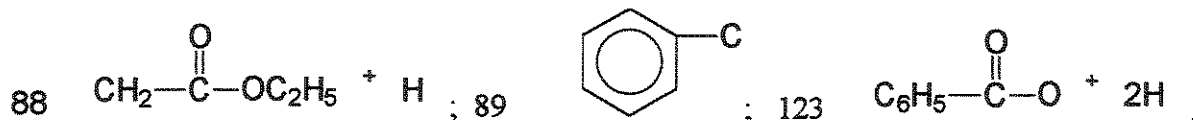
A α -metildopa apresenta-se na forma de cristais incolores ou quase incolores, ou pó fino branco a branco-amarelado

A solubilidade em vários solventes à temperatura ambiente são mostradas na tabela 2 (USP 25, 2002; Farmacopéia Brasileira, 1996; Martindale, 1996; European Pharmacopoeia, 2002).

TABELA 2. SOLUBILIDADE DE α -METILDOPA

Solvente	Solubilidade (mL/g)
Ácidos minerais diluídos	< 1
Etanol	Entre 100 e 1000
Água	Entre 1000 a 10000
Éter	> 1000

A α -metildopa apresenta faixa de fusão entre 306 e 308°C (Stone & Porter, 1967). Seu espectro no ultravioleta apresenta máximo em 279 nm no meio aquoso ácido, e em 302 nm no meio aquoso básico (Figura 15). O espectro no infravermelho apresenta os principais picos nos comprimentos de onda 1600 (deformação axial de $C=C$ do anel aromático), 1288 (deformação axial de $C=O$ do ácido carboxílico), 1395 e 1410 (deformações angulares de $O-H$ do ácido carboxílico), 1530 (deformação axial assimétrica do ânion carboxilato $(C=O)^-$), 1123 (vibrações axiais de $C-C$) cm^{-1} (pastilhas com KBr) (Figura 16). E o espectro de massa possui picos em m/z (Clark's Isolation and Identification of Drugs, 1986): 42 (C_2H_2O); 44 (CH_3CHNH_2 , $(CH_3)_2N$); 51 (C_4H_3); 77 (C_6H_5);



Diversas técnicas são descritas para quantificação de α -metildopa em comprimidos, desde as mais simples até as que exigem aparelhagem sofisticada e técnicos especializados.

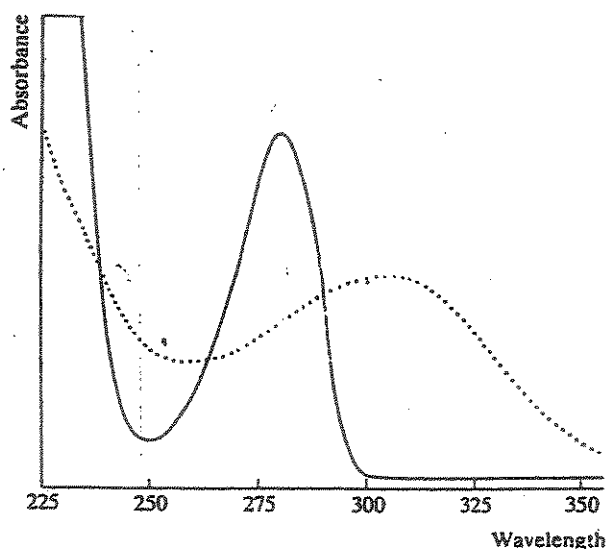


Figura 15. Espectro ultravioleta de α -metildopa. Meio ácido aquoso — 279 nm; meio alcalino aquoso ... 302 nm.

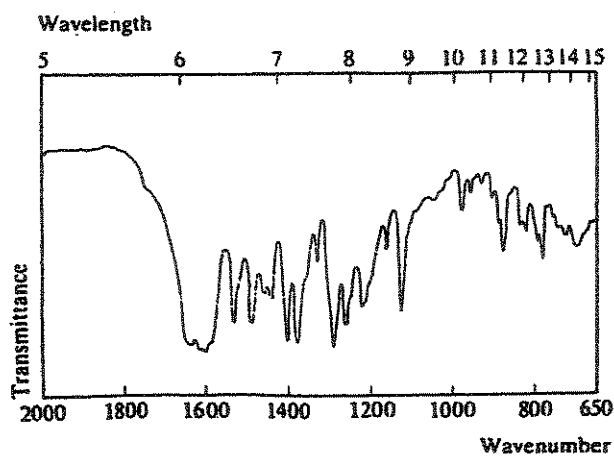


Figura 16. Espectro infravermelho de α -metildopa (pastilhas de KBr).

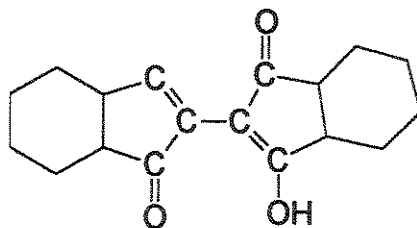
3.1. Testes colorimétricos para identificação de α -metildopa

1- Clark's Isolation and Identification of Drugs cita alguns reagentes que, reagindo com α -metildopa, formam diferentes colorações. Com nitrato de prata amoniacal a mistura apresenta coloração marrom avermelhada a preto devido ao óxido de prata formado. Essa reação pode ter interferências de açúcares, que também podem ser reduzidos quando reagidos com nitrato de prata em meio alcalino, com formação de óxido de prata (Feigl, 1954).

Com cloreto férrico em meio ácido apresenta coloração verde devido ao complexo de Fe^{3+} com α -metildopa formado. Com hidróxido de potássio metanólico apresenta coloração amarela a laranja devido ao produto formado da oxidação de α -metildopa.

2 - Na European Pharmacopoeia, o teste consiste em misturar 5 mg de α -metildopa com 5 mL de ácido clorídrico 1 mol/L e 5 mL de água. Em seguida adiciona-se 0,1 mL de solução de nitrito de sódio 100 g/L contendo 100 g/L de molibdato de amônio resultando em coloração amarela, que se torna vermelha-acastanhada após adição de hidróxido de sódio.

3 - A USP 25 apresenta o teste adicionando à 10 mg de α -metildopa, 0,15 mL de uma solução de ninhidrina 1:250 em ácido sulfúrico produzindo coloração púrpura escura em 5 a 10 minutos, que após adição de 0,15 mL de água muda para amarelo pálido acastanhado. Esse teste serve também para identificar α -metildopa em comprimidos (USP 25, 2002). Na reação ocorre a clivagem do aminoácido acompanhada pela redução da ninhidrina. A cor púrpura observada é devido à presença de bis-1,3-diacetoindenil (Feigl, 1954).



bis-1,3-diacetoindenil

4 - De acordo com a British Pharmacopoeia adicionando ao pó obtido do comprimido triturado, 0,1 mL de solução de cloreto férrico hexahidratado 10,5% *m/v* e 5 mL de solução 0,4% *m/v* de ácido clorídrico 0,1 mol/L, resulta numa coloração verde, que, com excesso de amônia 5 mol/L muda para púrpura ou com excesso de hidróxido de sódio 5 mol/L muda para vermelho.

3.2. Testes cromatográficos para identificação e quantificação de α -metildopa

1 – Na matéria-prima de α -metildopa e no comprimido

A α -metildopa também pode ser identificada pelo método de separação por cromatografia em camada delgada, frente a um padrão. Na British Pharmacopoeia usa-se placa coberta com celulose microcristalina, fase móvel composta por 1-butanol: ácido acético glacial: água (50:25:25) sendo as manchas cromatográficas reveladas com mistura de 50% de solução de cloreto férrico hexahidratado a 10% e 50% de solução de hexacianoferrato (III) de potássio a 5%.

A principal impureza que pode ser encontrada junto com a α -metildopa, e que está presente devido ao processo de síntese é a (S)-(-)-3-metoxi-4-hidroxifenilalanina (3-O-metilmetildopa). A pureza de α -metildopa deve ser verificada e para isso há métodos analíticos por cromatografia em camada delgada (Farmacopéia Brasileira, 1996; USP 25, 2002; European Pharmacopoeia, 2002). É especificado a presença de, no máximo, 0,5% de 3-O-metilmetildopa na α -metildopa sintetizada.

A pureza enantiomérica do princípio ativo é muito importante para o monitoramento da qualidade do medicamento. No caso de α -metildopa, o isômero L- é o que interessa pois é o que possui atividade farmacológica. As farmacopéias possuem especificações para medidas de rotação ótica. Segundo a European Pharmacopoeia, (2002) uma solução de L- α -metildopa em solução de cloreto de alumínio 650 g/L pH 1,5 deve fornecer um ângulo entre $-1,10^\circ$ e $-1,23^\circ$. A British

Pharmacopoeia (1993) estipula um valor entre -0,98 e -1,09 de rotação ótica para *L*- α -metildopa em cloreto de alumínio. Um problema neste teste é que a solução de cloreto de alumínio utilizada é extremamente viscosa, dificultando o preenchimento da cela e diminuindo a transmissão de energia para 20%. Ainda se a substância contém alguma impureza que promove uma certa cor na solução preparada, a leitura no polarímetro é totalmente prejudicada (Gelber & Neumeyer, 1983).

Martens e colab. desenvolveram um método simples por cromatografia em camada delgada para identificação de *D*- α -metildopa e *L*- α -metildopa usando placa com fase estacionária quiral (CHIRALPLATE®), uma mistura de metanol:água:acetonitrila (5:5:3) como fase móvel, e ninidrina 0,1% como revelador cromatográfico. Os resultados apresentaram R_f 0,46 para *L*- α -metildopa e 0,66 para *D*- α -metildopa. Além de consistir num teste de identificação, também pode ser utilizado para quantificação por densitometria.

As cromatografias gasosa (CG) e líquida de alta eficiência (HPLC) também podem ser utilizadas na separação de enantiômeros, apesar de serem métodos que consomem bastante tempo e requerem equipamento de alto preço (Martens e colab., 1986). Gelber & Neumeyer (1983) desenvolveram um método por HPLC usando uma fase móvel quiral constituída de *L*-fenilalanina e sulfato de cobre (II) e coluna C_{18} .

Uma vantagem da técnica por HPLC sobre medidas de rotação ótica é a especificidade, que é comprovada pelo comportamento das impurezas presentes no produto (Gelber & Neumeyer, 1983). No caso da α -metildopa, uma impureza especificada é a 3-*O*-metilmetildopa (USP 25, 2002). Esta, pelo método de Gelber & Neumeyer elui muito depois que a *D*- e a *L*- α -metildopa. Deve-se ter os devidos cuidados com a coluna em relação a sua limpeza após a análise para que toda a fase móvel seja removida. E, além disso, não permanecer com a fase móvel na coluna quando não tiver fluxo, pois isto diminuirá o tempo de vida desta coluna. A necessidade de várias horas para a fase móvel atingir o equilíbrio no sistema cromatográfico prejudica a técnica proposta.

O fator de retenção (K') para *D*- α -metildopa foi 1,9 e para *L*- α -metildopa foi 2,6. O fator de separação foi 1,2 e a resolução apresentou valor de 1,9. A técnica apresentou boa exatidão com diferença menor de 0,5% entre a quantidade recuperada e a adicionada, sendo linear no intervalo de concentração entre 0,5 e 1,0 mg/mL de α -metildopa com coeficiente de correlação linear igual a 0,996. Os limites de quantificação e detecção foram de 0,42% de *D*- α -metildopa na mistura *D*- + *L*- α -metildopa (Gelber & Neumeyer, 1983). Enfim, este método permite uma análise qualitativa e quantitativa, se feita uma curva de calibração ou comparação com padrão e teste limite para impurezas. Uma grande importância deste método é que ele permite análise da impureza 3-O-metilmelildopa.

Podemos citar outros métodos para análise de isômeros óticos, encontradas na literatura. Abe e colab. desenvolveram um método por cromatografia gasosa para análise de aminoácidos, utilizando uma coluna capilar de vidro da marca Chirasil-Val, hélio como gás de arraste, e detector por ionização em chama. Nesse caso são determinadas as razões d/l dos aminoácidos presentes (Abe e colab., 1993).

Outro método que determina *D*- e *L*-aminoácidos, por cromatografia líquida de alta eficiência, utiliza isotiocianato de 7-N,N-sulfonildimetilamino-4-(2,1,3-benzoxadiazolil) (DBD-NCS) como reagente derivatizante separando com uma coluna de ciclodextrina fenilcarbamilada (Imai e colab., 1995).

Otsuka e colab. separaram e determinaram os isômeros *D*- e *L*-ácido láctico, por HPLC, usando uma coluna de resolução enantiomérica TSK-gel Enantio L1 (Otsuka e colab., 1994).

Alguns antibióticos macrocíclicos têm sido utilizados para determinação de isômeros óticos, por terem propriedades enantioseletivas. Eles são ligados covalentemente ao gel de sílica e resolvem misturas racêmicas (Armstrong e colab., 1994; Armstrong e colab., 1995). A pureza enantiomérica de dopa foi determinada, empregando HPLC, utilizando uma coluna C_{18} e fase móvel quiral de *N,N*-dimetil-*L*-fenilalanina e acetato de Cu (II). Ou então utilizando uma coluna de teicoplanina (antibiótico glicopeptídeo) e como fase móvel etanol-água (65:35, v/v). Para α -metildopa, utilizou-se uma coluna de teicoplanina e como fase móvel,

metanol-ácido acético-trietilamina (1000:0,05:0,05, v/v/v) (Dolezalova & Tkaczykova, 1999).

Foi verificada a separação de D,L-aminoácidos, por HPLC em fase reversa, utilizando ciclodextrinas como seletores quirais na fase móvel (Watanabe e colab., 2002).

Chen e colab. desenvolveram uma técnica de enantio-concentração e separação de aminoácidos, por HPLC, utilizando uma coluna com partículas de carbono adsorvida com seletor quiral. Os *L*-isômeros passam pela coluna na presença de Cu(II) adicionado na fase móvel para formar complexo quaternário com íon Cu(II), seletor quiral e aminoácido (Chen e colab., 1999).

Outro método por cromatografia líquida eletrocínética com ciclodextrina para separação de aminoácidos racêmicos consiste na derivatização deles com cloroformato de 1-(9-fluorenil)etil. A fase móvel é composta de fosfato de sódio 10 mmolL⁻¹ (pH 6,8), com dodecilsulfato de sódio 25 mmolL⁻¹ e acetonitrila 10-15%. Os *D*-isômeros migram mais rapidamente do que os *L*-isômeros correspondentes. A detecção é por fluorescência (Chan e colab., 1995).

Para resolver aminoácidos N,N-dimetilados, dois métodos foram desenvolvidos utilizando ressonância nuclear magnética protônica. O primeiro envolvendo a conversão dos aminoácidos em diastereoisômeros através da reação com metil (*S*)-(+)-mandelato. No segundo método, os aminoácidos são amidados com 3,5-dinitroanilina, e a análise pela ressonância nuclear magnética H-1 é realizada com a adição de um agente quiral, o (*R*)-(-)-1-(9-antril)-2,2,2-trifluoretanol (Ang & Low, 1991).

A α -metildopa pode ser determinada por HPLC com detecção no UV, com teobromina como padrão interno. Este método é também utilizado para comprimidos da associação de metildopa com hidroclorotiazida, pois as duas substâncias são detectadas na mesma corrida cromatográfica com tempos de retenção diferentes, 4 minutos para metildopa e 7 minutos para hidroclorotiazida, sendo que o tempo de retenção é de 9 minutos ou mais para o padrão interno teobromina. É um método oficial com a vantagem de se poder analisar dois compostos contidos num comprimido com um só método, utilizando as mesmas

amostras, padrões e condições (Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists, 1990).

Um estudo cinético de degradação a α -metildopa em função da temperatura, pH, umidade e exposição à radiação ultravioleta foi realizado aplicando-se a técnica por HPLC com detecção no ultravioleta (Metwally & Belal, 1992). O método pode ser aplicado na determinação de metildopa e da impureza 3-O-metilmetildopa em produtos farmacêuticos. Apresenta linearidade entre 5 e 200 $\mu\text{g/mL}$ tanto de metildopa como de impureza, e coeficiente de correlação 0,999. É um método preciso com desvio padrão relativo de 0,54% para α -metildopa e 0,62% para 3-O-metilmetildopa, e também com boa exatidão com recuperação entre 99,7 e 100,2% para α -metildopa e entre 99,5 e 100,1% para 3-O-metilmetildopa. Cada corrida cromatográfica é de cerca de 11 minutos, sendo que o tempo de retenção é de 4,35 minutos para α -metildopa e 8,93 minutos para 3-O-metilmetildopa. Produtos de degradação de metildopa aparecem em 0,88, 1,01, 1,15, 1,25, 1,577, 2,57, 3,41, 4,04, 5,43, 5,96, 8,12 e 10,54 minutos numa coluna $\mu\text{Bondapak C}_8$ 150 x 4,6 mm (5 μm). A grande vantagem deste método sobre os métodos espectrofotométricos é a especificidade, além do fato de os produtos de degradação não interferirem na análise, e de não serem necessários ajuste de pH e controle de temperatura.

2 - Em plasma humano

Para análise de α -metildopa em plasma humano, num estudo de bioequivalência e monitoramento no organismo, é usada a técnica de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), por ser mais sensível e seletiva, num meio onde há muitos interferentes presentes que podem prejudicar a análise. Podem ser usados diferentes detectores como, por exemplo, fluorescência (Rona e colab., 1996) e eletrospray em espectrometria de massa (Oliveira e colab., 2002). Essas técnicas apresentam as desvantagens de exigirem aparelhagem cara e pessoal altamente qualificado para utilizá-la.

A técnica apresentada por Oliveira e colab., quantifica α -metildopa em plasma humano utilizando HPLC em espectrômetro de massa com eletrospray. Nesse caso é necessário um limite de quantificação bastante baixo, e foi encontrado 20 ng por mL de plasma, o suficiente para o teste de bioequivalência. O método foi validado, apresentando boa precisão intra-dia com resultados de 7,3, 5,4 e 4,3% e inter-dia com resultados de 7,7, 0,5 e 0,7% para concentrações de 30, 600 e 3000 ng/mL, respectivamente. Apresentou boa exatidão com resultados intra-dia de erro relativo de -0,8, -1,3 e -2,0% e inter-dia de 0,2, -1,1 e -2,3% para as mesmas concentrações do teste de precisão. A curva de calibração é linear entre 20 e 5000 ng/mL. Uma grande vantagem foi o tempo da corrida cromatográfica de 5,5 minutos, bem menor em relação ao método de Rona e colab., que foi de 35 minutos. Outra vantagem foi o modo simples de preparar a amostra, centrifugando para precipitar sólidos e extraíndo impurezas lipofílicas com diclorometano, não necessitando de extração da amostra com fase sólida como o método de Rona e colab..

A metodologia de Rona e colab. também quantifica α -metildopa em plasma humano só que utilizando HPLC com detecção em fluorescência. O limite de quantificação é de 10 ng por mL de plasma, mais baixo que o apresentado pela técnica de Oliveira e colab.. O método foi validado, apresentando boa precisão intra-dia com desvios padrão relativos iguais a 7,12, 5,13, e 4,75% para concentrações de 35, 200 e 2000 ng/mL, e inter-dia com resultados de 18,35, 5,97 e 0,82% para concentrações de 10, 500 e 3000 ng/mL, respectivamente. Apresentou boa exatidão intra-dia com recuperação de 100,86% (erro relativo = 0,8%), 108,15% (erro relativo = 8,2%) e 103,62% (erro relativo = 3,6%), para concentrações de 35, 200 e 2000 ng/mL, e inter-dia com 109,02% (erro relativo = 9,0%), 101,16% (erro relativo = 1,2%) e 99,98% (erro relativo = -0,02%) de recuperação para as concentrações de 10, 500 e 3000 ng/mL, respectivamente. A curva de calibração é linear entre 10 e 3000 ng/mL, com coeficiente de correlação linear 0,999.

As desvantagens são o tempo de cada corrida cromatográfica que é longo, 35 minutos, e foi definido através de um programa de gradiente, exigindo que o

aparelho de HPLC faça eluição por gradiente, e a extração da amostra é realizada com fase sólida, o que encarece mais a técnica.

Os parâmetros validados do método foram tão eficazes quanto os do método proposto por Oliveira e colab.. A grande vantagem deste método é o preparo da amostra, que é mais simples. Como a aparelhagem de HPLC tem preço bastante alto, a escolha de um método a ser utilizado deve ser avaliada de acordo a disponibilidade do laboratório. Um HPLC com detector de fluorescência é bem mais barato do que um HPLC acoplado a um espectrômetro de massa, tem alta sensibilidade, permite análise de traços, boa estabilidade, é compatível com eluição por gradiente, mas tem a desvantagem de ser seletivo. O espectrômetro de massa, além de ter alta sensibilidade, estabilidade, alta seletividade com possibilidade de análise de compostos com picos sobrepostos, compatibilidade com eluição por gradiente, é um detector universal para HPLC.

3.3. Técnicas espectrofotométricas para identificação e quantificação de α -metildopa

A USP 25 e a Farmacopéia Brasileira contêm um método espectrofotométrico em que a amostra contendo α -metildopa é tratada com ácido sulfúrico diluído e posteriormente forma um produto colorido numa solução de tartarato ferroso em tampão pH 8,5. Nessa reação de tartarato com íons ferrosos produz uma intensa coloração violeta num pH básico, devido à formação de um sal ou ácido dihidroximaléico, $\text{CO}_2\text{H.C(OH)=C(OH).CO}_2\text{H}$ (Vogel, 1981). A leitura da absorbância é realizada em comprimento de onda de 520 nm. Na British Pharmacopoeia após extração em ácido sulfúrico diluído, a α -metildopa complexa numa solução de citrato-sulfato ferroso em tampão glicina e a leitura é feita em 545 nm. A especificação farmacopeica informa que um comprimido de metildopa contém, no mínimo 90%, e no máximo 110% da quantidade rotulada de metildopa no produto farmacêutico (USP 25, 2002; Farmacopéia Brasileira, 1996).

Há várias outras referências que fazem uso do método espectrofotométrico na análise de comprimidos de α -metildopa (Berzas e colab., 1997; Issopoulos,

1990; Vieira & Fatibello, 1998; Nevado e colab., 1995; Helaleh e colab., 1997; Walash e colab., 1985). Esta técnica exige seletividade, pois os excipientes dos produtos farmacêuticos não podem interferir e absorver no comprimento de onda especificado no método.

Berzas e colab. desenvolveram um método espectrofotométrico de análise por injeção em fluxo com fluxo-interrompido para comprimidos de α -metildopa em que esta é dissolvida em solução tampão acetato/ácido acético pH 5,0, sofre oxidação pelo ar atmosférico e hidrólise devido à adição de hidróxido de sódio diluído. O carregador de amostra é água, o reagente cromogênico é NaOH 0,6 mol/L à 60°C, e a leitura é realizada, trinta segundos após a injeção da amostra, parando a bomba manualmente, num comprimento de onda de 360 nm. Este método apresenta linearidade entre $2,0 \times 10^{-5}$ e $2,0 \times 10^{-4}$ mol/L com coeficiente de correlação linear 0,998, limite de quantificação de $4,3 \times 10^{-7}$ mol/L e limite de detecção $1,3 \times 10^{-7}$ mol/L. Os excipientes da amostra não interferem na análise e é uma técnica apropriada para aplicações analíticas de rotina. A técnica com injeção em fluxo permite determinações rápidas e muitas amostras podem ser analisadas por dia. Suas desvantagens são a falta de seletividade pois também determina dopamina com absorção no mesmo comprimento de onda. Além disso, métodos automatizados cinéticos, como análise com injeção em fluxo podem necessitar da resolução de problemas de instabilidade para que medidas espectrofotométricas reprodutíveis do composto colorido em meio alcalino possam ser obtidas. O sistema com injeção em fluxo é susceptível à formação de bolhas, incidindo sobre a reprodutibilidade das medidas, o que faz com que a atenção do analista esteja voltada para a correção de problemas com os tubos que transportam as soluções, com a estabilidade da pulsação da bomba, e com a ausência de bolhas na cela do detector.

As condições do sistema foram otimizadas: a concentração de 0,6 mol/L de hidróxido de sódio mostrou maior sensibilidade numa concentração de $2,0 \times 10^{-4}$ mol/L de α -metildopa; o comprimento do reator escolhido foi de 1,0 m, pois fornece um sinal adequado, embora o aumento do reator aumente o tempo de interrupção; o volume a ser injetado foi de 350 μ L pois o sinal aumentou com

volumes até 300 μL permanecendo constante para volumes maiores; o fluxo estabelecido foi de 1,25 mL/min considerando que a influência do mesmo no sinal analítico é mínimo, e quando é aumentado, a largura do pico e o tempo de interrupção diminuem, e o intervalo entre as medidas pode ser aumentado; a temperatura de 60°C durante as medidas foi a mais apropriada, observando que a velocidade de reação aumenta com o aumento da temperatura. É um método com menor precisão, com desvio padrão relativo de $2,8 \times 10^{-2}$, quando comparado com outros métodos espectrofotométricos (Nevado e colab., 1995; Issopoulos, 1990). A exatidão do método não foi verificada.

Outro método espectrofotométrico por injeção em fluxo é baseado na oxidação de α -metildopa utilizando metaperiodato de sódio. O composto formado tem absorção máxima em 473 nm. Este é um método barato e rápido, com análise de 130 amostras por hora (Nevado e colab., 1995). A curva de calibração foi linear entre $5,0 \times 10^{-6}$ e $1,0 \times 10^{-3}$ mol/L, um intervalo maior e que abrange todas as concentrações do método por Berzas e colab., com coeficiente de correlação linear de 0,9999, um resultado também melhor do que o método de Berzas e colab. por injeção em fluxo. O limite de quantificação de $1,1 \times 10^{-6}$ mol/L e limite de detecção $3,2 \times 10^{-7}$ mol/L são maiores do que os limites de detecção do método de Berzas e colab., mas para análise de princípio ativo no comprimido de α -metildopa não há relação de maior eficiência com menores limites de quantificação e detecção, visto que a quantidade na forma farmacêutica é muito grande. A técnica possui boa precisão apresentando desvio padrão relativo em torno de 0,5%, e boa exatidão com recuperação de 99 a 105% para concentrações de $2,0 \times 10^{-4}$ mol/L. Foi realizado um teste com os excipientes possivelmente encontrados nas formulações farmacêuticas, como glicose, frutose, sacarose, amido, polietilenoglicol, cloreto de sódio e sulfito de sódio, e, como no método de Berzas e colab., nenhuma dessas substâncias interferiram no método proposto. A vantagem sobre o método de Berzas e colab. é a leitura direta da absorbância sem ter o comprometimento de parar o fluxo no momento certo.

Issopoulos desenvolveu um método que determina α -metildopa em concentrações de 50 a 2500 mg/L. Esta é oxidada por ferro (III), usando

Fe(phen)_3^{3+} . Nesta reação, os dois hidrogênios das hidroxilas fenólicas são removidos formando uma o-quinona. O ferro (III) é reduzido pelos hidrogênios fenólicos da α -metildopa a ferro (II), que forma um complexo com o-fenantrolina resultando num triscomplexo $[\text{Fe(II)-(o-fenantrolina)}_3]^{2+}$ em meio ácido (pH 5,0), com absorção máxima em 510 nm. Este complexo, também chamado ferroína, consiste num quelato de coloração vermelho-alaranjado.

Foi estudado o efeito do pH sobre a absorbância e verificou-se que de 4,0 a 6,0 o sinal é praticamente constante. Em pH mais ácido ou mais básico a absorbância diminui devido a incompleta formação do complexo em pH baixo e hidrólise do complexo em pH alto (14-16). Portanto o pH escolhido foi 5,0. Também foi verificado o tempo de reação e temperatura ideais para a formação do complexo. Na temperatura de 50°C deve-se aguardar 40-50 minutos, e à temperatura ambiente são necessários de 70 a 80 minutos.

O método se mostrou com boas exatidão e precisão. O desvio padrão relativo entre as quintuplicatas foi de 1,56% para soluções com 100 $\mu\text{g/L}$, 1,20% para soluções com 1000 $\mu\text{g/L}$ e 0,61% para soluções com 2000 $\mu\text{g/L}$. A recuperação foi considerada satisfatória, dentro do limite de confiança calculado para cada concentração.

Suas vantagens são: o complexo Fe(phen)_3^{3+} é facilmente preparado e é de baixo custo; a coloração medida é estável por 24 horas (Issopoulos, 1990). A lei de Beer é obedecida nas concentrações entre 50 e 2500 ppb e o coeficiente de correlação linear foi de 0,9999. O método proposto foi comparado com o método de referência farmacopeico, e a diferença não foi significativa num nível de confiança de 95%.

Devido ao seu baixo limite de detecção e curva de calibração linear em concentrações tão baixas, faz com que esse método possa ser empregado em controle de limpeza dos equipamentos industriais, já que esse fato é importantíssimo no processo de produção em que a mesma máquina é utilizada para fabricar muitos outros comprimidos com diferentes princípios ativos. Geralmente esse teste de controle de qualidade da limpeza de equipamentos é sempre realizada por técnicas de cromatografia líquida de alta eficiência, pois

apresentam limites de detecção e quantificação muito baixos (Official Methods of Analysis of the Association of official Analytical Chemists, 1990). No entanto, o procedimento de Issopoulos apresenta desvantagens como não ser específico para α -metildopa, pois também é utilizado para levodopa e carbidopa, e também por possuir o inconveniente de ter que deixar a mistura de reação em banho-maria à $50 \pm 0,5^\circ\text{C}$ por 45-50 minutos, consumindo bastante tempo em relação aos método por injeção em fluxo (Berzas e colab., 1997; Nevado e colab., 1995).

Nagaralli e colab. também desenvolveram dois métodos semelhantes ao de Issopoulos, baseados na medida de absorbância dos produtos $[\text{Fe(II)}-(o\text{-fenantrolina})_3]^{2+}$ (primeiro método) e $[\text{Fe(II)}-(bipiridila)_3]^{2+}$ (segundo método) obtidos da oxidação de α -metildopa por Fe^{3+} presentes em 1,10-fenantrolina e 2,2'-bipiridila e que absorvem em 510 e 522 nm, respectivamente. A lei de Beer é obedecida nas concentrações entre 60 e 1100 $\mu\text{g/L}$ com coeficiente de correlação linear de 0,9993 para o primeiro método e entre 40 e 1300 e 0,9992 para o segundo, sendo que o método de Issopoulos abrange uma concentração maior de α -metildopa que é de 50 a 2500 $\mu\text{g/L}$.

A precisão dos métodos propostos por Nagaralli e colab. foi muito boa com desvios padrões relativos menores de 1,0% calculados de cinco replicatas. Comparado com o método de referência da *United States Pharmacopoeia*, não foi observada qualquer variação significativa entre os métodos.

O primeiro método em que é medida a quantidade de $[\text{Fe(II)}-(o\text{-fenantrolina})_3]^{2+}$ formado difere do método de Issopoulos somente na preparação das soluções. Issopoulos ajusta o pH em 5,0 e usa a temperatura de 50°C por 40-50 minutos, enquanto que Nagaralli e colab. utilizam água e não ajustam o pH e usam a temperatura de 80°C por 15 minutos.

Vieira & Fatibello, num processo enzimático, utilizaram extrato bruto da raiz de batata-doce, que possui a enzima polifenol oxidase. Esta enzima catalisa a auto-oxidação de α -metildopa a metildopaquinona, que é convertido a leucometildopacromo. Este, por sua vez, é oxidado a metildopacromo, que absorve em 480 nm. Na curva de calibração a linearidade foi apresentada entre $2,0 \times 10^{-4}$ e $6,0 \times 10^{-3}$ mol/L e coeficiente de correlação linear 0,9990. O limite de

detecção é de $3,4 \times 10^{-5}$ mol/L. A técnica apresenta boa exatidão já que a recuperação foi de 97,5 a 102,9% da quantidade adicionada. Apresenta também boa precisão visto que o desvio padrão relativo entre dez replicatas foi de 1,27%. O método proposto foi comparado com o método de referência farmacopeico apresentando erro relativo de -2,2%. A atividade da enzima pode variar de acordo com o procedimento de extração e o meio utilizado. Esta atividade foi maior com uma proporção de 4:1 v/m de tampão /tecido e com o tampão na concentração de 0,1 mol/L pH 7,0. É exigido a adição de um protetor e/ou agente estabilizante no extrato para evitar que compostos fenólicos naturais e a oxidação pelo oxigênio atmosférico diminua a atividade da enzima. Para isso foi utilizado Polyclar SB-100 2,5:25,0 m/m, polivinilpirrolidona que remove os compostos fenólicos naturais contidos no extrato, e que deve ser purificado antes da utilização.

A leitura da absorbância deve ser realizada com dez minutos de reação pois, após este tempo, a absorção decresce vagarosamente com a conversão de metildopacromo para 5,6-dihidroindol, indol-5,6-quinona e finalmente melanina, como segue na Figura 17. A concentração, pH e temperatura ótimos foram determinados, sendo que a concentração de enzima escolhida foi de 39 unidades/min pois de 37 a 39 unidades/min o sinal de absorbância aumenta e estabiliza de 39 a 62,6 unidades/min. O pH ótimo para a atividade enzimática é 7,0, e a temperatura de 25°C foi utilizada, sendo que de 15 a 25°C a atividade enzimática aumentou e entre 25 e 50°C houve declínio devido à inativação enzimática. Foi realizado um teste com os excipientes possivelmente encontrados nas formulações farmacêuticas, como glicose, frutose, lactose, amido, polietilenoglicol, cloreto de sódio e estearato de magnésio, e nenhuma dessas substâncias interferiu no método proposto.

É um método que substitui reagentes cromogênicos e/ou biosensores (Vieira & Fatibello, 1998). Apresenta desvantagens como ser um método moroso exigindo várias etapas como a preparação da raiz, extração da enzima e determinação da atividade enzimática, que são processos que devem ser seguidos uniformemente. Além disso, a preparação da mistura de reação é

realizada dentro da própria cela onde é feita a leitura da absorbância e esta deve ocorrer após 10 minutos, faz com que aumente o tempo da análise.

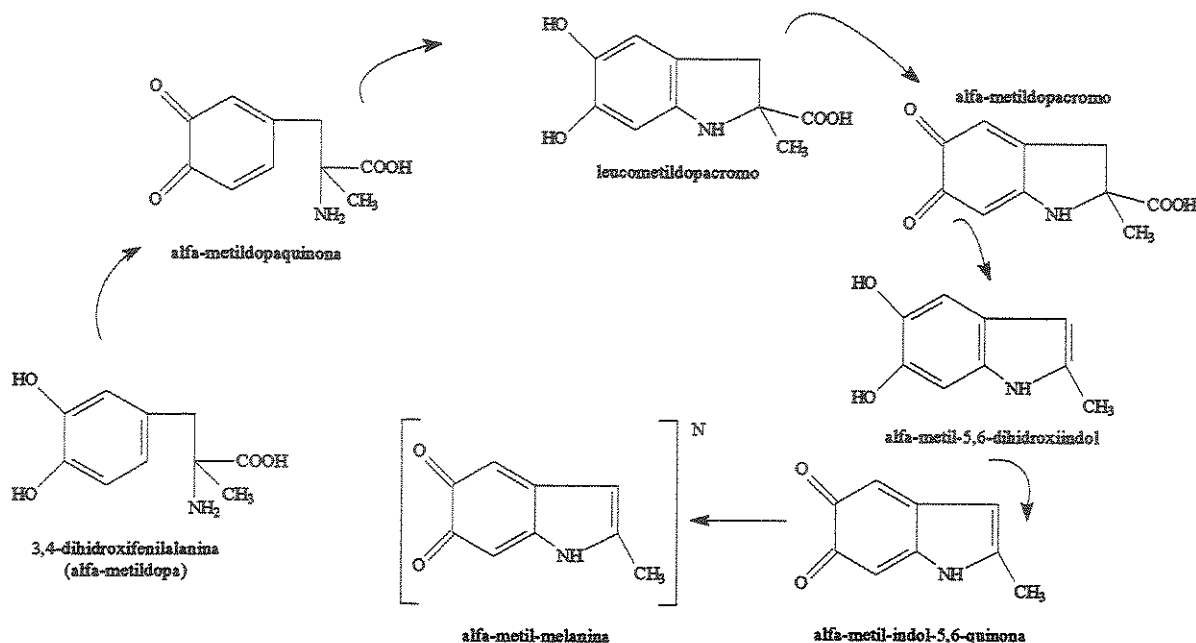


Figura 17. Compostos formados com a oxidação de α -metildopa.

A α -metildopa pode ser quantificada também por espectrofotometria em produtos farmacêuticos através da reação com nitrato de cério (IV) em ácido sulfúrico à 80°C durante 25 minutos, com leitura num comprimento de onda de 550 nm (Helaleh e colab., 1997). O tempo de reação é menor que os 50 minutos do método proposto por Issopoulos, o que torna a análise mais rápida. Esta reação é dependente da concentração do ácido, sendo que a absorbância da solução aumenta mais rapidamente com acidez mais alta e com o tempo de aquecimento. A temperatura de 80°C foi a mais apropriada. Em temperaturas altas (acima de 80°C) há um risco de ocorrerem alterações químicas indesejáveis tornando a mistura de reação levemente turva, prejudicando a determinação. O método obedece a lei de Beer em concentrações ente 125 e 250 $\mu\text{g/mL}$ de metildopa. Determinou-se que a proporção metildopa/cério (IV) a ser utilizada seria de 1:3, com o que se obtém sinal mais intenso.

A precisão e a exatidão da técnica foram avaliadas, resultando em desvios padrão relativos de 0,45, 0,15 e 0,12 e recuperação de 99,8, 99,9 e 99,7% para concentrações adicionadas de 12,5, 17,5 e 22,5 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente. É um método mais preciso e com de exatidão que os de Nevado e colab., Vieira & Fatibello e Issopoulos. Foi verificado se os excipientes do comprimido interferem na análise, e não houve qualquer alteração nas medidas de absorbância. O método proposto foi comparado com o método de Issopoulos, e a diferença não foi significativa num nível de confiança de 95%. Apresenta a desvantagem de não ser específico para metildopa, pois também é utilizado para levodopa. Mas é um método reprodutível, simples, preciso e sensível para análises de rotina (Helaleh e colab., 1997).

Dois reagentes cromogênicos foram utilizados para formarem complexos com α -metildopa, sendo *p*-dimetilaminocinamaldeído (PDAC) e *p*-dimetilaminobenzaldeído (PDAB), em solução alcalina, ocorrendo absorção a 440 e 540 nm, respectivamente. Em meio alcalino a α -metildopa é convertida em metildopaquinona, que reage com o reagente cromogênico, formando os complexos metildopacromo *p*-dimetilaminobenzilideno quando reage com PDAB, e metildopacromo *p*-dimetilaminocinamilideno quando reage com PDAC (Walash e colab., 1985). A reação é mais sensível na presença de tampão acetato pH 4,6 ou solução de acetato de sódio 50% em metanol, já que o uso de acetato de sódio 50% em metanol:água diminui o sinal. Na temperatura ambiente mostrou-se favorável, pois temperaturas mais altas permitem leituras não reprodutíveis.

As técnicas apresentaram precisão com desvios padrão de 0,5% para o método com PDAC, e 0,4% para o método com PDAB. Boa exatidão também foi verificada com recuperações de 99,08% para o método com PDAC, e 99,0% para o método com PDAB. Esses métodos também são válidos para análise de noradrenalina, com leitura também em 440 nm para o método com PDAC, e 420 nm para o método com PDAB. Foi declarado que o método proposto, utilizando PDAB, mostrou diferença significativa do método oficial utilizado, com respeito a valores estatísticos (*t* e *F*).

Métodos cinéticos com detecção espectrofotométricas também podem ser utilizados para determinação de α -metildopa, apesar de existirem em pequeno número devido à pouca atenção dada a eles na determinação de α -metildopa. Helaleh e colab. desenvolveram um método cinético em que são feitas medidas espectrofotométricas verificando o aumento da absorbância em 310 e 470 nm com a reação de α -metildopa com iodato de potássio à 30°C. Ocorre uma reação redox com a formação de um composto amarelo cuja concentração aumenta com o tempo. A absorbância máxima é em 310 nm, mudando em seguida para laranja com absorbância máxima em 470 nm. A lei de Beer é obedecida em concentrações de α -metildopa entre 125 e 750 mg/L e a recuperação foi de 98,3 a 100,4 %. Ao ser comparado com o método de referência (Issopoulos, 1990) para $n=5$, em 310 nm apresentou recuperação de 99,86%, R.S.D. de 0,08% e t de 0,9 num grau de confiança de 95%, em 470 nm apresentou recuperação de 99,99%, R.S.D. de 0,045% e t de 0,07 num grau de confiança de 95%, enquanto que o método de referência apresentou recuperação de 100,2%, R.S.D. de 0,38% e t de 0,6 num grau de confiança de 95%. O valor de t calculado não excedeu o valor teórico e isso indica a ausência de qualquer diferença significativa em termos de exatidão (Helaleh e colab., 1998).

Outro método cinético para determinar α -metildopa foi desenvolvido por Milovanovic e colab., baseado na reação entre peróxido de hidrogênio, molibdênio (VI) e α -metildopa, em solução de tampão carbonato pH 9,8, produzindo um composto amarelo. A reação é acompanhada fotometricamente em 350 nm. O método é eficaz em concentrações entre 0,40 e 1,60 mg/L, apresentou desvio padrão relativo igual a 4,2%. Não foi aplicado em comprimidos de α -metildopa.

Helaleh, em 1999, desenvolveu um método cinético baseado na reação de α -metildopa com hidróxido de sódio com formação de um produto amarelo cuja intensidade aumenta com o tempo e então decresce e finalmente muda para um produto marrom claro. A lei de Beer é obedecida num intervalo de concentração de 10 a 100 mg/L. Apresentou desvio padrão de 0,48 mg/L, desvio padrão relativo de 4,99 e recuperação de 100,1%. Variáveis foram estudadas como a concentração de NaOH e temperatura ideais, sendo que com o estudo da

temperatura a energia de ativação foi calculada como sendo $57,88 \text{ K cal}^{-1} \text{ mol}^{-1}$. Comparado com um método de referência (Issopoulos, 1990), apresentou recuperação de 100,5 % com desvio padrão de $1 \times 10^{-5} \text{ mg/L}$ contra 100,0% e 3,8 $\mu\text{g/L}$ do método de referência, e valores de $t = 0,36$ e $F = 0,07$ comparados com 2,447 e 6,39, respectivamente, tabelados (95%).

3.4. Técnicas titulométricas para quantificação de α -metildopa

A pureza da α -metildopa pode ser verificada por um método por titulação colorimétrico segundo a Farmacopéia Brasileira e USP 25. Este método consiste em dissolver com aquecimento 200 mg de metildopa em 25 mL de ácido acético glacial, esfriar até temperatura ambiente e adicionar 0,1 mL de solução indicadora de cristal violeta (violeta genciana) mais 50 mL de acetonitrila. Em seguida titular com solução volumétrica de ácido perclórico 0,1 mol/L em ácido acético glacial até o aparecimento da coloração azul. Realizar um branco e calcular a pureza considerando que cada mL de ácido perclórico 0,1 mol/L corresponde a 21,12 mg de α -metildopa.

Já na European Pharmacopoeia, 200 mg de α -metildopa são dissolvidos numa mistura de 15 mL de ácido fórmico anidro, 30 mL de ácido acético anidro e 30 mL de dioxano. Segue-se a titulação com ácido perclórico 0,1 mol/L até coloração verde, utilizando 0,1 mL de solução indicadora de cristal violeta.

Uma técnica muito simples desenvolvida para a determinação de α -metildopa em preparações farmacêuticas é a titulação direta com N-bromosuccinimida, usando-se vermelho de metila como indicador. Titula-se com solução padronizada de N-bromosuccinimida até a coloração rosa desaparecer totalmente. É feito um branco. Nesta reação a α -metildopa é oxidada pelo reagente, e o indicador também reage com N-bromosuccinimida (Pathak e colab., 1982). Quando toda α -metildopa é oxidada, o indicador é consumido e a solução se torna incolor, indicando o ponto final. Por isso somente duas gotas de vermelho de metila 0,04% devem ser utilizadas.

O método apresenta precisão de $\pm 1\%$, o que é melhor que os desvios padrão relativos de método espectrofotométricos (Vieira & Fatibello, 1998; Issopoulou, 1990) e menos preciso que outros (Nevado e colab., 1995; Helaleh e colab., 1997). Boa exatidão foi obtida, com recuperação de 99,36 a 100,60%. Uma boa vantagem para este método titulométrico é que os excipientes do comprimido não interferem na determinação. Este método também é utilizado para determinar propranolol, o que diminui sua seletividade.

Salem determinou α -metildopa por titulação através de sua oxidação com metavanadato de amônio em meio ácido produzindo derivado aminocrômico. Pode-se realizar uma titulação direta, em que α -metildopa é dissolvida em ácido clorídrico concentrado e titulada com metavanadato de amônio 0,02 mol/L até mudança da coloração do indicador, podendo este ser vermelho de metila ou alaranjado de metila. Alternativamente pode-se fazer a detecção potenciométrica do ponto final através dos eletrodos de calomelano e platina. Esta titulação é mais demorada (20 a 30 minutos) devido à lenta estabilização dos eletrodos. Apresenta, porém, a vantagem de poder ser utilizada para altas concentrações de α -metildopa que são difíceis de titular com indicadores visuais. Na titulação indireta, α -metildopa é misturada com um excesso de metavanadato de amônio 0,02 mol/L na presença de ácido clorídrico concentrado. Adiciona-se uma solução de iodeto de potássio 20%, titulando o iodo liberado com tiosulfato de sódio 0,02 mol/L usando amido como indicador. Esta reação de α -metildopa com metavanadato de amônio também pode ser medida espectrofotometricamente em 485 nm apresentando-se linear entre 0,1 e 0,95 mg de α -metildopa.

3.5. Técnica potenciométrica para quantificação de α -metildopa

Neste método potenciométrico, α -metildopa forma complexo solúvel com cobre (II), e o excesso de íons produzidos de cobre (II) é medido com um eletrodo íon-seletivo de cobre (II) (Athanasiousmalaki & Koupparis, 1984). Este método não é seletivo pois mede a presença de qualquer α -aminoácido que forma complexo

solúvel com cobre (II). A principal desvantagem dos métodos potenciométricos é a não linearidade da curva de calibração. Apesar disso a curva de calibração realizada com concentrações entre 5×10^{-4} e $1,0 \times 10^{-2}$ mol/L de α -metildopa apresentou equação $E \text{ (mV)} = 237,0 + 30,61 \log [\alpha\text{-metildopa}]$ com coeficiente de correlação linear 0,9990. Por outro lado o sinal é baixo e o eletrodo é susceptível à ataque pelos agentes complexantes. O desvio padrão ficou entre 0,2 e 0,4 mV para quatro replicatas e o erro em 3%. Apresentou uma recuperação de 97,1 a 101,1%, sem interferência dos excipientes da formulação.

3.6. Teste de dissolução de comprimidos de α -metildopa

Outro teste muito importante no controle de qualidade de um produto farmacêutico na forma comprimido é o de dissolução, em que determina-se a quantidade de princípio ativo que é liberada no meio de dissolução num determinado tempo. A Farmacopéia Brasileira e a USP 25 contêm o teste de dissolução para comprimidos de metildopa realizado com ácido clorídrico como meio de dissolução com tempo de duração de 20 minutos. A detecção é feita por espectrofotometria em 280 nm e comparada com a leitura de um padrão. A especificação é que 80% de metildopa declarada no rótulo do produto deve dissolver-se em 20 minutos. Com esse teste é possível prever in vitro se o fármaco estará disponível para ser absorvido in vivo.

3.7. Procedimento experimental de métodos de determinação de α -metildopa

A. Testes cromatográficos para identificação e quantificação de α -metildopa

a) Método por cromatografia líquida de alta eficiência segundo Gelber & Neumeyer:

Preparo do padrão: transferir 125 mg de cada padrão (D- e L-metildopa) para dois balões volumétricos distintos de 50 mL, dissolver e completar o volume com fase móvel. Pipetar 25 mL de cada solução para um mesmo balão volumétrico de 100 mL, diluir e completar o volume com a fase móvel. Filtrar uma porção em membrana filtrante de 0,45 μ m.

Preparo da amostra para comprimidos de 250 mg: a um comprimido de α -metildopa num balão volumétrico de 100 mL, adicionar cerca de 70 mL de fase móvel e agitar mecanicamente por 30 minutos para completa desintegração. Completar o volume com fase móvel. Pipetar 25 mL da solução para um balão volumétrico de 100 mL, diluir e completar o volume com a fase móvel. Filtrar uma porção em membrana filtrante de 0,45 μ m (concentração teórica final = 0,625 mg/mL de α -metildopa).

Preparação da amostra para comprimidos de 500 mg: a um comprimido de α -metildopa num balão volumétrico de 200 mL, adicionar cerca de 160 mL de fase móvel e agitar mecanicamente por 30 minutos. Completar o volume com fase móvel. Pipetar 25 mL da solução para um balão volumétrico de 100 mL, diluir e completar o volume com a fase móvel. Filtrar uma porção em membrana filtrante de 0,45 μ m (concentração teórica final = 0,625 mg/mL de α -metildopa).

Condições cromatográficas:

Fase móvel: num balão volumétrico de 1000 mL adicionar 0,012 mol de L-fenilalanina e 0,006 mol de cobre (II). Dissolver e completar o volume com água. Filtrar e degaseificar.

Deteção: espectrofotômetro de comprimento de onda em 280 nm.

Fluxo: 1 mL/min.

Coluna: C₁₈ (250 mm x 4,6 mm D.I.).

Volume a ser injetado: 20 μ L.

b) Método por cromatografia líquida de alta eficiência com detecção em fluorescência segundo Rona e colab.:

Preparo do padrão interno: preparar uma solução estoque de dopa 1 mg/mL em ácido perclórico 0,2 mol/L. Diluir em ácido perclórico 0,2 mol/L de modo a preparar uma solução de 10 μ g/mL. Diluir novamente para obter uma solução de 1 μ g/mL.

Preparo do padrão: transferir 100 mg de padrão de α -metildopa para um balão volumétrico de 100 mL, dissolver e completar o volume com ácido perclórico 0,2 mol/L (concentração = 1 mg/mL). Pipetar 1 mL para um balão volumétrico de 100 mL, diluir e completar o volume com ácido perclórico 0,2 mol/L (concentração = 10 μ g/mL). Pipetar 1 mL para um balão volumétrico de 100 mL, diluir e completar o volume com ácido perclórico 0,2 mol/L (concentração = 100 ng/mL). Pipetar 1 mL para um balão volumétrico de 10 mL, diluir e completar o volume com ácido perclórico 0,2 mol/L (concentração = 10 ng/mL).

Para a curva de calibração, adicionar para cada 1mL de plasma do branco, quantidades de α -metildopa equivalentes a 0, 10, 100, 250, 1000 e 3000 ng (oriundas das soluções acima preparadas) e seguir como indica a extração do plasma proveniente do preparo da amostra (logo abaixo).

Observação: as soluções estoque são estáveis por 1 mês em refrigerador à -20°C. E as diluições são preparadas semanalmente e estocadas em refrigerador à 4°C.

Preparo do plasma do branco e da amostra: logo após a coleta do sangue de indivíduo saudável e livre da droga (para o branco) e dos indivíduos que tomaram o comprimido de α -metildopa (para a amostra), prevenir a coagulação através da adição de 15 mg de sal EDTA sódico para cada 15 mL de sangue. O anticoagulante (15 g) deve ser dissolvido em 0,15 mL de água destilada antes da adição. O sangue tratado com anticoagulante é centrifugado à 1500 g por 10 minutos, é obtido o plasma, que deve ser armazenado à -20°C até o uso.

Extração do plasma: a 1 mL do plasma adicionar 1 mL de solução de padrão interno e 1 mL de ácido clorídrico 1 mol/L. Homogenizar por 5 segundos em agitador Vortex e despejar para dentro de uma coluna de extração com fase sólida Bond-Elut C18 (1 mL) previamente ativada com 1 mL de metanol e 1 mL de ácido clorídrico 0,25 mol/L. Lavar a coluna com 0,2 mL de água bidestilada e secar com fluxo de ar. Depois de 5 minutos de eluição carregar a coluna com 0,3 mL de ácido perclórico 0,2 mol/L : acetonitrila (9:1, v/v) e recolher o eluato. Repetir este procedimento para o branco.

Condições cromatográficas:

Fase móvel:

Solvente A = mistura de ácido heptanossulfônico sal sódico 5 mmol/L contendo fosfato dihidrogênio de sódio 0,05 mol/L (pH 3,2, ajustado com ácido fosfórico 1 mol/L) com acetonitrila na proporção 95:5, v/v.

Solvente B: acetonitrila.

TABELA 3. PROGRAMA DE ELUIÇÃO

Tempo (minutos)	Proporção de Solvente A (%)	Proporção de Solvente B (%)	Modo de eluição
0-15	100	0	isocrático
15-18	100 a 25	0 a 75	gradiente linear
18-25	25	75	isocrático
25-32	25 a 100	75 a 0	gradiente linear
32-45	100	0	isocrático

Deteção: comprimentos de onda de excitação = 270 nm, e de emissão = 320 nm.

Fluxo: 1,0 mL/min.

Coluna: Nucleosil 7 C₁₈ (250 mm x 4 mm D.I.), e coluna de guarda 7 C-18 (30 mm x 4 mm D.I.),.

Volume a ser injetado: 100 μ L.

c) Método por cromatografia líquida de alta eficiência acoplada ao espectrômetro de massa segundo Oliveira e colab.:

Preparo do padrão interno: preparar uma solução de concentração de dopafenil-D3 10 $\mu\text{g/mL}$ em metanol-água (50:50, v/v) contendo solução de ácido clorídrico 1 mmol/L na concentração de 1 mg/mL.

Preparo do padrão: transferir 100 mg de padrão de α -metildopa para um balão volumétrico de 100 mL, adicionar solução de ácido clorídrico 1 mmol/L de modo a ficar numa concentração de 1 mg/mL. Dissolver e completar o volume com metanol-água (50:50, v/v) (concentração = 1 mg/mL). Pipetar 1 mL para um balão volumétrico de 100 mL, diluir e completar o volume com metanol-água (50:50, v/v) (concentração = 10 $\mu\text{g/mL}$). Pipetar 1 mL para um balão volumétrico de 100 mL, diluir e completar o volume com metanol-água (50:50, v/v) (concentração = 100 ng/mL). Pipetar 1 mL para um balão volumétrico de 10 mL, diluir e completar o volume com metanol-água (50:50, v/v) (concentração = 10 ng/mL). Pipetar 1 mL para um balão volumétrico de 10 mL, diluir e completar o volume com metanol-água (50:50, v/v) (concentração = 1 ng/mL).

Para a curva de calibração, adicionar para cada 200 μL de plasma do branco, quantidades de α -metildopa equivalentes a 4, 10, 20, 40, 100, 200, 400 e 1000 ng (oriundas das soluções acima preparadas) e seguir como indica a extração do plasma proveniente do preparo da amostra (logo abaixo).

Observação: as soluções de α -metildopa para a curva de calibração são distribuídas em alíquotas de 1 a 5 mL para tubos Eppendorf e armazenadas em refrigerador à -20°C até que sejam utilizadas.

Preparo do plasma do branco e da amostra: logo após a coleta do sangue de indivíduo saudável e livre da droga (para o branco) e dos indivíduos que tomaram o comprimido de α -metildopa (para a amostra), prevenir a coagulação através da adição de heparina sódica. O sangue tratado com anticoagulante é centrifugado à 2000 g por 5 minutos à 4°C , e é obtido o plasma, que deve ser armazenado à -20°C até o uso.

Extração do plasma: primeiramente aguardar para que o plasma esteja descongelado e à temperatura ambiente. A 200 μ L de plasma contido num tubo de vidro descartável (não siliconizado e de 15 mL) adicionar 200 μ L de água ultra pura, 50 μ L de solução de padrão interno e 50 μ L de ácido perclórico 10% v/v. Homogenizar em agitador Vortex e para extrair impurezas lipofílicas, adicionar 4 mL de diclorometano. Misturar em agitador Vortex por 40 segundos. Centrifugar à 2000 g por 10 minutos e 200 μ L da camada aquosa (superior) são transferidas para o microvial do auto-amostrador do HPLC.

Condições cromatográficas:

Fase móvel: misturar acetonitrila-água (10:90, v/v) e adicionar ácido fórmico de modo a obter 10 mmol/L.

Deteccção: espectrômetro de massa equipado com fonte de ionização por eletrospray.

Fluxo: 0,15 mL/min.

Coluna: Genesis C₁₈ 4 μ (100 mm x 2,1 mm D.I.), e coluna de guarda 7 C-18 (30 mm x 4 mm D.I.),.

Volume a ser injetado: 40 μ L.

d) Método por cromatografia líquida de alta eficiência segundo Official Methods of Analysis of the Association of official Analytical Chemists:

Preparo do padrão: transferir cerca de 50 mg de padrão de α -metildopa anidra, cuidadosamente pesados, para um balão volumétrico de 100 mL. Adicionar 70 mL de metanol-água (1:1), colocar em ultrassom até completa dissolução, agitando ocasionalmente. Esperar esfriar à temperatura ambiente, diluir e completar o volume com metanol-água (1:1). Misturar e filtrar uma porção em membrana filtrante de 0,45 μ m.

Preparo do padrão interno: transferir cerca de 22 g de teobromina para um balão volumétrico de 100 mL. Adicionar 80 mL de fase móvel, aquecer levemente em

banho-maria com agitação ocasional até dissolver, Esfriar, diluir e completar o volume com fase móvel.

Preparo do padrão de α -metildopa + padrão interno: transferir 4 mL de solução padrão de metildopa e 5 mL de solução de padrão interno para um balão volumétrico de 25 mL, diluir e completar o volume com fase móvel. Misturar e filtrar uma porção em membrana filtrante de 0,45 μ m.

Preparo da amostra pesar e pulverizar alguns comprimidos de α -metildopa. Transferir o equivalente a 125 mg de α -metildopa para um balão volumétrico de 250 mL, adicionar cerca de 170 mL de metanol-água (1:1), colocar em ultrassom agitando ocasionalmente durante o mesmo tempo, no mínimo, gasto para dissolver o padrão. Completar o volume com metanol-água (1:1) e filtrar uma porção em membrana filtrante de 0,45 μ m. Pipetar 4 mL para um balão volumétrico de 25 mL, adicionar 5 mL de solução de padrão interno, diluir e completar o volume com fase móvel (concentração teórica final = 80 μ g/mL).

Condições cromatográficas:

Fase móvel: num balão volumétrico de 1000 mL misturar 960 mL de ácido acético 3% com 40 mL de metanol. Filtrar e degaseificar.

Deteção: espectrofotômetro de comprimento de onda em 280 nm.

Fluxo: 1 mL/min.

Coluna: μ Bondapak C₁₈ (300 mm x 3,9 mm D.I.), com partículas de 10 μ m.

Volume a ser injetado: 20 μ L.

Condições do sistema: o tempo de retenção de α -metildopa é cerca de 4 minutos e de 9 minutos para teobromina. O fator de resolução entre α -metildopa e teobromina deve ser maior que 3,5. O desvio padrão relativo entre cinco replicatas de injeção do padrão deve ser menor ou igual a 2,0%.

e) Método por cromatografia líquida de alta eficiência segundo Metwally & Belal:

Preparo do padrão de α -metildopa: transferir cerca de 50 mg de padrão de α -metildopa anidra, cuidadosamente pesados, para um balão volumétrico de 100 mL. Adicionar 70 mL de ácido sulfúrico 0,05 mol/L, colocar em ultrassom até completa dissolução, agitando ocasionalmente. Esperar esfriar à temperatura ambiente, diluir e completar o volume com ácido sulfúrico 0,05 mol/L. Misturar e filtrar uma porção em membrana filtrante de 0,45 μ m.

Preparo do padrão de 3-O-metilmildopa: preparar como descrito no preparo do padrão de α -metildopa.

Preparo da amostra: pesar e pulverizar alguns comprimidos de α -metildopa. Transferir o equivalente a 500 mg de α -metildopa para um balão volumétrico de 100 mL, adicionar cerca de 70 mL de ácido sulfúrico 0,05 mol/L, colocar em ultrassom por 15 minutos. Completar o volume com ácido sulfúrico 0,05 mol/L e filtrar uma porção em membrana filtrante de 0,45 μ m. Pipetar 10 mL para um balão volumétrico de 100 mL, diluir e completar o volume com ácido sulfúrico 0,05 mol/L (concentração teórica final = 500 μ g/mL).

Condições cromatográficas:

Fase móvel: preparar uma mistura de metanol em água contendo 2% de ácido acético e 1-hexanossulfonato de sódio 0,005 mol/L na proporção 18:82. Ajustar o pH para $2,60 \pm 0,05$. Filtrar e degaseificar.

Deteção: espectrofotômetro de comprimento de onda em 280 nm.

Fluxo: 1,5 mL/min.

Coluna: μ Bondapak C₈ (150 mm x 4,6 mm D.I.), com partículas de 5 μ m.

Volume a ser injetado: 20 μ L.

Condições do sistema: o tempo de retenção de α -metildopa é cerca de 4,35 minutos e 8,93 minutos para 3-O-metilmétildopa. O desvio padrão relativo entre cinco replicatas de injeção do padrão deve ser menor ou igual a 2,0%.

B. Procedimento Experimental para Determinação da impureza 3-O-metilmétildopa em α -metildopa matéria-prima segundo a Farmacopéia Brasileira.

Técnica por cromatografia em camada delgada, utilizando celulose cromatográfica como suporte, com espessura de 0,25 mm.

Fase móvel: preparar uma mistura de *n*-butanol - ácido acético glacial - água, na proporção 65:15:25.

Preparo da amostra: transferir 100 mg de amostra para um balão volumétrico de 10 mL, dissolver e completar o volume com metanol.

Preparo do padrão: transferir 5 mg de padrão de 3-O-metilmétildopa para um balão volumétrico de 50 mL, dissolver e completar o volume com metanol.

Solução visualizadora (1): dissolver 300 mg de *p*-nitroanilina em 100 mL de ácido clorídrico 10 mol/L (Solução A). Dissolver 2,5 g de nitrito de sódio em 50 mL de água (Solução B). Misturar 90 mL da solução A com 10 mL da solução B no momento do uso.

Solução visualizadora (2): dissolver 25 g de carbonato de sódio em 100 mL de água.

Procedimento: efetuar pré-lavagem da placa com a fase móvel, colocando-a na câmara cromatográfica e deixando o solvente atingir o seu topo. Secar ao ar. Aplicar 20 μ L da solução amostra e 10 μ L da solução padrão na placa

cromatográfica e desenvolver o cromatograma por 10 cm. Retirar a cromatoplaça da câmara e secar em corrente de ar até desaparecimento do odor de ácido acético. Nebulizar a placa com solução nebulizadora (1), secar ao ar. Após, nebulizar a placa com solução visualizadora (2).

Resultados: a mancha principal de α -metildopa é preta sobre fundo rosa pálido ou laranja, com R_f em torno de 0,5. A mancha de 3-O-metilmethylidopa é escura e possui R_f de cerca de 0,65. A área de intensidade da mancha de 3-O-metilmethylidopa na solução amostra não deve ser maior que a observada na solução padrão (0,5%).

C. Técnicas espectrofotométricas para identificação e quantificação de α -metildopa

a) Método por espectrofotometria segundo as farmacopéias Brasileira (1996) e a USP 25:

Solução de tartarato ferroso: transferir 1 g de sulfato ferroso, 2 g de tartarato de sódio e potássio e 0,1 g de bissulfito de sódio para um balão volumétrico de 100 mL, dissolver e completar o volume com água. Preparar no momento do uso.

Solução tampão: transferir 50 g de acetato de amônio para um balão volumétrico de 1000 mL, dissolver e completar o volume com etanol a 20% (v/v). Ajustar o pH em 8,5 com hidróxido de amônio 6 mol/L.

Preparo do padrão: preparar uma solução de padrão de α -metildopa em ácido sulfúrico 0,05 mol/L de modo a obter uma concentração de 1mg/mL. Pipetar 5 mL da solução para um balão volumétrico de 100 mL, adicionar 5 mL de solução de tartarato ferroso e completar o volume com solução tampão.

Preparo da amostra: pesar e pulverizar alguns comprimidos de α -metildopa. Pesar o equivalente a 100 mg de α -metildopa para um balão volumétrico de 100

mL, adicionar cerca de 70 mL de ácido sulfúrico 0,05 mol/L, agitar mecanicamente por 15 minutos e completar o volume com ácido sulfúrico 0,05 mol/L. Pipetar 5 mL da solução para um balão volumétrico de 100 mL, adicionar 5 mL de solução de tartarato ferroso e completar o volume com solução tampão. Filtrar a solução final em papel de filtro quantitativo (concentração teórica final = 0,05 mg/mL de α -metildopa).

Preparo do branco: pipetar 5 mL de ácido sulfúrico 0,05 mol/L para um balão volumétrico de 100 mL, adicionar 5 mL de solução de tartarato ferroso e completar o volume com solução tampão.

Procedimento: determinar as absorbâncias das soluções padrão e amostra, em cubeta de 1 cm, no comprimento de onda máximo, em torno de 520 nm, utilizando o branco na cubeta de referência.

b) Método por espectrofotometria segundo a British Pharmacopoeia:

Preparo da solução citrato-sulfato de ferro (II): dissolver 1 g de metabissulfito em 200 mL de água e adicionar 0,5 mL de HCl 2 mol/L, 1,5 g de sulfato ferroso e 10 g de citrato de sódio. Preparar no momento do uso.

Preparo da solução tampão de glicina: misturar 42 g de carbonato de potássio com 180 mL de água e adicionar uma solução contendo 37,5 g de glicina e 15 mL de amônia 13,5 mol/L em 180 mL de água. Diluir para 500 mL com água e agitar.

Preparo do padrão: preparar uma solução de α -metildopa em ácido sulfúrico 0,05 mol/L de modo a obter uma concentração de 1mg/mL. Pipetar 5 mL da solução para um balão volumétrico de 100 mL, adicionar 2 mL de solução de citrato-sulfato de ferro (II), 8 mL de solução tampão glicina e completar o volume com água.

Preparo da amostra: pesar e pulverizar alguns comprimidos de α -metildopa. Transferir o equivalente a 100 mg de α -metildopa anidra para um balão volumétrico de 100 mL, adicionar cerca de 70 mL de ácido sulfúrico 0,05 mol/L, agitar mecanicamente por 15 minutos e completar o volume com ácido sulfúrico 0,05 mol/L. Pipetar 5 mL da solução para um balão volumétrico de 100 mL, adicionar 2 mL de solução de citrato-sulfato de ferro (II), 8 mL de solução tampão glicina e completar o volume com água. Filtrar a solução final (concentração teórica final = 0,05 mg/mL de α -metildopa).

Preparo do branco: pipetar 5 mL de ácido sulfúrico 0,05 mol/L para um balão volumétrico de 100 mL, adicionar 2 mL de solução de citrato-sulfato de ferro (II), 8 mL de solução tampão glicina e completar o volume com água.

Procedimento: determinar as absorbâncias das soluções padrão e amostra, em cubeta de 1 cm, no comprimento de onda máximo, em torno de 545 nm, utilizando o branco na cubeta de referência.

c) Método por análise com injeção em fluxo segundo Berzas e colab. (Figura 18):

Preparo da solução tampão de HOAc/AcO⁻ 0,01 mol/L pH 5,0 (British Pharmacopoeia, 1993): transferir 13,6 g de acetato de sódio para um balão volumétrico de 1000 mL, dissolver em água, adicionar 6 mL de ácido acético glacial e completar o volume com água. Medir o pH e corrigir se necessário.

Preparo do padrão: preparar uma curva de calibração com concentrações entre $8,0 \times 10^{-5}$ e $8,0 \times 10^{-4}$ mol/mL de α -metildopa. Preparar uma solução estoque de α -metildopa com concentração $1,0 \times 10^{-3}$ mol/L em solução tampão 0,01 mol/L de HOAc/AcO⁻ pH 5,0. Fazer as devidas diluições.

Preparo da amostra: a um comprimido de α -metildopa de 250 mg num balão volumétrico de 250 mL, adicionar cerca de 200 mL de solução tampão acético, colocar no banho de ultrassom por alguns minutos e agitar mecanicamente até total desintegração do comprimido. Completar o volume com solução tampão acético. Filtrar a solução em papel de filtro quantitativo. Pipetar 1 mL da solução para um balão volumétrico de 250 mL, diluir e completar o volume com solução tampão acético. Pipetar 2 mL da solução para um balão volumétrico de 25 mL, diluir e completar o volume com solução tampão acético (concentração teórica final = $3,2 \times 10^{-4}$ mg/mL).

Procedimento: injetar 350 μ L de cada solução, utilizando água como carregador (temperatura 60°C), e solução de hidróxido de sódio (0,6 mol/L) como reagente. A mistura passa pelo reator (1,0 m de comprimento, d.i. = 0,5 mm), sob fluxo de 1,25 mL/min e a solução é carregada para a célula. Trinta segundos após a injeção da amostra a bomba é interrompida manualmente, e a variação da absorbância é monitorada em 360 nm.

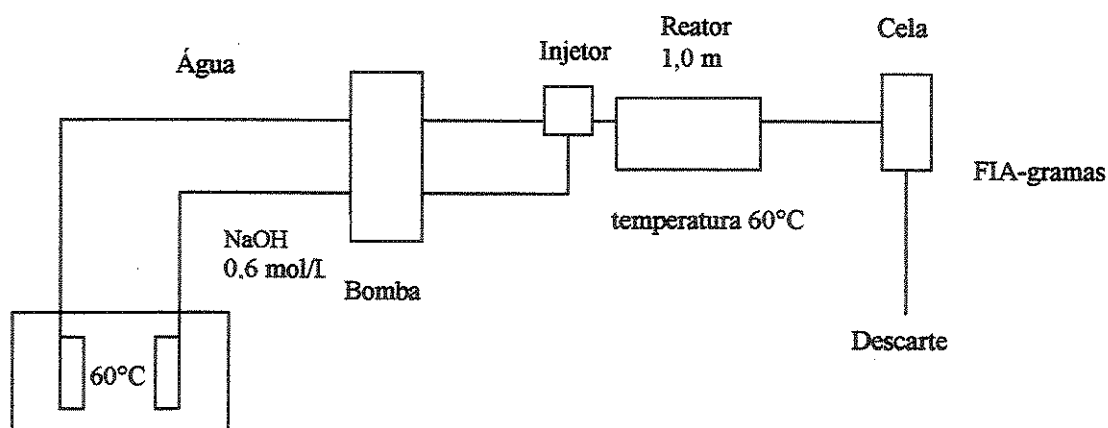


Figura 18. Diagrama esquemático da técnica em injeção em fluxo.

d) Método por espectrofotometria segundo Issopoulos:

Mistura ferro (III)-o-fenantrolina: transferir 0,20 g de o-fenantrolina monohidratada, 2,0 mL de solução de HCl 1 mol/L e 0,16 g de sulfato férrico amoniacal para um balão volumétrico de 100 mL, dissolver e completar o volume com água. A solução é estável por 4 semanas se estocada em frasco escuro e no refrigerador.

Preparo do padrão: transferir 50 mg de padrão de α -metildopa para um balão volumétrico de 250 mL, dissolver e completar o volume com água. Pipetar 5 mL da solução para um balão volumétrico de 100 mL, diluir e completar o volume com água. Para a curva de calibração, transferir volumes entre 0,25 e 12,5 mL da solução para balões volumétricos de 50 mL, adicionar um volume máximo de água, ajustar o pH em $5,0 \pm 0,2$, adicionar 2 mL de solução ferro (III)-o-fenantrolina, e completar o volume com água. Agitar, transferir o conteúdo para um tubo de 50 mL e deixar em banho-maria à $50 \pm 0,5^\circ\text{C}$ por 45-50 minutos. Esfriar a solução imediatamente à temperatura ambiente utilizando banho de água fria.

Preparo do branco: transferir 45 mL de água para um balão volumétrico de 50 mL, ajustar o pH em $5,0 \pm 0,2$, adicionar 2 mL de solução ferro (III)-o-fenantrolina, e completar o volume com água. Agitar, transferir o conteúdo para um tubo de 50 mL e deixar em banho-maria à $50 \pm 0,5^\circ\text{C}$ por 45-50 minutos. Esfriar a solução imediatamente à temperatura ambiente utilizando banho de água fria.

Preparo da amostra: pesar e pulverizar alguns comprimidos de α -metildopa. Pesar o equivalente a 50 mg de α -metildopa anidra para um balão volumétrico de 250 mL, adicionar cerca de 200 mL de água, agitar mecanicamente e completar o volume com água. Pipetar 5 mL da solução para um balão volumétrico de 100 mL, diluir e completar o volume com água. Pipetar 5 mL da solução para um balão volumétrico de 50 mL, adicionar um volume máximo de água, ajustar o pH em $5,0 \pm 0,2$, adicionar 2 mL de solução ferro (III)-o-fenantrolina, e completa-se o volume com água. Agitar, transferir o conteúdo para um tubo de 50 mL e deixar em banho-

maria à $50 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ por 45-50 minutos. Esfriar a solução imediatamente à temperatura ambiente utilizando banho de água fria. Filtrar a solução final (concentração teórica final = 1000 ppb de α -metildopa).

Procedimento: medir a absorbância das soluções em 510 nm em cubeta de 1 cm, utilizando o branco na cubeta de referência.

e) Método enzimático-espectrofotômetro segundo Vieira & Fatibello:

Purificação de Polyclar SB-100: ferver por 10 minutos em HCl 10% v/v e lavar com água destilada até ficar livre de íons cloreto. Lavar com acetona e secar.

Preparo do extrato: pesar 25 g da raiz de batata doce previamente descascada, picada e congelada e misturar com 100 mL de tampão fosfato 0,1 mol/L (pH 7,0) num liquidificador contendo 2,5 g de Polyclar SB-100. Homogeneizar por 2 minutos à $4-6^{\circ}\text{C}$. Filtrar rapidamente através de quatro camadas de tecido e centrifugar à $25000 \times g$ (18000 rev/min) por 30 minutos à 4°C . Armazenar o sobrenadante nesta temperatura num refrigerador e utilizá-lo como fonte enzimática.

Determinação da atividade da enzima polifenol oxidase: misturar 0,2 mL do sobrenadante preparado acima com 2,8 mL de solução de α -metildopa 0,05 mol/L em tampão fosfato 0,1 mol/L (pH 7,0) à 25°C . Fazer em triplicata. Medir a absorbância em 410 nm, em cubeta de quartzo de 1 cm, dos pigmentos formados na polimerização da quinona produzida. Uma unidade de atividade de polifenil oxidase é definida como a quantidade de enzima que causa uma aumento de 0,001 na absorbância/min.

Preparo do padrão: para a curva de calibração preparar uma solução estoque contendo $1,0 \times 10^{-2}$ mol/L de padrão de α -metildopa em tampão fosfato 0,1 mol/L (pH 7,0). Fazer as diluições obtendo concentrações entre $2,0 \times 10^{-4}$ e $6,0 \times 10^{-3}$ mol/L de α -metildopa.

Preparo da amostra: pesar e pulverizar alguns comprimidos de α -metildopa. Pesar o equivalente a 211,0 mg de metildopa para um balão volumétrico de 100 mL, agitar mecanicamente ou usar banho de ultrassom até completa desintegração e completar o volume com tampão fosfato 0,1 mol/L (pH 7,0). Pipetar 10 mL para um balão volumétrico de 100 mL, diluir e completar o volume com a mesma solução tampão. Filtrar a solução em papel de filtro no. 1 (concentração teórica final = $1,0 \times 10^{-3}$ mol/L).

Procedimento: numa cela de quartzo de 1 cm, adicionar 0,2 mL do extrato contendo 585 unidades/min de polifenol oxidase a pH 7,0 e 2,8 mL de solução padrão ou amostra em tampão fosfato 0,1 mol/L (pH 7,0), agitar por 10 minutos e ler a absorbância em 480 nm.

f) Método por análise com injeção em fluxo segundo Nevado e colab. (Figura 19):

Preparo da solução tampão de HAc/Ac⁻ 0,02 mol/L pH 4,8: dissolver 3,96 g de acetato de sódio trihidratado em água num balão volumétrico de 1000 mL e adicionar 10,5 mL de ácido acético 2 mol/L. Completar o volume com água e ajustar o pH se necessário.

Preparo do padrão: preparar uma curva de calibração com concentrações entre $5,0 \times 10^{-5}$ e $5,0 \times 10^{-4}$ mg/mL de padrão de α -metildopa. Preparar uma solução estoque de α -metildopa com concentração 1×10^{-3} mol/L em solução tampão 0,02 mol/L de HAc/Ac⁻ pH 4,8 (esta deve ser estocada em frasco escuro à 4°C). Fazer as devidas diluições.

Preparo da amostra: a um comprimido de α -metildopa de 250 mg num balão volumétrico de 250 mL, adicionar cerca de 200 mL de solução tampão acético, colocar no banho de ultrassom por alguns minutos e agitar mecanicamente até

total desintegração do comprimido. Completar o volume com solução tampão acético. Filtrar a solução em papel de filtro quantitativo. Pipetar 1 mL da solução para um balão volumétrico de 200 mL, diluir e completar o volume com solução tampão acético. Pipetar 1 mL da solução para um balão volumétrico de 25 mL, diluir e completar o volume com solução tampão acético (concentração teórica final = $2,0 \times 10^{-4}$ mg/mL de α -metildopa).

Procedimento: injetar 200 μ L de cada solução com solução de metaperiodato de sódio (0,1 g/L) como carregador, e a mistura passa pelo reator (1,6 m de comprimento, submerso num banho de água termostático à 45°C). Sob fluxo de 3,0 mL/min a solução é carregada para a célula. Medir a absorbância em 473 nm em cubeta de 1 cm.

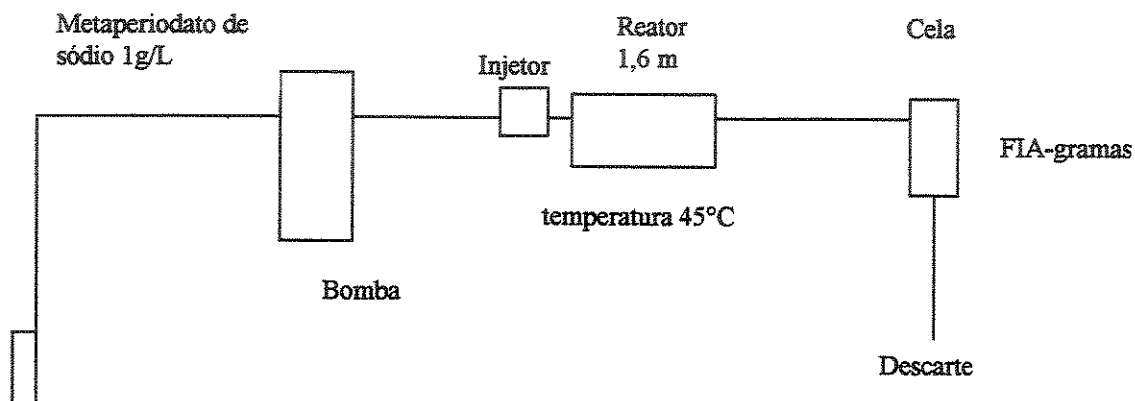


Figura 19. Diagrama esquemático da técnica em injeção em fluxo.

g) Método por espectrofotometria segundo Helaleh e colab.:

Solução de nitrato de cério (IV): preparar uma solução estoque de $(\text{NH}_4)_2\text{Ce}(\text{NO}_3)_6$ 0,01 mol/L em ácido sulfúrico 2 mol/L.

Preparo do padrão: preparar uma solução de padrão de α -metildopa em água de modo a obter uma concentração de 2,5 mg/mL. Para a curva de calibração pipetar volumes entre 0,5 e 1,0 mL para um balão volumétrico de 10 mL e adicionar 3,5 mL de solução de nitrato de cério (IV). Colocar a mistura em banho de água à

80°C com agitação por 20 a 25 minutos. Após, esfriar o balão tampado e completar o volume com água.

Preparo da amostra: pesar e pulverizar alguns comprimidos de α -metildopa. Transferir o equivalente a 250 mg de α -metildopa para um balão volumétrico de 100 mL, adicionar cerca de 70 mL de água, agitar mecanicamente por 30 minutos. Filtrar esta solução em papel de filtro quantitativo transferindo para outro balão volumétrico de 100 mL e lavar bem com água o pó retido no filtro. Completar o volume com água. Pipetar 0,8 mL da solução para um balão volumétrico de 10 mL e adicionar 3,5 mL de solução de nitrato de cério (IV). Colocar a mistura em banho de água à 80°C com agitação por 20 a 25 minutos. Após, esfriar o balão tampado e completar o volume com água (concentração teórica final = 0,2 mg/mL de α -metildopa).

Preparo do branco: pipetar 1 mL de água para um balão volumétrico de 10 mL e adicionar 3,5 mL de solução de nitrato de cério (IV). Colocar a mistura em banho de água à 80°C com agitação por 20 a 25 minutos. Após, esfriar o balão tampado e completar o volume com água.

Procedimento: determinar as absorbâncias das soluções padrão e amostra, em cubeta de 1 cm, no comprimento de onda máximo, em torno de 550 nm, utilizando o branco na cubeta de referência.

h) Método por espectrofotometria segundo Walash e colab.:

Procedimento A: usando reagente PDAC.

Preparo do padrão: preparar uma solução de padrão de α -metildopa em ácido acético 0,01 mol/L metanólico (medir um volume de ácido acético num balão volumétrico afim de obter uma concentração de 0,01 mol/L e completar o volume com metanol) de modo a obter uma concentração de $1,0 \times 10^{-3}$ mol/L (0,24 g/L).

Para a curva de calibração pipetar volumes entre 0,2 e 2,5 mL para um balão volumétrico de 10 mL e adicionar 0,5 mL de hidróxido de sódio alcoólico (1% m/v em metanol). Deixar em repouso por 5 minutos. Então adicionar 1,0 mL de solução de acetato de sódio (50% em metanol) e 0,5 mL de PDAC (0,1% m/v em metanol). Completar o volume com metanol, misturar, aguardar 15 minutos.

Preparo da amostra: pesar e pulverizar alguns comprimidos de α -metildopa. Pesar o equivalente a 240 mg de α -metildopa para um balão volumétrico de 100 mL, adicionar cerca de 70 mL de ácido acético 0,01 mol/L metanólico, agitar mecanicamente por 15 minutos e completar o volume com a mesma solução. Filtrar a solução em papel de filtro quantitativo. Pipetar 10 mL da solução para um balão volumétrico de 100 mL, diluir e completar o volume com o ácido. Transferir 2 mL da solução para um balão volumétrico de 10 mL e adicionar 0,5 mL de hidróxido de sódio alcoólico (1% m/v em metanol). Deixar em repouso por 5 minutos. Então adicionar 1,0 mL de solução de acetato de sódio (50% em metanol) e 0,5 mL de PDAC (0,1% m/v em metanol). Completar o volume com metanol, misturar, aguardar 15 minutos (concentração teórica final = 0,048 mg/mL de α -metildopa).

Preparo do branco: transferir 2 mL de ácido acético 0,01 mol/L metanólico para um balão volumétrico de 10 mL e adicionar 0,5 mL de hidróxido de sódio alcoólico (1% m/v em metanol). Deixar em repouso por 5 minutos. Então adicionar 1,0 mL de solução de acetato de sódio (50% em metanol) e 0,5 mL de PDAC (0,1% m/v em metanol). Completar o volume com metanol, misturar, aguardar 15 minutos.

Procedimento: determinar as absorbâncias das soluções padrão e amostra, em cubeta de 1 cm, no comprimento de onda máximo, em torno de 440 nm, utilizando o branco na cubeta de referência.

Procedimento B: usando reagente PDAB.

Seguir como no procedimento A, exceto adicionar 1,0 mL de reagente PDAB (1% m/v em metanol) ao invés de 0,5 mL de reagente PDAC (0,1% m/v em metanol), e determinar as absorvâncias das soluções padrão e amostra em $\lambda = 540 \text{ nm}$.

i) Método por espectrofotometria segundo Salem:

Preparo da solução de metavanadato de amônio 0,02 mol/L: transferir cerca de 2,34 g de metavanadato de amônio para um balão volumétrico de 1000 mL, dissolver e completar o volume com água. Padronizar a solução iodometricamente (Vogel, 1978).

Preparo do padrão: preparar uma solução de padrão de α -metildopa em ácido acético 0,01 mol/L metanólico de modo a obter uma concentração de 0,02 mol/L (4,77 g/L). Para a curva de calibração pipetar volumes que contenham entre 0,1 e 0,95 mg de α -metildopa para um balão volumétrico de 10 mL e adicionar 1,0 mL de metavanadato de amônio 0,02 mol/L). Completar o volume com ácido acético 0,01 mol/L e deixar em repouso durante 20 a 25 minutos.

Preparo da amostra: pesar e pulverizar alguns comprimidos de α -metildopa. Pesar o equivalente a 1,20 g de α -metildopa para um balão volumétrico de 250 mL, adicionar cerca de 180 mL de ácido acético 0,01 mol/L e agitar em agitador mecânico por 15 minutos. Completar o volume com ácido acético 0,01 mol/L. Pipetar um volume que contenha 0,5 mg de α -metildopa para um balão volumétrico de 10 mL e adicionar 1,0 mL de metavanadato de amônio 0,02 mol/L). Completar o volume com ácido acético 0,01 mol/L e deixar em repouso durante 20 a 25 minutos.

Preparo do branco: num balão volumétrico de 10 mL adicionar 1,0 mL de metavanadato de amônio 0,02 mol/L). Completar o volume com ácido acético 0,01 mol/L e deixar em repouso durante 20 a 25 minutos.

Procedimento: determinar as absorbâncias das soluções padrão e amostra, em cubeta de 1 cm, no comprimento de onda de 485 nm, utilizando o branco na cubeta de referência.

j) Método por espectrofotometria segundo Helaleh e colab.:

Solução de iodato de potássio: preparar uma solução estoque de concentração 0,1 mol/dm em água.

Preparo do padrão: preparar uma solução de padrão de α -metildopa em água de modo a obter uma concentração de 2,5 mg/mL. Para a curva de calibração pipetar volumes entre 0,5 e 3,0 mL para um balão volumétrico de 10 mL e adicionar 1,0 mL de solução de iodato de potássio. Colocar a mistura em banho de água à 30°C e, a cada 30 s, retirar um balão, esfriá-lo tampado e completar o volume com água.

Preparo da amostra: pesar e pulverizar alguns comprimidos de α -metildopa. Transferir o equivalente a 250 mg de α -metildopa para um balão volumétrico de 100 mL, adicionar cerca de 70 mL de água, agitar mecanicamente por 30 minutos. Filtrar esta solução em papel de filtro Whatman no. 1 transferindo para outro balão volumétrico de 100 mL e lavar bem com água o pó retido no filtro. Completar o volume com água. Pipetar 1,5 mL da solução para um balão volumétrico de 10 mL e adicionar 1,0 mL de solução de iodato de potássio. Colocar a mistura em banho de água à 30°C e após 30 s, retirar o balão, esfriá-lo tampado e completar o volume com água (concentração teórica final = 0,375 mg/mL de α -metildopa).

Preparo do branco: pipetar 1,5 mL de água para um balão volumétrico de 10 mL e adicionar 1,0 mL de solução de iodato de potássio. Colocar a mistura em banho de água à 30°C e após 30 s, retirar o balão, esfriá-lo tampado e completar o volume com água.

Procedimento: determinar as curvas de absorbância-tempo das soluções padrão e amostra, em cubeta de 1 cm, nos comprimento de onda 310 e 470 nm, utilizando o branco na cubeta de referência. O gráfico de calibração é obtido plotando $\log V$ (constante de razão inicial em que $V=K^t \cdot C_n$, onde K^t é a constante de razão em relação à concentração do reagente específico e n é ordem de reação) versus $\log c$ (concentração de α -metildopa).

I) Método por espectrofotometria segundo Milovanovic e colab.:

Solução de peróxido de hidrogênio: preparar uma solução 9,8%.

Solução de molibdênio: preparar uma solução de concentração 0,001 mol/L de molibdato de amônio em nitrato de potássio 0,001 mol/L.

Solução de tampão carbonato: misturar bicarbonato de sódio 1 mol/L e carbonato de sódio 1 mol/L.

Preparo do padrão: preparar uma solução de padrão de α -metildopa em água de modo a obter uma concentração de 0,5 mg/mL. Para a curva de calibração pipetar volumes entre 2,0 e 8,0 mL para um balão volumétrico de 100 mL e completar o volume com água.

Preparo da amostra: transferir cerca de 50 mg da amostra para um balão volumétrico de 100 mL, adicionar cerca de 70 mL de água, agitar até completa dissolução. E completar o volume com água. Pipetar 5,0 mL da solução para um balão volumétrico de 100 mL e completar o volume com água.

Procedimento: a reação deve ocorrer num recipiente especial com três compartimentos: no primeiro adicionar quantidade de solução de peróxido de hidrogênio 9,8% suficiente para ficar numa concentração de 0,01 mol/L considerando um volume final de 25 mL; no segundo adicionar volumes de soluções de molibdato de amônio afim de ficar numa concentração de 10^{-5} mol/L e 1 mL de solução padrão ou amostra; no terceiro compartimento adicionar solução tampão para uma concentração de 0,4 mol/L (pH 9,8) e água suficiente para um total de 25 mL. A cela é deixada à 25°C num termostato e a reação é iniciada pela agitação da mistura de todas as soluções. Determinar as curvas de absorbância-tempo das soluções padrão e amostra, em cubeta de 5 cm, no comprimento de onda 350 nm, utilizando o branco na cubeta de referência. As leituras de absorbância são realizadas a cada 30 s durante 5 minutos de reação. O gráfico de calibração é obtido plotando a concentração de α -metildopa versus tangente de a.

m) Método por espectrofotometria segundo Helaleh e colab.:

Solução de hidróxido de sódio: preparar uma solução de concentração 0,1 mol/L de NaOH.

Preparo do padrão: preparar uma solução de padrão de α -metildopa em água de modo a obter uma concentração de 1,0 mg/mL. Para a curva de calibração pipetar volumes entre 0,1 e 1,0 mL para um balão volumétrico de 10 mL, adicionar 1,0 mL de solução de hidróxido de sódio e completar o volume com água.

Preparo da amostra: pesar e pulverizar alguns comprimidos de α -metildopa. Transferir o equivalente a 100 mg de α -metildopa para um balão volumétrico de 100 mL, adicionar cerca de 70 mL de água, agitar mecanicamente por 30 minutos. Filtrar esta solução em papel de filtro Whatman no. 1 transferindo para outro balão volumétrico de 100 mL e lavar bem com água o pó retido no filtro. Completar o volume com água. Pipetar 0,5 mL da solução para um balão volumétrico de 10

mL, adicionar 1,0 mL de solução de hidróxido de sódio e completar o volume com água (concentração teórica final = 0,05 mg/mL de α -metildopa).

Preparo do branco: pipetar 0,5 mL de água para um balão volumétrico de 10 mL, adicionar 1,0 mL de solução de hidróxido de sódio e completar o volume com água.

Procedimento: após agitar a solução branco, padrão ou amostra, transferir imediatamente para a cela do espectrofotômetro e após 1 minuto iniciar as leituras de 30 em 30 segundos até 4 minutos e determinar a curva de absorbância-tempo, no comprimento de onda 430 nm. O gráfico de calibração é obtido plotando log K (intercepto) versus log c (concentração de α -metildopa).

n) Método por espectrofotometria segundo Nagaralli e colab.:

Mistura ferro (III)-o-fenantrolina: transferir 0,20 g de o-fenantrolina monohidratada, 2,0 mL de solução de HCl 1 mol/L e 0,16 g de sulfato férrico amoniacal dodecahidratado para um balão volumétrico de 100 mL, dissolver e completar o volume com água.

Mistura ferro (III)-bipiridila: transferir 0,16 g de 2,2'-bipiridila, 2,0 mL de solução de HCl 1 mol/L e 0,16 g de sulfato férrico amoniacal dodecahidratado para um balão volumétrico de 100 mL, dissolver e completar o volume com água.

Preparo do padrão: transferir 50 mg de padrão de α -metildopa para um balão volumétrico de 100 mL, dissolver e completar o volume com água. Pipetar 1 mL da solução para um balão volumétrico de 100 mL, diluir e completar o volume com água. Para a curva de calibração, transferir volumes entre 0,25 e 1,5 mL da solução para balões volumétricos de 10 mL, adicionar 8 mL de solução ferro (III)-o-fenantrolina ou 5 mL de solução ferro (III)-bipiridila, aquecer à 80°C por 15

minutos se for o primeiro método ou por 10 minutos se for o segundo método. Esfriar à temperatura ambiente e completar o volume com água.

Preparo da amostra: pesar e pulverizar alguns comprimidos de α -metildopa. Pesar o equivalente a 50 mg de α -metildopa para um balão volumétrico de 100 mL, adicionar cerca de 70 mL de água, agitar mecanicamente e completar o volume com água. Pipetar 1 mL da solução para um balão volumétrico de 100 mL, diluir e completar o volume com água. Pipetar 0,5 mL da solução para um balão volumétrico de 10 mL, adicionar 8 mL de solução ferro (III)-o-fenantrolina ou 5 mL de solução ferro (III)-bipiridila, aquecer à 80°C por 15 minutos se for o primeiro método ou por 10 minutos se for o segundo método. Esfriar à temperatura ambiente e completar o volume com água. Filtrar a solução final (concentração teórica final = 250 ppb de α -metildopa).

Procedimento: medir a absorbância das soluções em 510 nm para o primeiro método ou em 522 nm para o segundo método, em cubeta de 1 cm, utilizando o branco na cubeta de referência.

D. Técnica titulométrica para quantificação de α -metildopa

a) Método por titulação colorimétrico segundo Pathak e colab.:

Preparo da solução de N-bromosuccinamida $2,0 \times 10^{-2}$ mol/L: transferir cerca de 356 mg de N-bromosuccinamida para um balão volumétrico de 100 mL, adicionar um mínimo de água quente para dissolver, e completar o volume com água fria. Padronizar a solução.

Padronização da solução de N-bromosuccinamida $2,0 \times 10^{-2}$ mol/L (Barakat & El-Wahab, 1954): a uma solução de 1 g de iodeto de potássio em 10 mL de ácido acético 3%, adicionar volumetricamente 10 mL de solução de N-bromosuccinamida $2,0 \times 10^{-2}$ mol/L num erlenmeyer com tampa. O iodo liberado

é titulado com solução padrão de tiossulfato de sódio até que a solução se torne amarelo claro. Contendo ainda iodo livre, adicionar algumas gotas de solução de amido 1% como indicador, e continuar a titulação, gota a gota, com agitação contínua, até que a solução de coloração azul se torne incolor.

Cálculo: $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \text{ (mL)} \times N \text{ Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \times 0,089 = \text{g de N-bromosuccinamida}$

Preparo da amostra: pesar e pulverizar alguns comprimidos de α -metildopa. Pesar o equivalente a 25 mg de α -metildopa para um balão volumétrico de 50 mL, dissolver em 10 mL de ácido sulfúrico concentrado com auxílio de leve aquecimento em banho de água por 2 minutos. Completar o volume com água. Transferir 5 mL da solução para um frasco de índice de iodo de 100 mL, adicionar 5 mL de água destilada e duas gotas de indicador vermelho de metila 0,04%. Misturar e titular com solução padrão de N-bromosuccinamida $2,0 \times 10^{-2} \text{ mol/L}$, com agitação contínua, até que a solução torne-se incolor. Fazer um branco para as devidas correções.

Cálculo: massa de α -metildopa ($M.M = 211$) na amostra (mg) = $1,055 \times (\text{volume de NBS consumido na amostra} - \text{volume de NBS consumido no branco (mL)})$

b) Método por titulação colorimétrica segundo Salem:

Preparo da solução de metavanadato de amônio 0,02 mol/L: transferir cerca de 2,34 g de metavanadato de amônio para um balão volumétrico de 1000 mL, dissolver e completar o volume com água. Padronizar a solução iodometricamente (Vogel, 1978).

Preparo da amostra: pesar e pulverizar alguns comprimidos de α -metildopa. Pesar o equivalente a 1,20 g de α -metildopa para um balão volumétrico de 250 mL, adicionar cerca de 180 mL de ácido acético 0,01 mol/L e agitar em agitador mecânico por 15 minutos. Completar o volume com ácido acético 0,01 mol/L.

Procedimento para titulação direta: transferir um volume de solução da amostra que contenha cerca de 19 mg de α -metildopa para um bequer de 100 mL, adicionar 15 mL de ácido clorídrico concentrado e diluir até cerca de 50 mL com água. Adicionar três gotas de indicador (vermelho de metila ou alaranjado de metila) e titular com solução de metavanadato de amônio 0,02 mol/L até mudança da coloração. Titular um branco sob as mesmas condições.

Procedimento para titulação indireta: transferir um volume de solução da amostra que contenha cerca de 19 mg de α -metildopa para um frasco de iodo de 100 mL, adicionar excesso de solução de metavanadato de amônio 0,02 mol/L, 15 mL de ácido clorídrico concentrado e diluir até cerca de 50 mL com água. Adicionar 10 mL de iodeto de potássio 20% e titular o iodo liberado com solução de tiossulfato de sódio 0,02 mol/L usando amido como indicador. Titular um branco sob as mesmas condições.

E. Técnica potenciométrica para quantificação de α -metildopa

a) Método potenciométrico segundo Athanasiou-Malaki & Koupparis:

Preparo da suspensão de fosfato de cobre (II): a 20 mL de fosfato de potássio 0,18 mol/L, adicionar 10 mL de cloreto de cobre (II) 0,16 mol/L com agitação. Centrifugar por 5 minutos, remover o sobrenadante, e ressuspender o precipitado em 30 mL de tampão borax 5×10^{-2} pH 9,1. Repetir a centrifugação e lavagem, e finalmente ressuspender o precipitado em 50 mL de tampão borax contendo 3 g de cloreto de sódio. O reagente deve permanecer em repouso por no mínimo 24 horas antes do uso e é estável por cerca de 15 dias.

Preparo do padrão: preparar uma solução estoque de padrão de α -metildopa $1,0 \times 10^{-2}$ mol/L transferindo 211 g de α -metildopa para um balão volumétrico de 100 mL, adicionar 5 mL de ácido clorídrico 0,1 mol/L para dissolver a droga e completar o volume com água. Para a curva de calibração pipetar volumes desde

5 mL para um balão volumétrico de 100 mL e completando o volume com água até a própria solução estoque (concentrações entre 5×10^{-4} e 1×10^{-2} mol/L de α -metildopa).

Preparo da amostra: pesar e pulverizar alguns comprimidos de α -metildopa. Pesar o equivalente a 200 mg de α -metildopa para um balão volumétrico de 100 mL, adicionar 5 mL de ácido clorídrico 0,1 mol/L e cerca de 60 mL de água, e agitar mecanicamente por 15 minutos. Completar o volume com água. Filtrar a solução em papel de filtro quantitativo. Pipetar 5 mL para um balão volumétrico de 50 mL, diluir e completar o volume com água (concentração teórica final = $1,0 \times 10^{-3}$ mol/L de α -metildopa).

Procedimento: num tubo de centrifuga, pipetar 2,0 mL da suspensão de fosfato de cobre (II) e 2,0 mL da solução de α -metildopa. Neutralizar amostras quando necessário através da adição de uma gota de fenolftaleína mais hidróxido de sódio até coloração rosa claro. Misturar num agitador Vortex e deixar em repouso por 5 minutos. Centrifugar por 5 minutos à 2000 rpm e transferir 2,0 mL da solução sobrenadante para a célula de medida. Adicionar 20 mL de ácido nítrico 0,1 mol/L, iniciar a agitação e fazer a leitura no potenciômetro após 1 minuto, mergulhando o eletrodo seletivo para cobre (II) com o eletrodo de referência na solução. As leituras devem ser realizadas em célula à $25 \pm 0,2^\circ\text{C}$ com contínua agitação.

b) Método potenciométrico segundo Salem:

Preparo da solução de metavanadato de amônio 0,02 mol/L: transferir cerca de 2,34 g de metavanadato de amônio para um balão volumétrico de 1000 mL, dissolver e completar o volume com água. Padronizar a solução iodometricamente (Vogel, 1979).

Preparo da amostra: pesar e pulverizar alguns comprimidos de α -metildopa. Pesar o equivalente a 1,20 g de α -metildopa para um balão volumétrico de 250

mL, adicionar cerca de 180 mL de ácido acético 0,01 mol/L e agitar em agitador mecânico por 15 minutos. Completar o volume com ácido acético 0,01 mol/L.

Procedimento para titulação potenciométrica: transferir um volume de solução da amostra que contenha cerca de 19 mg de α -metildopa para um bequer de 100 mL, adicionar 15 mL de ácido clorídrico concentrado e diluir até cerca de 50 mL com água. Titular potenciometricamente com solução de metavanadato de amônio 0,02 mol/L até o ponto final com eletrodos de platina e calomelano. Titular um branco sob as mesmas condições.

3.8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS SOBRE A ANÁLISE DE α -METILDOPA

- Abe, I.; Nakamura, K.; Toyonaga, T.; Kobara, Y.; Wasa, T.; **Determination of D,L-amino acids in natural water by gas chromatography with enantiomer labeling**; *Anal. Sci.*, **1993**, Dec., 9, 775.
- Ang, S.G.; Low, S.H.; **Studies on the stereochemical characterization of N-methylated amino-acids**; *Australian J. Chem.*, **1991**, 44, 11, 1591.
- Armstrong, D.W.; Liu, Y.B.; Ekborgott, K.H.; **Covalently bonded teicoplanin chiral stationary-phase for HPLC enantioseparations**; *Chirality*, **1995**, 7, 6, 474.
- Armstrong, D.W.; Tang, Y.B.; Chen, S.S.; Zhou, Y.W.; Bagwill, C.; Chen, J.R.; **Macrocyclic antibiotics as a new class of chiral selectors for liquid-chromatography**; *Anal. Chem.*, **1994**, 66, 9, 1473.
- Athanasoulmalaki, E. M.; Koupparis, M. A.; **Indirect potentiometric determination of alpha-amino-acids with a copper-selective electrode and determination of dopa and methylidopa in pharmaceutical preparations**; *Anal. Chim. Acta*, **1984**, Jul., 161, 349.
- Barakat, M. Z.; El-Wahab, M. F. A.; **Microdetermination of bromine or chlorine in N-halogenated imides**; *Anal. Chem.*, **1954**, n° 12, 26, 1973.
- Berzas, J. J.; Lemus, J. M.; Buitrago, P.; **Stopped-flow spectrophotometric determination of dopamine and methylidopa with sodium hydroxide**; *Anal. Letters*, **1997**, 130, 6, 1109.
- British Pharmacopoeia, vol. II, 1993.
- Chan, K.C.; Muschik, G.M.; Issaq, H.J.; **Enantiomeric separation of amino-acids using micellar electrokinetic chromatography after precolumn derivatization with the chiral reagent 1-(9-fluorenyl)ethyl chloroformate**; *Electrophoresis*, **1995**, 16, 4, 504.
- Chen, Z.D.; Koyama, N.S.M.; Nakao, H.; Nagaoka, T.; **Ligand exchange stripping technique for enantio-concentration and separation of amino acids using a carbon column electrode modified with N-(2-naphthalenesulfonyl)-L-phenylalanine as a chiral selector**; *Electroanalysis*, **1999**, 11, 16, 1169.

- Clarke's isolation and identification of drugs. London: The Pharmaceutical Press, ed. 2, 1986.
- Dolezalova, M.; Tkaczykova, M.; **Direct high-performance liquid chromatographic determination of the enantiomeric purity of levodopa and methyldopa: comparison with pharmacopoeial polarimetric methods;** *J. Pharm. Biomedical Analysis*, **1999**, 19, 3-4, 555.
- European Pharmacopoeia, ed. 4, 2002.
- Farmacopéia Brasileira, ed. 4, parte II, 1996.
- Feigl, F. Spot Tests. Nova York: Elsevier Publishing Company, ed. 4, vol II, 1954.
- Gelber, L. R.; Neumeyer, J. L.; **Determination of the enantiomeric purity of levodopa, methyldopa, carbidopa and tryptophan by use of chiral mobile phase high-performance liquid-chromatography;** *J. Chromatogr.*, **1983**, 257, 2, 317.
- Helaleh, M. I. H.; **Simple kinetic method for the analysis of m-dope in pharmaceutical preparations. Part II;** *J. Pharm. Biomedical Analysis*, **1999**, 20, 921.
- Helaleh, M. I. H.; Jamhour, R. M. A. Q.; Abu-Nameh, E. S. M.; **Kinetic spectrophotometric method for the analysis of methyldopa;** *Anales de Química Int. Ed.*, **1998**, 94, 354.
- Helaleh, M. I. H.; Rahman, N.; Abu-Nameh, E. S. M.; **Use of cerium (IV) nitrate in the spectrophotometric determination of levodopa and methyldopa in the pure form and pharmaceutical preparations;** *Anal. Sci.*, **1997**, Dez., 13, 1007.
- Imai, K.; Matsunaga, H.; Fukushima, T.; Santa, T.; Homma, H.; Nakashima, K.; Akiyama, S.; **A novel method for the amino-acid-sequence configuration determination of peptides containing D/L-amino acids utilizing a fluorogenic edman reagent, 7-N,N-dimethylaminosulphonyl-4-(2,1,3-benzoxadiazolyl) isothiocyanate (DBD-NCS);** *Biomed. Chromatogr.*, **1995**, 9, 3, 152.
- Issopoulou, P. B.; **High-sensitivity spectrophotometric determination of trace amounts of levodopa, carbidopa and alpha-methyldopa;** *Fresenius J. Anal. Chem.*, **1990**, 336 (2), 124.
- Martindale. *The extra pharmacopoeia*, ed. 31, 1996.
- Metwally, M. E.; Belal, F. F.; **Application of high-performance liquid chromatography in the kinetic study of α -methyldopa;** *J. Chromatogr.*, **1992**, 623, 75.
- Milovanovic, G. A.; Sekheta, M. A.; Janjic, T. J.; **A kinetic determination of ultramicro quantities of serotonin, 5-hydroxyindolacetic acid, L-dopa, methyldopa and carbidopa;** *Mikrochimica Acta*, **1981**, 1, 241.
- Naef, R.; Seebach, D.; *Helv. Chim. Acta*, **1985**, 68, 135.
- Nagaralli, B. S.; Seetharamappa, J.; Melwanki, M. B.; Ramesh, K. C.; Keshavayya, J.; **Spectrophotometric investigations of the assay of physiologically active catecholamines in pharmaceutical formulations;** *J. AOAC Intern.*, **2002**, 85, n° 6, 1288.
- Nevado, J. J. B.; Gallego, J. M. L.; Laguna, P. B.; **Spectrophotometric determination of dopamine and methyldopa with metaperiodate by flow injection analysis;** *Fresenius J. Anal. Chem.*, **1995**, 353, 221.

- Official Methods of Analysis of the Association of official Analytical Chemists*, ed. 15, vol. 1, 1990.
- Oliveira, C. H.; Barrientos-Astigarraga, R. E.; Sucupira, M.; Graudenz, G. S.; Muscara, M. N.; De Nucci, G. **Quantification of methyldopa in human plasma by high-performance liquid chromatography electrospray tandem mass spectrometry – Application to a bioequivalence study**; *J. Chromatogr. B*, 2002, March 5, 768 (2), 341.
- Otsuka, M.; Okada, S.; Uchimura, T.; Komagata, K.; **A simple method for the determination of stereoisomers of lactic-acid by HPLC using an enantiomeric resolution column, and its application to identification of lactic-acid bacteria**; *Seibutsu-Kogaku Kaishi-J. Soc. for Fermentation and Bioengineering*, 1994, 72, 2, 81.
- Pathak, V. N.; Shukla, S. R.; Shukla, I. C.; **Direct titrimetric determination of the antihypertensive drugs methyldopa and propranolol in pharmaceutical preparations**; *Analyst*, 1982, 107 (1278), 1086.
- Róna, K.; Ary, K.; Gachalyi, B.; Klebovich, I.; **Determination of alpha-methyldopa in human plasma by validated high-performance liquid chromatography with fluorescence detection**; *J. Chromatogr. A*, 1996, 730, 125.
- Salem, F. B.; **Spectrophotometric and titrimetric determination of catecholamines**; *Talanta*, 1987, n° 9, 34, 810.
- Slates, H. L.; Taub, D.; Kuo, C. H.; Wendler, N. L.; *J. Org. Chem.*, 1964, 29, 1424.
- United States Pharmacopeia XXV, 2002 (USP 25).
- Vieira, I. C.; Fatibelo-Filho, O.; **Spectrophotometric determination of methyldopa and dopamine in pharmaceutical formulations using a crude extract of sweet potato root (*Ipomoea batatas* (L) Lam.) as enzymatic source**; *Talanta*, 1998, 46, 559.
- Vogel, A. I.; *Vogel's textbook of quantitative inorganic analysis*. London: William Clowes Limited, ed. 4, 1979, p. 390.
- Vogel, A. I.; *Química Analítica Quantitativa*. São Paulo: Mestre Jou, ed. 5, 1981, p.406.
- Walash, M. I.; OUF, A. A.; Salem, F. B.; **Colorimetric determination of sympathomimetic amines methyldopa and noradrenaline**; *J. Assoc. off Anal. Chem.*, 1985, 68 (1), 91.
- Watanabe, S.; Kawahara, M.; Miura, K.; Aso, I.; **Separation and control of the elution order of N-t-butyloxycarbonyl amino acids D/L isomers by reversed-phase HPLC using cyclodextrins as chiral selectors for the mobile phase**; *Anal. Sci.*, 2002, 18, 1, 73.

CAPÍTULO III: PARTE EXPERIMENTAL

1. Material

Foram utilizados reagentes de grau analítico, com exceção da α -metildopa que era de grau farmacêutico (pureza de 87,3%). A água usada para a preparação das soluções foi destilada e deionizada em um deionizador Milli Q Plus.

Na preparação das soluções, uma quantidade (massa ou volume) adequada do reagente foi medida e transferida quantitativamente para balão volumétrico. Utilizou-se agitação constante ou ultra-som no processo de dissolução quando necessário.

O padrão de α -metildopa foi secundário e fornecido pela “Prodome Indústria Farmacêutica”. O espectrofotômetro UV-visível utilizado é da marca Ultrospec 2000 (Pharmacia Biotech). Soluções preparadas: HCl 0,001 mol/L; HCl 0,01 mol/L; HCl 0,1 mol/L; FeCl_3 $2,0 \times 10^{-3}$ mol/L dissolvido em cada uma das concentrações de HCl utilizadas; solução de ácido salicílico $8,0 \times 10^{-3}$ mol/L dissolvido em cada uma das concentrações de HCl utilizadas.

2. Procedimento do método proposto para determinação de α -metildopa (Figura 20):

Prepara-se duas soluções contendo, a primeira, FeCl_3 $2,0 \times 10^{-3}$ mol/L e, a segunda, ácido salicílico $8,0 \times 10^{-3}$ mol/L, ambas em HCl 0,01 mol/L. Mistura-se as duas na proporção 1:1 (solução A). Para a curva de calibração, adiciona-se determinadas quantidades de α -metildopa num balão volumétrico de 50 mL, e dissolve-se com a solução A, a fim de obter concentrações entre 0,07 e 0,34 mg/mL. Filtra-se por papel de filtro. Faz-se a curva cinética de $\ln$ da absorbância medida *versus* tempo em minutos para cada adição de α -metildopa. A curva-padrão é realizada graficando o valor absoluto do coeficiente angular obtido de cada adição de α -metildopa (coeficiente de reação) *versus* a raiz quadrada da

quantidade pesada, em mg, de α -metildopa. As leituras de absorbância são feitas em 525 nm em temperatura constante. Neste trabalho usou-se 25,0°C.

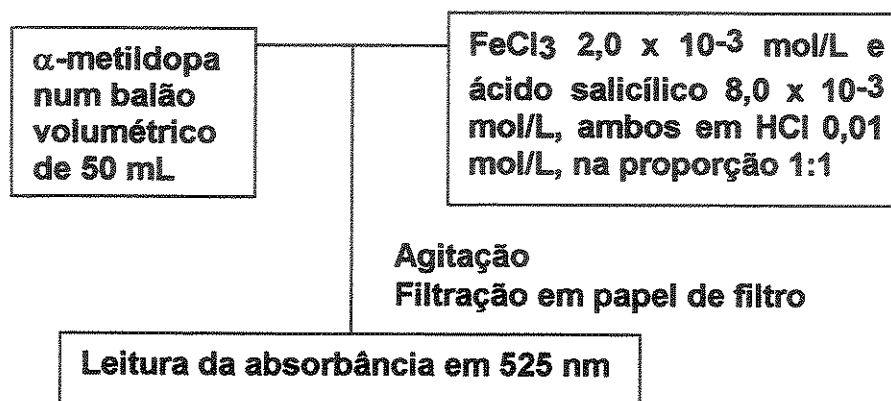


Figura 20. Esquema do procedimento do método proposto para determinação de α -metildopa.

Para as amostras, tritura-se conjuntamente cinco comprimidos de α -metildopa. Pesa-se uma massa de amostra (alíquota) cujo conteúdo seja cerca de 10 mg de α -metildopa, e transfere-se para um balão volumétrico de 50 mL. Adiciona-se cerca de 35 mL de solução A e agita-se o balão por 5 minutos. Completa-se o balão volumétrico com solução A e filtra-se uma porção em papel de filtro quantitativo, a fim de retirar os excipientes. Faz-se as leituras de absorbância em 525 nm em temperatura constante.

3. Método padrão para análise do padrão de α -metildopa

A pureza da α -metildopa pôde ser verificada por um método por titulação colorimétrica segundo a Farmacopéia Brasileira (1996) e USP 25 (2002). Este método consiste em dissolver com aquecimento 200 mg de metildopa em 25 mL de ácido acético glacial, esfriar até temperatura ambiente e adicionar 0,1 mL de solução indicadora de cristal violeta (violeta genciana) mais 50 mL de acetonitrila. Em seguida titula-se com solução volumétrica de ácido perclórico 0,1 mol/L em ácido acético glacial até o aparecimento da coloração azul. Realiza-se um branco

e calcula-se a pureza considerando que cada mL de ácido perclórico 0,1 mol/L corresponde a 21,12 mg de metildopa.

4. Método de referência para análise dos comprimidos de α -metildopa

Solução de tartarato ferroso: transferir 1 g de sulfato ferroso, 2 g de tartarato de sódio e potássio e 0,1 g de bissulfito de sódio para um balão volumétrico de 100 mL, dissolver e completar o volume com água. Preparar no momento do uso.

Solução tampão: transferir 50 g de acetato de amônio para um balão volumétrico de 1000 mL, dissolver e completar o volume com etanol a 20% (v/v). Ajustar o pH em 8,5 com hidróxido de amônio 6 mol/L.

Preparo do padrão: preparar uma solução de padrão de α -metildopa em ácido sulfúrico 0,05 mol/L de modo a obter uma concentração de 1mg/mL. Pipetar 5 mL da solução para um balão volumétrico de 100 mL, adicionar 5 mL de solução de tartarato ferroso e completar o volume com solução tampão.

Preparo da amostra: pesar e pulverizar alguns comprimidos de α -metildopa. Pesar o equivalente a 100 mg de α -metildopa para um balão volumétrico de 100 mL, adicionar cerca de 70 mL de ácido sulfúrico 0,05 mol/L, agitar mecanicamente por 15 minutos e completar o volume com ácido sulfúrico 0,05 mol/L. Pipetar 5 mL da solução para um balão volumétrico de 100 mL, adicionar 5 mL de solução de tartarato ferroso e completar o volume com solução tampão. Filtrar a solução final em papel de filtro quantitativo (concentração teórica final = 0,05 mg/mL de α -metildopa).

Preparo do branco: pipetar 5 mL de ácido sulfúrico 0,05 mol/L para um balão volumétrico de 100 mL, adicionar 5 mL de solução de tartarato ferroso e completar o volume com solução tampão.

Procedimento: determinar as absorbâncias das soluções padrão e amostra, em cubeta de 1 cm, no comprimento de onda máximo, em torno de 520 nm, utilizando o branco na cubeta de referência.

CAPÍTULO IV – RESULTADOS E DISCUSSÃO

1. Estudo do comprimento de onda a ser utilizado no método proposto

A partir da varredura espectral, conforme a Figura 21, observou-se absorção máxima em 525 nm.

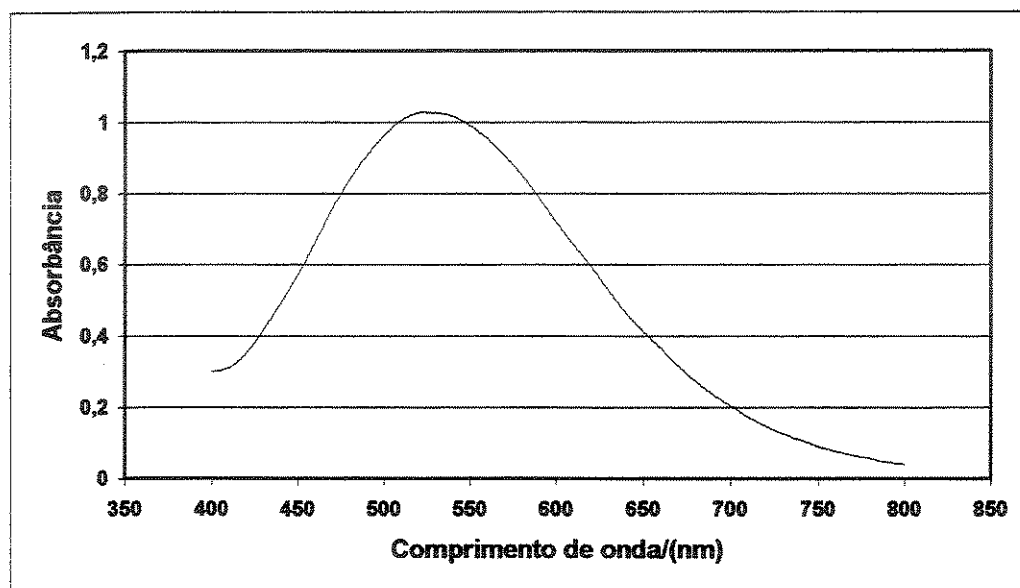


Figura 21. Varredura espectral com adição de 10 mg de α -metildopa após 10 minutos de reação utilizando HCl 0,01 mol/L à 25°C indicando absorção máxima em 525 nm

2. Curva-padrão segundo o método proposto

Segundo a Figura 22, observa-se boa correlação nas concentrações entre 0,07 e 0,34 mg/mL de α -metildopa.

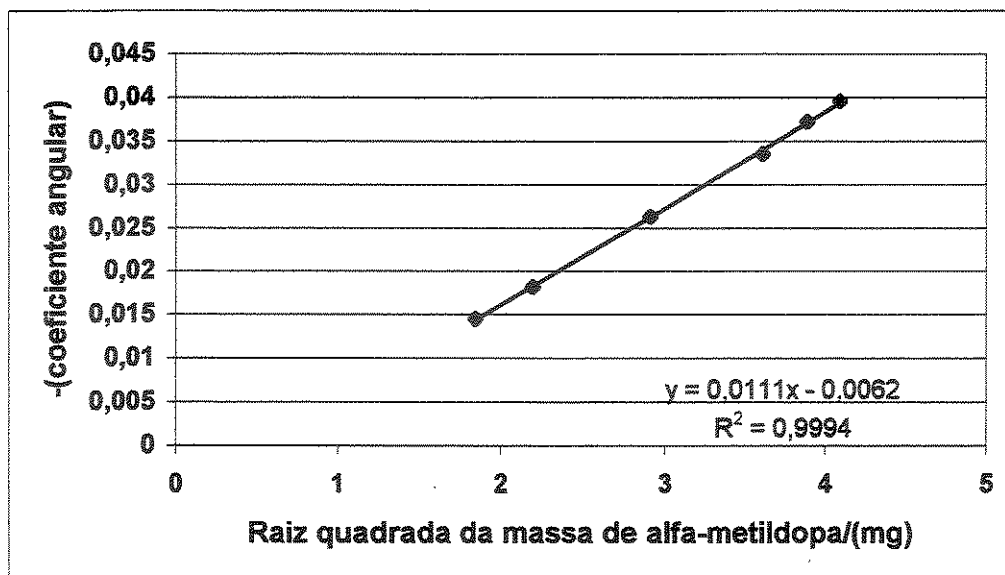


Figura 22. Curva-padrão segundo o método proposto

A Figura 23 mostra a evolução da reação em função do tempo, e fornece os coeficientes angulares correspondentes, respectivamente, à adição de 4,83 mg e 15,11 mg de α -metildopa para a construção da curva-padrão.

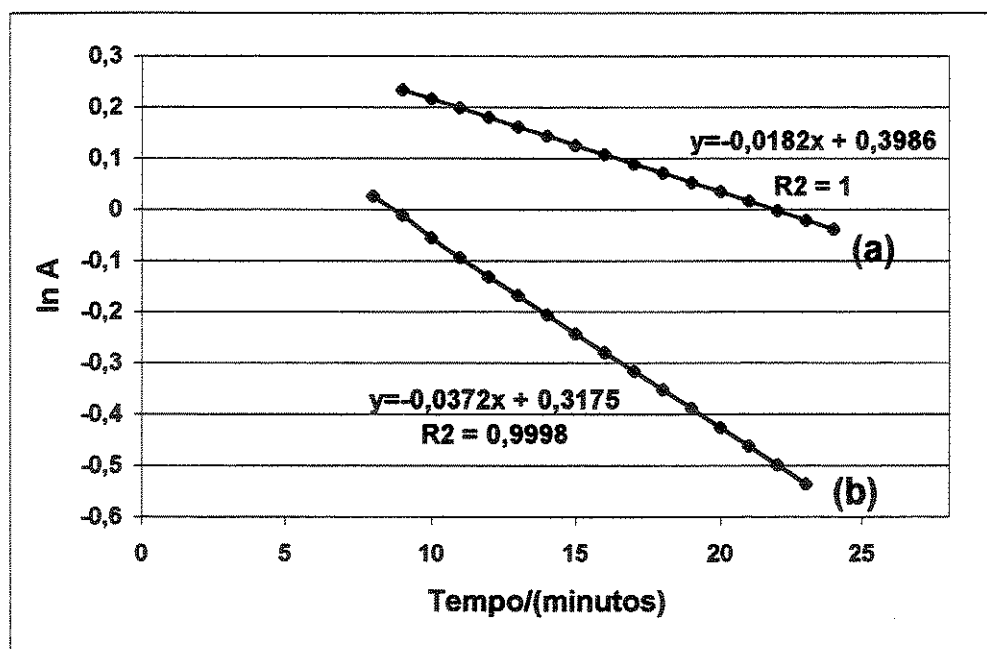


Figura 23. Variação do logaritmo da absorbância ($\ln A$) versus o tempo de reação. Adição de 4,83 mg de α -metildopa (a). Adição de 15,11 mg de α -metildopa (b).

3. Estudo da influência da concentração de HCl

O efeito da concentração de ácido clorídrico foi estudado as concentrações 0,001, 0,01 e 0,1 mol/L. A Tabela 4 mostra as constantes de reação de pseudo-primeira ordem para as diferentes massas de α -metildopa utilizadas no experimento. De acordo com a Figura 24, a reação depende da concentração de HCl, visto que na concentração de 0,001 mol/L a reação se torna mais lenta.

É interessante observar que entre as concentrações 0,1 e 0,01 mol/L há diferenças nas constantes de reação para uma mesma concentração de α -metildopa, isto é, observa-se um decréscimo de k com o aumento da concentração de HCl. No entanto, os coeficientes angulares dos gráficos $k \times$ tempo são essencialmente os mesmos. Em concentração mais baixa de HCl, porém, o coeficiente angular de $k \times$ tempo é bem diferente dos demais. Isto deve estar indicando diferentes mecanismos de reação.

TABELA 4. ESTUDO DA CONCENTRAÇÃO DE HCL UTILIZADO NO MÉTODO PROPOSTO PARA DETERMINAÇÃO DE α -METILDOPA EM COMPRIMIDOS

Quantidade de α -metildopa/mg	HCl 0,1 mol L ⁻¹ 25°C		HCl 0,01 mol L ⁻¹ 25°C		HCl 0,001 mol L ⁻¹ 25°C	
	$k^*/10^{-3}$ min ⁻¹	mg**	$k^*/10^{-3}$ min ⁻¹	mg**	$k^*/10^{-3}$ min ⁻¹	mg**
2	6,95	2,04	9,20	1,95	6,30	2,04
5	13,30	4,78	16,75	5,24	11,10	5,14
8	19,88	7,88	23,57	8,47	12,20	8,15
12	27,26	12,31	30,09	12,05	15,30	12,67
15	32,15	15,15	33,55	15,02	15,10	15,06
18	34,22	17,98	37,56	18,24	16,40	18,16
Coefficiente angular do gráfico $k \times$ raiz quadrada de mg de α -metildopa	0,01007		0,01005		0,00343	

*Constante de reação de pseudo-primeira ordem.

** massa de α -metildopa, em mg, utilizada no experimento.

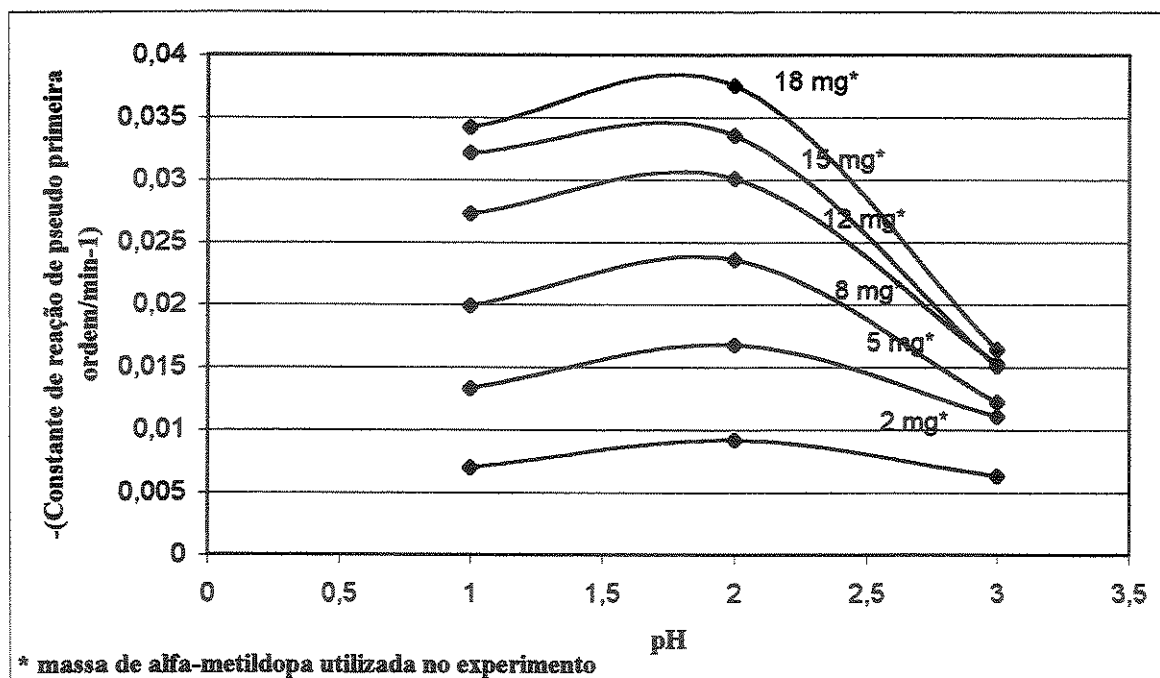


Figura 24. Gráfico do estudo da concentração de HCl utilizado no método proposto para determinação de α -metildopa em comprimidos

4. Estudo da influência da temperatura.

As temperaturas estudadas foram 298, 308 e 318 K para adições de cerca de 5, 8, 12 e 15 mg de α -metildopa. O gráfico de $\ln k$ versus $1/T$ resulta numa linha reta (Figura 26), cuja energia de ativação, calculada de acordo com a equação de Arrhenius, é de 84 kJmol^{-1} .

A Tabela 5 e a Figura 25 ilustram a influência da temperatura sobre a velocidade de reação na presença de α -metildopa.

TABELA 5. ESTUDO DA TEMPERATURA UTILIZADA NO MÉTODO PROPOSTO PARA DETERMINAÇÃO DE α -METILDOPA EM COMPRIMIDOS

Quantidade de α -metildopa/mg	HCl 0,01 mol/L 25°C		HCl 0,01 mol/L 35°C		HCl 0,01 mol/L 45°C	
	$k^*/10^{-3}$ min^{-1}	mg**	$k^*/10^{-3}$ min^{-1}	mg**	$k^*/10^{-3}$ min^{-1}	mg**
2	9,20	1,95	25,06	1,95	89,87	2,04
5	16,75	5,24	51,16	4,87	145,41	4,78
8	23,57	8,47	68,89	8,15	186,39	8,33
12	30,09	12,05	84,55	12,32	256,77	12,32
15	33,55	15,02	95,04	14,97	262,36	14,62
18	37,56	18,24	102,53	18,25	283,31	18,07
Coefficiente angular do gráfico $k \times$ raiz quadrada de mg de α -metildopa	0,01005		0,02692		0,06965	

*Constante de reação de pseudo-primeira ordem.

** massa de α -metildopa, em mg, utilizada no experimento.

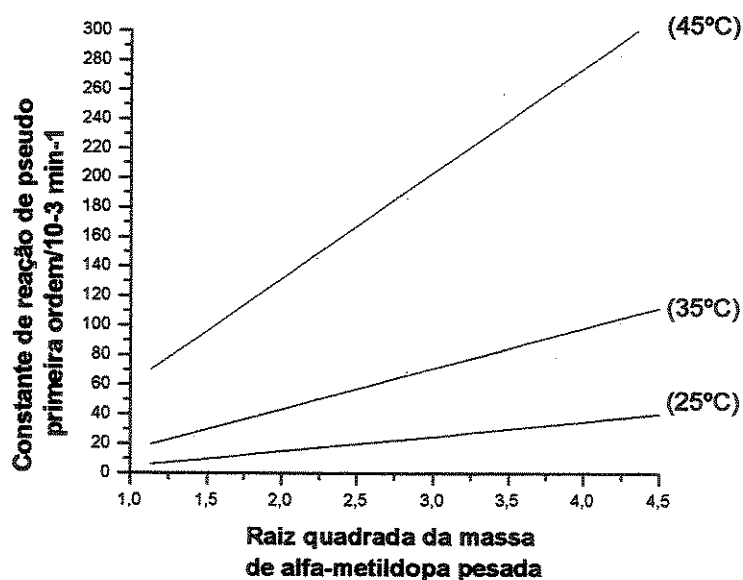


Figura 25. Gráfico do estudo da temperatura utilizada no método proposto para determinação de α -metildopa em comprimidos

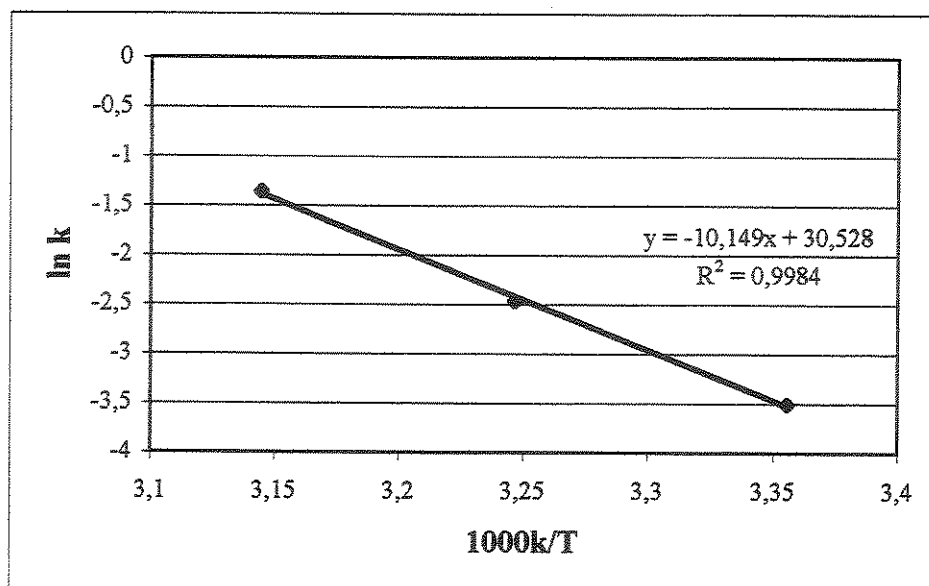


Figura 26. *ln k versus 1/T para massa de α -metildopa em torno de 12 mg*

5. Verificação da pureza do padrão secundário de α -metildopa utilizado

Para o desenvolvimento do estudo do método titulométrico padrão preparou-se ácido perclórico 8,91 mg mL⁻¹ (0,0887 mol L⁻¹).

Os resultados estão na Tabela 6.

TABELA 6. RESULTADOS DA ANÁLISE DO PADRÃO DE α -METILDOPA

AMOSTRAS	RESULTADO (%)
1	87,9
2	86,8
3	87,3
4	87,5
5	87,2
MÉDIA	87,3
DPR	0,5

6. Aplicação do método cinético proposto

O método proposto foi aplicado nos comprimidos de α -metildopa. Os resultados obtidos foram estatisticamente comparados com aqueles obtidos com o método de referência. A Figura 27 mostra a absorção máxima em 520 nm, de acordo com a leitura da absorbância indicada na literatura. Os resultados das análises estão na Tabela 7.

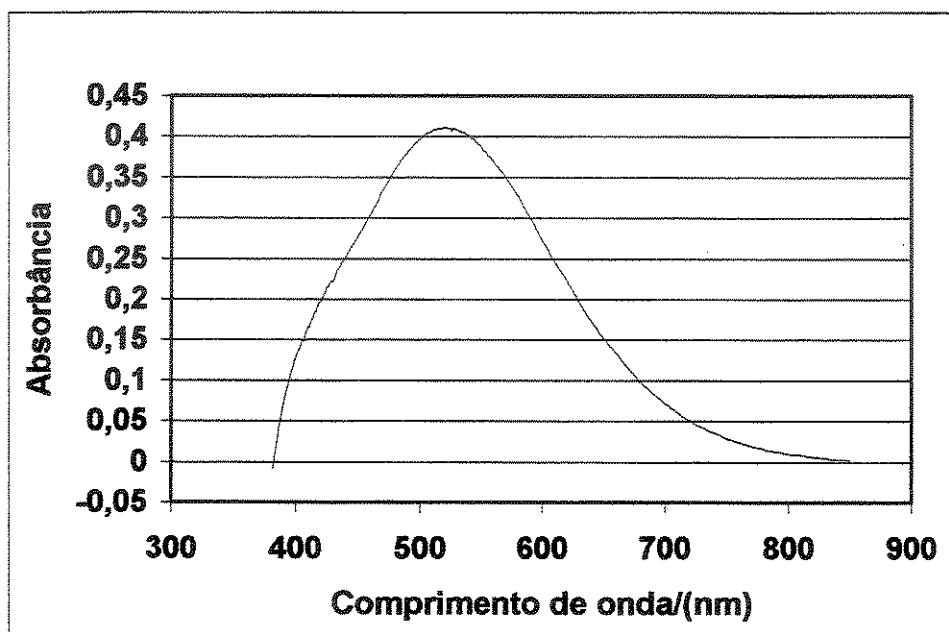


Figura 27. Varredura espectral do padrão de α -metildopa segundo o método de referência, indicando absorção máxima em 520 nm.

TABELA 7. RESULTADOS OBTIDOS NA DETERMINAÇÃO DE α -METILDOPA EM COMPRIMIDOS PELO MÉTODO PROPOSTO E COMPARADO COM O MÉTODO DE REFERÊNCIA

AMOSTRA	MÉTODO PROPOSTO			MÉTODO DE REFERÊNCIA			<i>t</i>	<i>F</i>
	Resultados/ mg	DP	DPR %	Resultados/ mg	DP	DPR %		
Medley Metildopa 500 mg	497,0	5,5	1,1	492,4	3,9	0,8	1,36	1,99
Varmet Metildopa 500 mg	489,7	3,9	0,8	495,7	3,5	0,7	2,31	1,24
Furp Metildopa 250 mg	253,2	1,4	0,5	253,3	0,8	0,3	0,92	3,06
Aldomet Metildopa 250 mg	251,3	1,8	0,7	252,0	2,1	0,8	1,3	0,73

Obs.: os resultados representam a média de cinco determinações.

Valores teóricos de *t* e *F* com 95% de confiança: respectivamente 2,31 e 6,39.

CAPÍTULO V – CONCLUSÕES

A maior vantagem do método desenvolvido neste trabalho é a simplicidade operacional associada ao baixo custo. Comprimidos de α -metildopa podem ser analisados obtendo resultados confiáveis, já que o método proposto foi comparado com método de referência apresentando resultados concordantes. Portanto, pode ser recomendado para análise de α -metildopa em preparações farmacêuticas.

O mecanismo de ação de α -metildopa no organismo humano até hoje não está comprovado, apesar dos vários estudos sobre este assunto. Com certeza, a idéia inicialmente propagada de que α -metildopa age como inibidor da enzima dopadescarboxilase, está descartada, permanecendo aquela de que α -metildopa sofre descarboxilação dentro do sistema nervoso central, forma α -metildopamina, e conseqüentemente α -metilnoradrenalina, que age substituindo noradrenalina nos locais de ação.

Sobre a síntese de α -metildopa, há várias opções para a obtenção do isômero ativo que é (S)-(-)- α -metildopa. A mais recente publicada, a síntese segundo Léon-Romo *et al.* é bastante interessante visto que é menos demorada e os isômeros de α -metildopa são produzidos separadamente não necessitando de processos de resolução.

CAPÍTULO VI – PERSPECTIVAS

As perspectivas do trabalho nos conduzem, de antemão, ao estudo de outros princípios farmacêuticos, tanto no aspecto de síntese como de análise, da mesma forma como feito na presente dissertação. Tal tipo de trabalho pode, por um lado, fornecer informações bibliográficas condensadas sobre o assunto, favorecendo a comunidade química e farmacêutica. Por outro lado, o desenvolvimento de métodos analíticos simples, confiáveis e de baixo custo apresenta interesse tanto para uso em controle de qualidade industrial como para aplicações na fiscalização por parte do estado.