



Universidade Federal de Mato Grosso do Sul
Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Alimentos e Nutrição
FACFAN



Larissa Corrêa dos Santos Felix do Amaral

DESAFIOS ESTRUTURAIS NO MINOXIDIL: TAUTOMERISMO IMINA-ENAMINA

Campo Grande – MS

2026



Universidade Federal de Mato Grosso do Sul
Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Alimentos e Nutrição
FACFAN



Larissa Corrêa dos Santos Felix do Amaral

DESAFIOS ESTRUTURAIS NO MINOXIDIL: TAUTOMERISMO IMINA-ENAMINA

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Farmácia da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, como requisito parcial para a obtenção do grau de Bacharel em Farmácia.

Orientadora: Prof.^a Dra. Glaucia Braz Alcantara

Campo Grande – MS

2026

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, por ter me sustentado durante toda esta caminhada, iluminando meus passos no caminho desafiador que vem sendo o período de graduação.

À minha orientadora, Profa. Dra. Glauca Alcantara, pela orientação, confiança, acolhimento, amizade e por todo o conhecimento compartilhado.

À minha coorientadora, Dra. Luciana Ravaglia, pela amizade, disponibilidade, atenção, contribuições e auxílio essencial durante a realização desta pesquisa.

Aos coautores do trabalho, Dr. Thiago Lopes e Dr. Clemens Anklin, pela parceria e contribuição para a elaboração deste trabalho.

Aos colegas do laboratório BioSpectra, pela amizade, convivência, colaboração, apoio e por todos os momentos de aprendizado compartilhados ao longo desta trajetória.

Aos meus colegas do curso de Farmácia, pela amizade construída ao longo da graduação, pelo companheirismo nos momentos de alegria e pelo apoio nos períodos de dificuldade.

À minha família, por todo amor, incentivo e suporte durante minha formação. Agradeço por acreditarem em mim, por me apoiarem nos momentos difíceis e por estarem sempre presentes ao longo desta caminhada.

Ao meu noivo, Gabriel Aguiar, por todo amor, paciência, companheirismo e incentivo. Obrigada por estar ao meu lado em todos os momentos, por me apoiar nos dias mais difíceis e por caminhar comigo com tanto carinho durante esta etapa tão importante.

Agradeço também aos órgãos de fomento UFMS, CNPq, CAPES, Fundect, FINEP e Polícia Federal, que tornaram esse projeto possível.

A todos que, de alguma forma, contribuíram para a realização deste trabalho, deixo minha sincera gratidão.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	10
2. REVISÃO DA LITERATURA	12
3. OBJETIVOS	16
3.1 Objetivo Geral	16
3.2 Objetivos Específicos	17
4. MATERIAIS E MÉTODOS	17
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	19
6. CONCLUSÃO	31
7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	32
8. ANEXO A	36

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Teste de solubilidade do minoxidil base e sulfato.	19
Tabela 2 – Assinalamento da molécula de minoxidil base, em solução de metanol tetradeuterado, a partir dos experimentos de RMN de ^1H , ^{13}C e bidimensionais (11,75T).	21
Tabela 3 – Assinalamento da molécula de minoxidil sulfato, em solução de metanol tetradeuterado, a partir dos experimentos de RMN de ^1H , ^{13}C e bidimensionais (11,75T).	21

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Representação esquemática dos equilíbrios tautoméricos descritos pelos estudos de Arnone et al. (1993) (1), Semenov et al. (2015) (2), Bahadoor et al. (2022) (3) e Nanubolu et al. (2014) (4), citados.	14
Figura 2 – Representação das moléculas de minoxidil base (a) e minoxidil sulfato (b), com numeração destacada em vermelho.	15
Figura 3 – Representação da molécula de minoxidil base (a) e sulfato (b), com os deslocamentos químicos (δ) dos sinais de RMN de ^1H e ^{13}C (entre parênteses) descritos em azul, além da numeração da molécula em vermelho.	20
Figura 4 – Espectro de RMN de ^1H (500 MHz, $\text{CD}_3\text{OD-d}_4$), com as integrais dos sinais dos hidrogênios 3', 4' e 5 da molécula de minoxidil base, evidenciados em vermelho, obtido a 5 °C, imediatamente após o preparo da amostra.	23
Figura 5 – Espectro de RMN de ^1H (500 MHz, $\text{CD}_3\text{OD-d}_4$), com as integrais dos sinais dos hidrogênios 3', 4' e 5 da molécula de minoxidil base, evidenciados em vermelho, obtido a 5 °C, aproximadamente 2 dias após a preparação da amostra.	23
Figura 6 – Espectro de RMN de ^1H (500 MHz, $\text{CD}_3\text{OD-d}_4$), obtido a 25 °C, imediatamente após o preparo da amostra com as integrais dos sinais dos hidrogênios 3', 4' e 5 da molécula de minoxidil, evidenciados em vermelho.	24
Figura 7 – Espectro de RMN de ^1H (500 MHz, $\text{CD}_3\text{OD-d}_4$), obtido a 25 °C, aproximadamente 2 dias após a preparação da amostra, com as integrais dos sinais dos hidrogênios 3', 4' e 5 da molécula de minoxidil base, evidenciadas em vermelho.	25
Figura 8 – Espectros comparativos de RMN de ^{13}C (125 MHz, $\text{CD}_3\text{OD-d}_4$), sendo (a) obtidos a 5 °C, e (b) a 25 °C, realizados ao longo de, aproximadamente, 59 h, cujo surgimento progressivo do tripleto δ 72,7, correspondente ao carbono aromático ligado ao deutério, é observado em função do tempo decorrido de preparo da amostra.	26
Figura 9 – Espectro de RMN de ^1H (500 MHz, DMSO-d_6), obtido a 25 °C, imediatamente após a preparação da amostra, com as integrais dos sinais dos hidrogênios 3', 4' e 5 da molécula de minoxidil evidenciadas em vermelho.	27
Figura 10 – Espectro de RMN de ^1H (500 MHz, DMSO-d_6), obtido a 25 °C, aproximadamente, 2 dias após a preparação da amostra, com as integrais dos sinais dos hidrogênios 3', 4' e 5 da molécula de minoxidil evidenciadas em vermelho.	28

Figura 11 – Espectros comparativos de RMN de ^{13}C (125 MHz, DMSO- d_6) a 25 °C, relativos ao sinal do carbono aromático C-5, sendo (a) obtido imediatamente após a preparação da amostra, e (b) realizado após, aproximadamente, 2 dias.	29
Figura 12 – Equilíbrio tautomérico previsto para a molécula de minoxidil com <i>exchange</i> H/D, devido à presença de solvente prótico deuterado.	31

RESUMO

O minoxidil é um fármaco vasodilatador amplamente utilizado no tratamento da queda capilar, cuja estrutura química em solução ainda apresenta aspectos pouco explorados, com possível impacto na interpretação espectral e na quantificação do ativo em formulações farmacêuticas. Este trabalho teve como objetivo investigar características estruturais do minoxidil em solução por meio da espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) de ^1H e ^{13}C . Inicialmente, foram realizados testes de solubilidade em diferentes solventes, sendo o metanol tetradeuterado ($\text{CD}_3\text{OD-d}_4$) o meio que apresentou melhor desempenho para a análise. Nos experimentos conduzidos em $\text{CD}_3\text{OD-d}_4$, observou-se redução seletiva da integral do hidrogênio aromático ao longo do tempo, com maior intensidade a $25\text{ }^\circ\text{C}$ do que a $5\text{ }^\circ\text{C}$, além do surgimento progressivo de um tripleto nos espectros de RMN de ^{13}C , compatível com o acoplamento C-D. Em contraste, nos experimentos realizados em dimetilsulfóxido hexadeuterado (DMSO-d_6), a proporção entre as integrais dos sinais de RMN de ^1H permaneceu estável durante aproximadamente 59 h, e os espectros de RMN de ^{13}C não apresentaram o surgimento do tripleto nem outras alterações relevantes. Em conjunto, os resultados indicam que o comportamento do minoxidil em solução é fortemente dependente do solvente e da temperatura, sendo compatíveis com a ocorrência de tautomerismo imina-enamina e *exchange* H/D em solvente prótico deuterado, fornecendo subsídios para interpretações estruturais mais consistentes e para o desenvolvimento de metodologias analíticas aplicadas ao controle de qualidade e à quantificação desse fármaco.

Palavras-chave: Minoxidil; RMN; tautomerismo.

ABSTRACT

Minoxidil is a vasodilator drug widely used in the treatment of hair loss, whose chemical structure in solution still presents poorly explored aspects, with possible impact on spectral interpretation and on the quantification of the active compound in pharmaceutical formulations. This study aimed to investigate structural characteristics of minoxidil in solution by means of ^1H and ^{13}C Nuclear Magnetic Resonance (NMR) spectroscopy. Initially, solubility tests were performed in different solvents, with tetradeuterated methanol ($\text{CD}_3\text{OD-d}_4$) being the medium that showed the best performance for the analysis. In the experiments conducted in $\text{CD}_3\text{OD-d}_4$, a selective reduction in the integral of the aromatic hydrogen was observed over time, with greater intensity at 25 °C than at 5 °C; Additionally, the progressive emergence of a triplet in the ^{13}C NMR spectra, compatible with C-D coupling was observed. In contrast, in the experiments performed in hexadeuterated dimethyl sulfoxide (DMSO-d_6), the proportion between the integrals of the ^1H NMR signals remained stable for approximately 59 h, and the ^{13}C NMR spectra did not show the emergence of the triplet or other relevant changes. Taken together, the results indicate that the behavior of minoxidil in solution is strongly dependent on the solvent and temperature, being compatible with the occurrence of imine-enamine tautomerism and H/D exchange in a deuterated protic solvent, providing support for more consistent structural interpretations and for the development of analytical methodologies applied to quality control and quantification of this drug.

Keywords: Minoxidil; NMR; tautomerism.

1. Introdução

Minoxidil, cuja nomenclatura química é 2,4-diamino-6-piperidin-pirimidina-3-N-óxido (Eisavi *et al.*, 2019), é um fármaco vasodilatador inicialmente desenvolvido para o tratamento de hipertensão e que ganhou destaque após a observação da hipertricose como efeito adverso, o que motivou sua adoção como alternativa terapêutica para a queda de cabelo (Frydrych; Jurowski, 2024). Quanto ao mecanismo de ação, Bertoli *et al.* (2020, p. 3) descrevem que se trata de um “agente vasodilatador por estimular a abertura de canais de potássio, prolongando a fase anágena e estimulando a angiogênese ao redor do folículo piloso”. Atualmente, o minoxidil figura entre os medicamentos tópicos mais empregados no combate à calvície, em função da sua eficácia na promoção de regeneração capilar (Tamashunas; Bergfeld, 2021). Entre seus análogos estruturais, destaca-se o kopexil (2,4-diaminopirimidina-3-N-óxido), que se difere do minoxidil pela ausência do anel piperidina ligado ao C-6 e também vem sendo utilizado no tratamento da queda capilar (Mfuh; Larionov, 2015).

O fortalecimento de mecanismos regulatórios e de controle de qualidade de produtos, é imprescindível, sobretudo no cenário de itens não regulamentados ou potencialmente adulterados. Conforme destacam Nogueira e Vecina Neto (2011, p. 118), “a falsificação de medicamentos representa um grave problema de saúde pública, podendo levar à ineficácia terapêutica, resistência a antibióticos, intoxicações, agravamento da doença e, em casos extremos, à morte”. Além disso, estudos indicam que a adoção rigorosa de práticas de controle de qualidade não apenas garante a integridade do produto, como também adiciona valor científico ao processo produtivo, gerando confiança tanto para consumidores quanto para as autoridades reguladoras (Nascimento; Santos; Quintilio, 2022).

Para essa finalidade, podem ser empregadas diferentes abordagens analíticas, incluindo métodos cromatográficos, como Cromatografia Líquida de Alta Eficiência e Cromatografia Gasosa, técnicas espectroscópicas, como UV-vis e infravermelho, espectrometria de massas e ensaios físico-químicos voltados à avaliação de características como pH, solubilidade, aspecto e estabilidade. Nesse contexto, a Ressonância Magnética Nuclear (RMN) destaca-se como técnica central para a investigação estrutural de fármacos em solução, pois permite avaliar deslocamentos químicos, integrais, acoplamentos e alterações espectrais associadas ao ambiente molecular.

Em espectroscopia de RMN de ^1H , a integração é amplamente utilizada porque, em princípio, a área de uma ressonância é proporcional ao número relativo de núcleos que a originam, permitindo estimar a contagem relativa de ^1H em uma mesma molécula a partir das razões entre as integrais (Claridge, 2009). Além disso, técnicas complementares de RMN, como os experimentos bidimensionais, também podem contribuir para o entendimento estrutural da molécula, que podem (ou não) impactar na proporção relativa dos sinais a partir das integrais.

A investigação das formas tautoméricas de uma molécula mostra-se fundamental, como evidenciado por Claramunt *et al.* (2006, p. 170), ao mencionar o “fracasso de Pauling em chegar antes de Crick e Watson à estrutura do DNA devido ao uso de tautômeros incorretos das bases”. Tal episódio ressalta como a compreensão inadequada do tautomerismo pode interferir diretamente na análise e quantificação de compostos em produtos farmacêuticos, comprometendo a precisão de métodos analíticos, como a RMN, e, conseqüentemente, a confiabilidade dos resultados obtidos.

O tautomerismo imina-enamina consiste em um equilíbrio entre uma forma imina (com ligação dupla $\text{C}=\text{N}$) e uma forma enamina (uma amina insaturada com dupla ligação $\text{C}=\text{C}$ ligada ao nitrogênio), semelhante ao clássico tautomerismo ceto-enólico (Arteche *et al.*, 2020).

Por outro lado, a solubilidade do minoxidil é um ponto limitante tanto para formulação quanto para análise, uma vez que o fármaco apresenta baixa solubilidade em água e comportamento fortemente dependente do meio (Yan *et al.*, 2011; Pirhayati *et al.*, 2019). Na prática, essa dependência do solvente pode impactar a reprodutibilidade em métodos analíticos que dependem de solução homogênea (Claridge, 2009, p. 59). Diante desse comportamento, os testes de solubilidade tornam-se etapa indispensável ao controle analítico, pois permitem identificar o solvente ou sistema cossolvente mais adequado para garantir dissolução completa do analito e reprodutibilidade dos métodos.

Em função da relevância do minoxidil, amostras de medicamentos rotulados como minoxidil a 5%, porém sem os registros necessários de controle de qualidade ou a devida autorização da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), apreendidas pela Polícia Federal, foram recebidas pelo nosso laboratório (Laboratório de Bioensaios e RMN Aplicada) BioSpectra- INQUI/UFMS com o objetivo de realizar a identificação e quantificação do minoxidil por espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (RMN). No entanto, os desafios

encontrados na elucidação estrutural apontaram para a necessidade de uma investigação mais aprofundada a respeito da estrutura química dessa molécula.

A investigação aprofundada das características estruturais deste fármaco, além de envolver avanços na compreensão do tautomerismo para esta molécula, ainda não descrito na literatura, até o momento, será de grande valia para estudos futuros relacionados à quantificação deste princípio ativo por RMN em formulações farmacêuticas. A hipótese deste estudo é que o minoxidil apresenta equilíbrio imina-enamina detectável por RMN em solventes próticos, associado à troca H/D dependente da temperatura.

2. Revisão de Literatura

Na técnica DOSY, a atenuação da intensidade dos sinais sob diferentes gradientes de campo permite estimar coeficientes de difusão. No experimento de DOSY, os sinais são organizados em uma representação bidimensional, com uma dimensão correspondente ao deslocamento químico e outra ao coeficiente de difusão (Claridge, 2009). Dessa forma, os sinais pertencentes a uma mesma molécula tendem a aparecer em uma mesma faixa de difusão, o que torna o DOSY uma técnica útil para a análise de misturas contendo espécies químicas de diferentes tamanhos.

Em formulações contendo D-cicloserina, Makuc *et al.* (2020) demonstraram que o experimento DOSY (*Diffusion Ordered Spectroscopy*) permitiu separar sinais da substância ativa, de seu dímero e de produtos de degradação, inclusive possibilitando a identificação e quantificação do dímero de cicloserina, o que não foi adequadamente alcançado pelo método farmacopéico por HPLC-UV. Este resultado ressalta que o experimento DOSY pode atuar como uma estratégia eficiente quando há necessidade de verificar se os sinais observados pertencem ao composto principal ou se resultam da presença de componentes adicionais, impurezas ou produtos de degradação.

Por outro lado, o fenômeno do tautomerismo tem sido abordado em diversos trabalhos, dada sua relevância na Química, especialmente em compostos nitrogenados, e seus impactos na interpretação estrutural das moléculas.

Um exemplo experimental concreto do uso de espectros de RMN de ^1H e ^{13}C na detecção de tautomerismo é dado por Arnone *et al.* (1993). Neste estudo, os autores investigaram o tautomerismo ceto-enólico em compostos perilenodionas naturais por meio de espectros de RMN de ^1H e ^{13}C , no qual observaram que duas formas tautoméricas coexistiam em equilíbrio rápido nas soluções testadas, e cada tautômero apresentou sinais distintos nos espectros de RMN de ^1H e ^{13}C , o equilíbrio tautomérico proposto foi representado na figura 1 (1). Por exemplo, foi possível reconhecer e quantificar as duas formas a partir de sinais separados de hidrogênios do grupo OH e dos carbonos adjacentes, bem como através de constantes de acoplamento específicas entre o hidrogênio da hidroxila e o carbono ligado a ele, evidenciando diretamente a presença de ambas as estruturas tautoméricas em equilíbrio. Esses resultados experimentais, encontrados por Arnone *et al.* (1993) confirmam que a RMN de ^1H e ^{13}C é capaz de detectar tautômeros em solução, quando os núcleos apresentam deslocamentos químicos sensíveis às variações estruturais e eletrônicas de cada forma molecular.

Semenov *et al.* (2015) investigaram por espectroscopia de RMN de ^{15}N e cálculos DFT um sistema 1,4-diazepínico fluorado e constataram que, em solução, o equilíbrio, destacado pela figura 1 (2), encontra-se quase completamente deslocado para o tautômero imino, em ambos os solventes, baseado nos dados dos espectros de RMN de ^1H e ^{13}C obtidos pelos autores. Este resultado é coerente com previsões teóricas de deslocamentos químicos e energias de formação para as moléculas deste estudo. Em solução, a constante dielétrica do solvente pode deslocar o equilíbrio, motivo pelo qual a aquisição em solventes distintos, por exemplo, CDCl_3 e DMSO-d_6 , utilizados no estudo, é informativa (Semenov *et al.*, 2015).

Em compostos heterocíclicos aromáticos, a situação é fortemente influenciada pela conjugação eletrônica. Nanubolu *et al.* (2014) conduziram um extenso levantamento de estruturas cristalinas contendo subunidades imidazólicas/imidazolidínicas capazes de tautomerismo amino/imino, incluindo o fármaco moxonidina, para avaliar padrões estruturais que favorecem uma forma ou outra. A análise, pelo autor, de 180 estruturas disponíveis no *Cambridge Structural Database* revelou a tendência de quando a dupla ligação conjugada pode se estender pelo anel heterocíclico (isto é, em direção ao nitrogênio endocíclico), a forma amino é fortemente estabilizada, sendo observada em cerca de 98% dos casos; inversamente, quando a conjugação ocorre principalmente em direção ao nitrogênio exocíclico, a forma imino torna-se preferencial,

surgindo em cerca de 93% das estruturas analisadas, assim como representado esquematicamente na figura 1 (4). Esses achados evidenciam que a aromaticidade e a deslocalização eletrônica desempenham papel importante no equilíbrio tautomérico.

Complementarmente, Puszko *et al.* (2013) investigaram N-óxidos de piridina substituídos e mostraram que os deslocamentos químicos de ^{15}N são altamente específicos tanto para o efeito de substituintes quanto para a detecção de balanços tautômeros, evidenciando como variações estruturais influenciam diretamente o ambiente eletrônico dos núcleos de nitrogênio.

De modo similar, Bahadoor *et al.* (2022) investigaram o tautomerismo e a isomerização conformacional do 4-deoxynivalenol (DON) por RMN quantitativa, o equilíbrio tautomérico proposto pelos autores está representado na figura 1 (3), além disso, observaram que a extensão e o tipo desses processos variam conforme o solvente empregado, produzindo diferentes padrões de sinais nos espectros. Os autores relatam que um mesmo hidrogênio pode originar múltiplos sinais, dependendo do isômero ou tautômero ao qual pertence, e que a identificação incompleta desses sinais pode levar à subestimação da integral em análises por qNMR. Da mesma forma, Laurella *et al.* (2017) ressaltam que um dos fatores que podem influenciar a estabilização ou desestabilização dos tautômeros é a temperatura, assim como a presença de substituintes, solventes e interações químicas no sistema.

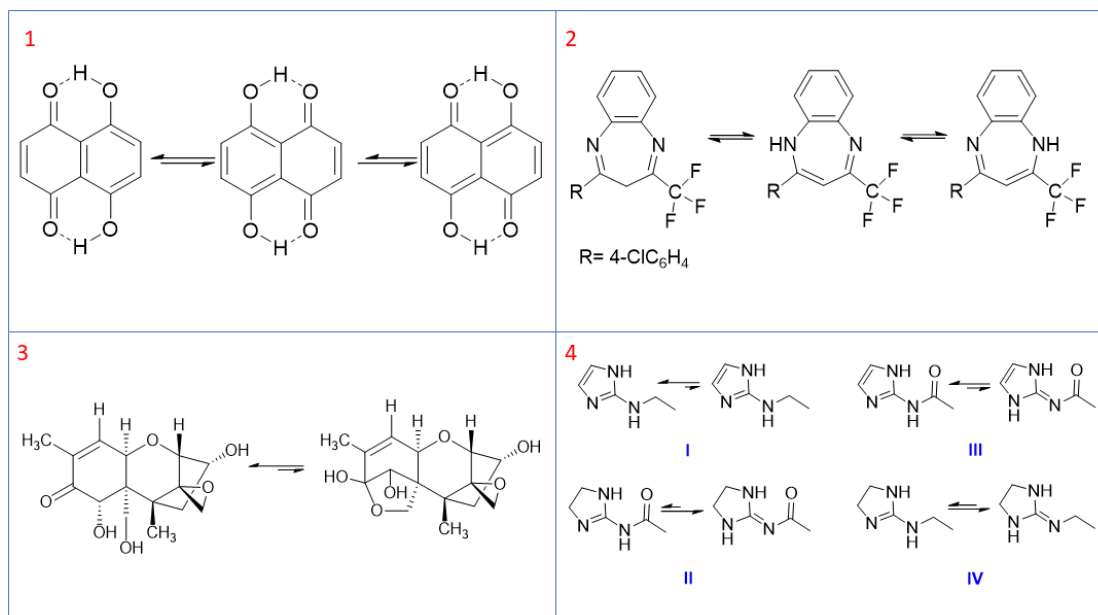


Figura 1- Representação esquemática dos equilíbrios tautoméricos descritos pelos estudos de Arnone *et al.* (1993) (1), Semenov *et al.* (2015) (2), Bahadoor *et al.* (2022) (3) e Nanubolu *et al.* (2014) (4), citados.

Embora bem documentado em compostos análogos estruturalmente ao minoxidil, como em Mfuh e Larionov (2015), Puszko *et al.* (2013), Nanubolu *et al.* (2014), entre outros, o tautomerismo é, ainda, inexplorado no contexto desta substância. Diante disso, torna-se relevante investigar e confirmar a ocorrência (ou não) do tautomerismo imina-enamina no minoxidil, o que contribuirá para um entendimento mais profundo de sua química estrutural e reatividade.

Visto que, em geral, o tautômero favorecido é aquele de menor energia global e maior deslocalização eletrônica, acredita-se que o equilíbrio esteja deslocado para a forma mais conjugada e aromaticamente estável, ou seja, a forma enamina, assim como foi observado em um dos casos estudados por Nanubolu *et al.* (2014, p. 1), no qual, experimentalmente, “o tautômero amino é estabilizado com 98,1% de ocorrência, porque as ligações duplas participam de conjugação em direção a nitrogênios endocíclicos”. Assim, a estrutura predominante seria representada como na Figura 2, baseada na representação estrutural em outros artigos na literatura, como Gorecki (1988).

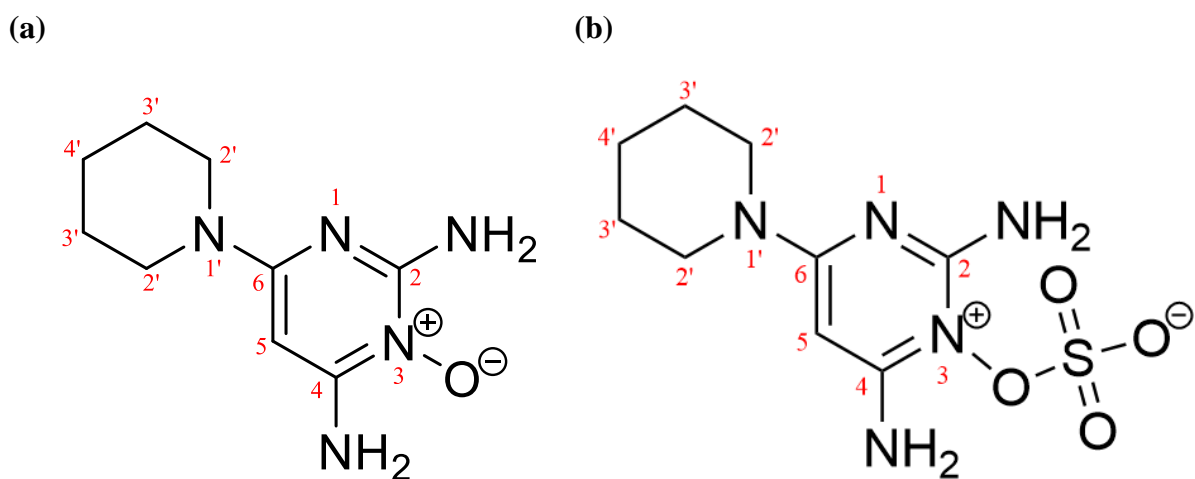


Figura 2- Representação das moléculas de minoxidil base (a) e minoxidil sulfato (b), com numeração destacada em vermelho.

O uso da RMN de ¹H e ¹³C é fundamental para a detecção de tautômeros em solução, dado que os deslocamentos químicos dos núcleos são sensíveis a mudanças no ambiente eletrônico

(Huang *et al.*, 2007). Além disso, quando o experimento é configurado de forma apropriada, a área da integral de cada sinal é proporcional ao número relativo de núcleos que a originam, de modo que as razões entre integrais de sinais da mesma molécula informam a contagem de núcleos associados a cada pico (Claridge, 2009; Mitchell; Costisella, 2007). Dessa maneira, este estudo visa investigar a existência do tautomerismo imina-enamina no minoxidil, utilizando RMN para caracterização das diferentes formas tautoméricas dessa molécula.

Em relação à solubilidade do minoxidil, no estudo de Yan *et al.* (2011), a solubilidade do minoxidil em metanol, etanol, 1-propanol, 2-propanol, 1-butanol e água foi medida pelo método gravimétrico na faixa de temperatura de 278,15 a 333,15 K. Em seguida, os autores relatam que, a uma mesma temperatura, a solubilidade em fração molar decresce na ordem: metanol > 1-propanol > 1-butanol > etanol > 2-propanol > água, fornecendo uma ordem comparativa direta entre os solventes avaliados.

A partir das considerações apresentadas, para o minoxidil, pode-se inferir que fatores semelhantes influenciem seu tautomerismo. Nesse cenário, uma estratégia sistemática que relacione solvente, temperatura e janela temporal permitirá distinguir se o minoxidil apresenta duas formas detectáveis em solução ou se permanece majoritariamente em uma única espécie, fornecendo dados espectrais reprodutíveis para cada condição. O desfecho dessa análise estabelece o quadro de referência para interpretações estruturais consistentes e orienta escolhas analíticas futuras em controle de qualidade e quantificação deste princípio ativo.

3. Objetivos

3.1 Objetivo Geral

Empregar a técnica de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) para a identificação e a caracterização de possíveis estruturas decorrentes do equilíbrio tautomérico imina-enamina do minoxidil, bem como avaliar o fenômeno de troca hidrogênio-deutério (*exchange H/D*) na presença de solvente prótico deuterado, como o metanol tetradeuterado (CD₃OD-d₄).

3.2 Objetivos específicos

- Observar, por meio dos espectros de RMN de ^1H e ^{13}C , as variações nos deslocamentos químicos, valores de integral dos sinais e nos padrões de acoplamento que possam indicar a presença de formas tautoméricas do minoxidil;
- Investigar a ocorrência do fenômeno de troca hidrogênio-deutério (*exchange H/D*), favorecido pelo uso de solvente prótico como o metanol tetradeuterado ($\text{CD}_3\text{OD-d}_4$) em relação ao uso de um solvente aprótico como o DMSO-d_6 ;
- Correlacionar o deslocamento do equilíbrio tautomérico com parâmetros experimentais, como variação de temperatura, solvente utilizado e tempo após o preparo da solução;

4. Materiais e Métodos

Foram realizadas análises espectroscópicas de RMN para identificar alterações estruturais da substância em diferentes condições experimentais. Embora os dados obtidos sejam tratados comparativamente, o delineamento foi baseado em interpretação espectral qualitativa, observação de sinais característicos e comparação de perfis espectrais entre condições previamente estabelecidas.

Considerando que, nas condições avaliadas neste estudo, as observações experimentais em relação à solubilidade, ao perfil espectral de RMN, ao tautomerismo imina-enamina e ao fenômeno de troca hidrogênio-deutério (*exchange H/D*) mostraram-se equivalentes para o minoxidil base e para o sulfato de minoxidil, os experimentos foram conduzidos de acordo com a disponibilidade dos materiais ao longo do desenvolvimento da pesquisa. Assim, a escolha entre essas formas não comprometeu a interpretação qualitativa dos resultados obtidos, uma vez que não foram verificadas diferenças relevantes, nas condições investigadas, que justificassem distinção metodológica entre elas.

A preparação das amostras foi realizada por meio da solubilização de 10mg do material (minoxidil base e sulfato) em solventes deuterados (descritos abaixo). Foram monitorados a área do sinal do hidrogênio aromático, o acoplamento C/D e o aparecimento ou desaparecimento de sinais característicos.

Para o teste de solubilidade do minoxidil, foram testados os solventes metanol tetradeuterado ($\text{CD}_3\text{OD-d}_4$), dimetilsulfóxido hexadeuterado (DMSO-d_6), água deuterada (D_2O), a mistura etanol + propilenoglicol e acetona hexadeuterada, com avaliação qualitativa baseada na presença de dissolução completa ou de material não dissolvido após o contato do fármaco com cada meio.

Para a realização deste trabalho, 10 mg de amostra padrão de minoxidil base e sulfato, adquiridas em farmácia de manipulação local, foram solubilizadas em 600 μL de $\text{CD}_3\text{OD-d}_4$, formando uma solução 1,67% (m/v). Duas soluções de minoxidil 1,67% (m/v) foram recém-preparadas para análises de RMN às temperaturas de 5 e 25 °C, respectivamente. Os experimentos foram conduzidos no Laboratório Multiusuário de RMN da UFMS (LabRMN/UFMS) através da aquisição de espectros de RMN de ^1H e ^{13}C , utilizando-se o espectrômetro Bruker Avance NEO 500, de 11,75T, operando a 500 MHz e 125 MHz para a frequência dos núcleos de ^1H e ^{13}C , respectivamente.

Em ambas as temperaturas foram realizadas aproximadamente 59 horas de aquisição de experimentos de RMN consecutivos, intercalados entre um experimento de RMN de ^1H , com duração de 4 min e 44 segundos, e um experimento de RMN de ^{13}C , com duração de 5h 52min e 10 s, cada. Os espectros de RMN de ^1H foram adquiridos utilizando-se os seguintes parâmetros de aquisição: sequência de pulso zg30, ns de 64; AQ de 3,28 s e TD de 65K. Já os espectros de RMN de ^{13}C foram adquiridos utilizando a sequência de pulso zgpg30, ns de 10K; AQ de 1,0 s; e TD de 64K.

Adicionalmente, para avaliar o comportamento do minoxidil em um solvente aprótico, 10 mg de amostra padrão de minoxidil sulfato, adquirida em farmácia de manipulação local, foram adicionadas a 600 μL de dimetilsulfóxido deuterado (DMSO-d_6). Em razão da solidificação do DMSO em baixas temperaturas e da solubilidade apenas parcial do minoxidil nesse solvente, a amostra foi submetida à filtração e apenas o sobrenadante foi utilizado para as análises. A amostra recém-preparada foi então destinada às análises de RMN à temperatura de 25 °C. Os experimentos de RMN de ^1H e ^{13}C foram adquiridos nas mesmas condições descritas acima.

Experimentos bidimensionais de RMN (HSQC, HMBC, COSY, TOCSY e JRes) foram adquiridos para contribuir com o assinalamento dos dados espectrais de RMN para a estrutura do minoxidil.

Como análise complementar aos espectros de RMN unidimensionais, foi realizado o experimento DOSY (Diffusion Ordered Spectroscopy), com o objetivo de verificar se os sinais atribuídos ao minoxidil apresentavam coeficientes de difusão compatíveis com uma única molécula íntegra em solução. O experimento foi adquirido para o núcleo de ^1H , utilizando os seguintes parâmetros: Sequência de pulso ledbpgppr2s; TD de 16K para f2 e 16 para f1; ns igual a 4; AQ de 1,39 s para f2 e 0,0032 s para f1; D16 de 0,1 ms; D20 de 200 ms; D21 de 50 ms; P30 de 1 ms; P19 de 1,1 ms.

Após a aquisição e processamento dos espectros de RMN de ^1H e ^{13}C foi medida a integral dos sinais do hidrogênio aromático (δ 5,40) a fim de comparar a proporção com os demais sinais de hidrogênio da molécula ao longo dos experimentos. No experimento de RMN de ^{13}C foram comparados os experimentos ao longo do tempo e em duas temperaturas (5 e 25°C) para avaliar o surgimento de um tripleto largo com três picos de intensidade relativa 1:1:1, correspondente ao ^{13}C acoplado ao ^2H (acoplamento C-D), ou seja, $2nI+1$ (Beatriz; Lacerda Júnior, 2018).

5. Resultados e Discussão

Durante os testes de solubilidade, observou-se que o minoxidil se apresentou solúvel em metanol deuterado, enquanto exibiu baixa solubilidade em dimetilsulfóxido hexadeuterado e em água deuterada, assim como na mistura etanol + propilenoglicol, e foi considerado praticamente insolúvel em acetona hexadeuterada. Esses resultados serviram para orientar a seleção do solvente e os cuidados de preparo das amostras utilizadas nas análises subsequentes, priorizando condições que garantissem uma fase líquida homogênea para aquisição espectral.

Tabela 1- Teste de solubilidade do minoxidil base e sulfato.

Solvente testado	Solubilidade
$\text{CD}_3\text{OD-d}_4$	Solúvel
DMSO-d_6	Baixa

Água deuterada (D ₂ O)	Baixa
Etanol + Propilenoglicol	Baixa
Acetona-d ₆	Praticamente insolúvel

Como base para assinalamento da estrutura, foram necessárias consultas em bases de dados como NMRdb, além da literatura, onde são encontrados os deslocamentos químicos teóricos e experimentais, porém sem a distinção entre as moléculas de minoxidil sulfato e base, como em Gorecki (1988). Além disso, as técnicas de RMN 1D aplicadas no presente estudo, durante o assinalamento da molécula, forneceram dados como deslocamento químico e a integral do sinal e a proporção inconsistente entre o número esperado de núcleos de hidrogênio e a integral do respectivo sinal. Os assinalamentos espectrais realizados para as moléculas de minoxidil base e sulfato estão apresentados abaixo e corroborados pelas Tabelas 2 e 3.

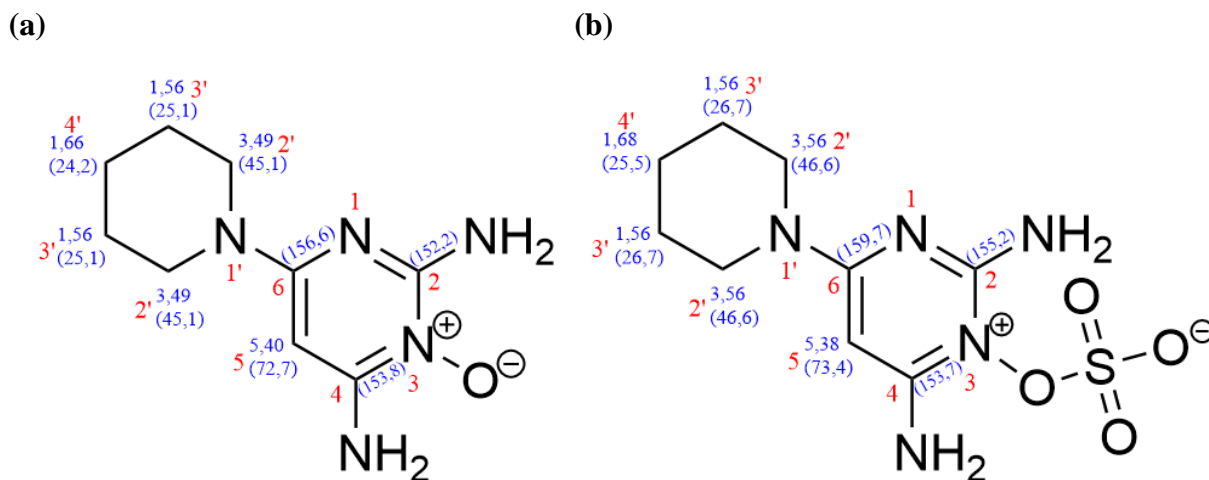


Figura 3- Representação da molécula de minoxidil base (a) e sulfato (b), com os deslocamentos químicos (δ) dos sinais de RMN de ¹H e ¹³C (entre parênteses) descritos em azul, além da numeração da molécula em vermelho. Os dados foram obtidos no presente trabalho.

Tabela 2- Assinalamento da molécula de minoxidil base, em solução de metanol tetradeuterado, a partir dos experimentos de RMN de ¹H, ¹³C e bidimensionais (11,75T). Os dados foram obtidos no presente trabalho.

Assinalamento	$\delta^1\text{H}$ (ppm) (multiplicidade) ^a	$\delta^{13}\text{C}$ (ppm)	TOCSY	HSQC	HMBC	COSY	Literatura $\delta^1\text{H}$ ($\delta^{13}\text{C}$) (ppm)
3'	1,52-1,59 (m)	25,1	1,56; 3,49	25,1	24,2; 45,1	1,66; 3,49	1,48 (24,8) ^b
4'	1,63-1,70 (m)	24,2	1,56; 3,49	24,2	25,1; 45,1	1,56	1,55 (24,0) ^b
2'	3,43-3,56 (m)	45,1	1,56; 3,49	45,1	24,2; 45,1; 156,6	1,56	3,38 (44,9) ^b
5	5,40 (s)	72,7	-	72,7	45,1; 72,7; 153,8	-	5,36 (73,2) ^b
2	-	152,2	-	-	-	-	151,7 ^b
4	-	153,8	-	-	-	-	152,9 ^b
6	-	156,6	-	-	-	-	153,9 ^b

^a m= multipletto; s= simpleto.

^b Dados reportados por Gorecki (1988), obtidos em DMSO-d₆.

Tabela 3- Assinalamento da molécula de minoxidil sulfato, em solução de metanol tetradeuterado, a partir dos experimentos de RMN de ¹H, ¹³C e bidimensionais (11,75T). Os dados foram obtidos no presente trabalho.

Assinalamento	$\delta^1\text{H}$ (ppm) (multiplicidade)	$\delta^{13}\text{C}$ (ppm)	TOCSY	HSQC	HMBC	COSY	Literatura $\delta^1\text{H}$ ($\delta^{13}\text{C}$) (ppm)
3'	1,52-1,60 (m)	26,7	1,56; 3,56	26,7	25,5; 26,7; 46,6	1,68; 3,56	1,48 (24,8) ^b
4'	1,64-1,72 (m)	25,5	1,56; 3,56	25,5	26,7; 46,6	1,56	1,55 (24,0) ^b

2'	3,52-3,60 (m)	46,6	1,56; 3,56	46,6	25,5; 26,7; 46,6; 159,7	1,56	3,38 (44,9) ^b
5	5,38 (s)	73,4	-	73,4	73,4 155,2	-	5,36 (73,2) ^b
2	-	155,2	-	-	-	-	151,7 ^b
4	-	153,7	-	-	-	-	152,9 ^b
6	-	159,7	-	-	-	-	153,9 ^b

^a m= multipeto; s= simpleto

^b Dados reportados por Gorecki (1988), obtidos em DMSO-d₆.

A análise por DOSY foi utilizada para avaliar se a redução da integral do sinal atribuído ao hidrogênio aromático (H-5) poderia estar relacionada à presença de fragmentação molecular, com eventual contribuição proporcionalmente menor da porção contendo o anel pirimidínico. Os sinais pertencentes à mesma molécula íntegra tendem a apresentar coeficientes de difusão compatíveis, como observado para a amostra no anexo A, favorecendo a interpretação de que esses sinais pertencem à mesma entidade molecular em solução.

Em relação aos espectros RMN de ¹H, no experimento realizado a 5 °C, foi observada a redução da área do sinal correspondente ao hidrogênio aromático (δ 5,40), conforme aumentou-se o tempo decorrido desde o preparo da amostra. Diferentemente, a mesma proporção da integral foi obtida para os demais sinais dos hidrogênios, correspondente aos grupos CH₂-4' (δ 1,66) e CH₂-3' (δ 1,56) do anel piperidina, como pode ser observado nas Figuras 4 e 5, que representam o primeiro espectro de RMN de ¹H com a amostra recém-preparada e o último espectro de RMN de ¹H realizado após aproximadamente 2 dias de preparo da amostra (59 h), respectivamente. A proporção dos sinais correspondeu a uma redução da área do sinal do hidrogênio aromático (δ 5,40) de aproximadamente 52%.

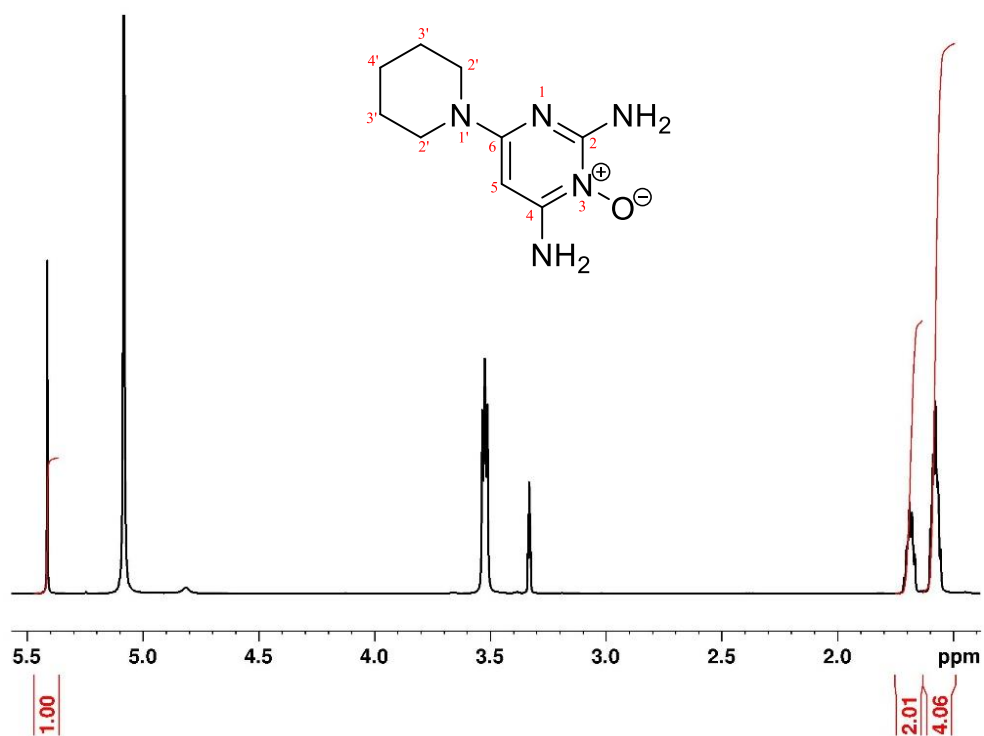


Figura 4- Espectro de RMN de ¹H (500 MHz, CD₃OD-d₄), com as integrais dos sinais dos hidrogênios 3', 4' e 5 da molécula de minoxidil base, evidenciados em vermelho, obtido a 5 °C, imediatamente após o preparo da amostra. O sinal do hidrogênio aromático em δ 5,40 está expresso como integração relativa para 1,000.

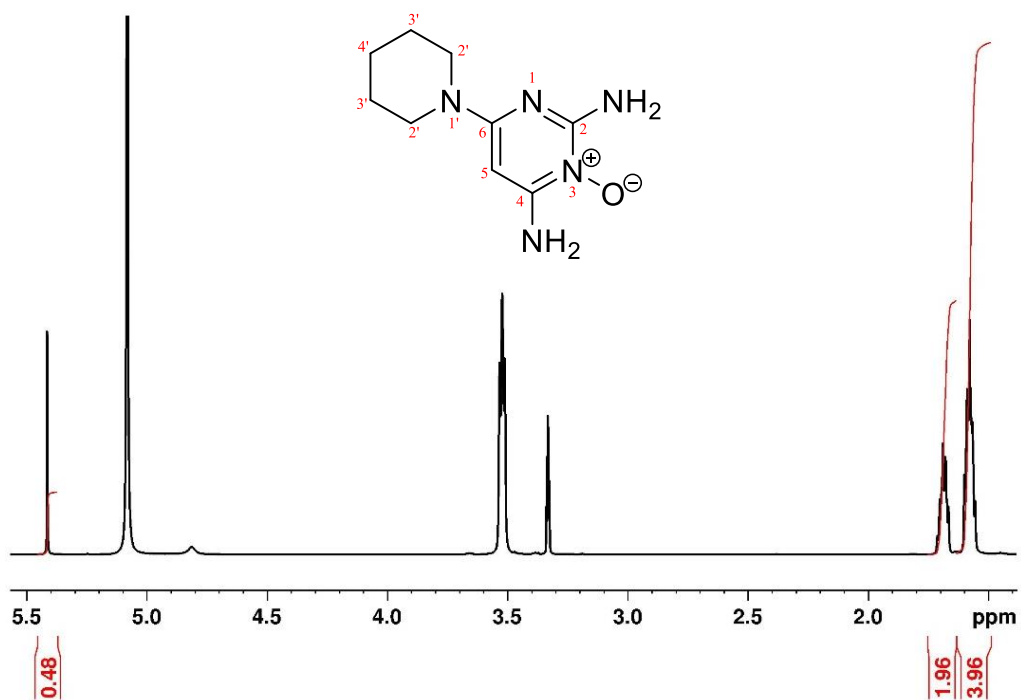


Figura 5- Espectro de RMN de ^1H (500 MHz, $\text{CD}_3\text{OD-d}_4$), com as integrais dos sinais dos hidrogênios 3', 4' e 5 da molécula de minoxidil base, evidenciados em vermelho, obtido a 5 °C, aproximadamente 2 dias após a preparação da amostra. O sinal do hidrogênio aromático em δ 5,40 da Figura 4 foi utilizado como integração relativa para 1,000.

Já os experimentos realizados a 25 °C demonstraram comportamento similar, mas de forma muito mais intensa, uma vez que a redução entre o valor das integrais dos sinais do hidrogênio aromático em δ 5,4 foi de aproximadamente 78%, conforme avançado o tempo de preparo da amostra, enquanto manteve-se uma similar proporção dos hidrogênios metilênicos $\text{CH}_2\text{-4}'$ (δ 1,66) e $\text{CH}_2\text{-3}'$ (δ 1,56), com integrais correspondentes a aproximadamente 2 e 4, respectivamente (Figuras 6 e 7).

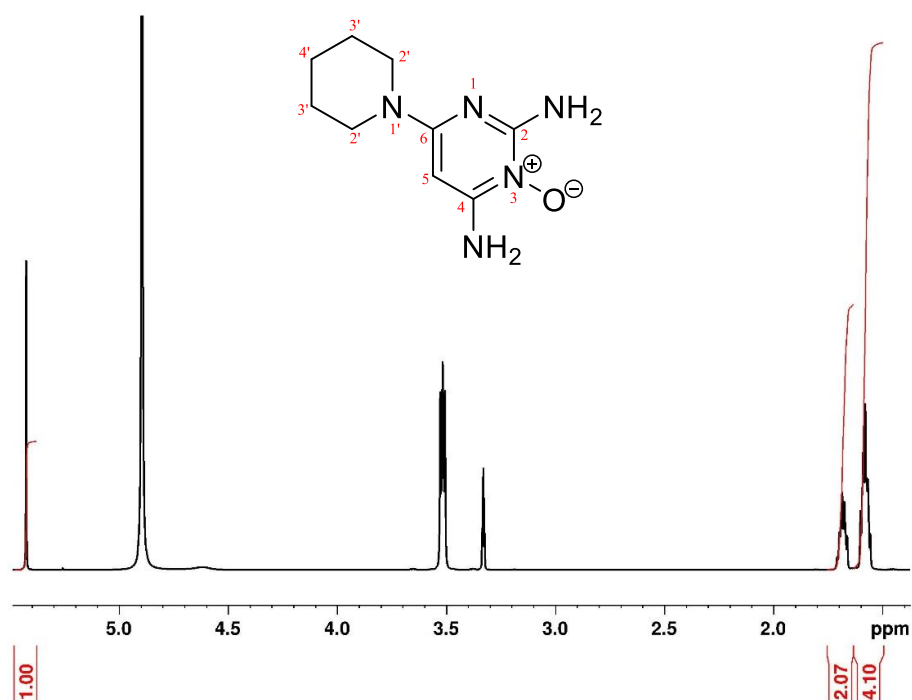


Figura 6- Espectro de RMN de ^1H (500 MHz, $\text{CD}_3\text{OD-d}_4$), obtido a 25 °C, imediatamente após o preparo da amostra com as integrais dos sinais dos hidrogênios 3', 4' e 5 da molécula de minoxidil, evidenciados em vermelho. O sinal do hidrogênio aromático em δ 5,40 está expresso como integração relativa para 1,000.

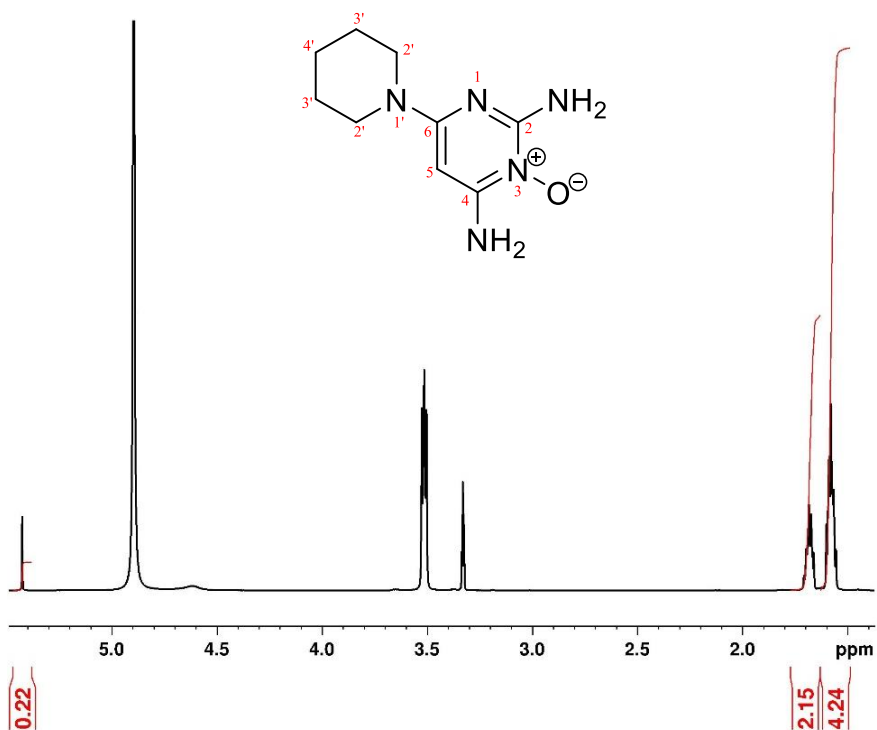


Figura 7- Espectro de RMN de ¹H (500 MHz, CD₃OD-d₄), obtido a 25 °C, aproximadamente 2 dias após a preparação da amostra, com as integrais dos sinais dos hidrogênios 3', 4' e 5 da molécula de minoxidil base, evidenciadas em vermelho. O sinal do hidrogênio aromático em δ 5,40 da Figura 6 foi utilizado como integração relativa para 1,000.

Esses resultados indicam que a modificação observada ocorreu de maneira seletiva para o hidrogênio aromático e sugere que, em temperatura mais elevada, o equilíbrio tautomérico se encontra mais deslocado no sentido da forma imina. Além disso, os dados são consistentes com a ocorrência concomitante de troca hidrogênio/deutério (H/D) em solvente prótico deuterado, como CD₃OD-d₄. A influência de solvente, temperatura e substituição sobre a posição de equilíbrios tautoméricos em sistemas heterocíclicos e análogos já foi amplamente descrita na literatura, incluindo exemplos em que determinadas formas tautoméricas são favorecidas conforme o contexto estrutural e o meio de análise, como demonstram Claramunt *et al.* (2006), Kleinpeter *et al.* (1997) e Sečkářová *et al.* (2004).

Nos espectros de RMN de ¹³C, o tautomerismo e o *exchange* H/D são marcados pelo surgimento de um tripleto largo de proporção 1:1:1 correspondente ao acoplamento C-D, encontrado nas amostras solubilizadas em CD₃OD-d₄, em ambas as temperaturas conforme variações do tempo de experimento, como é possível observar na Figura 8.

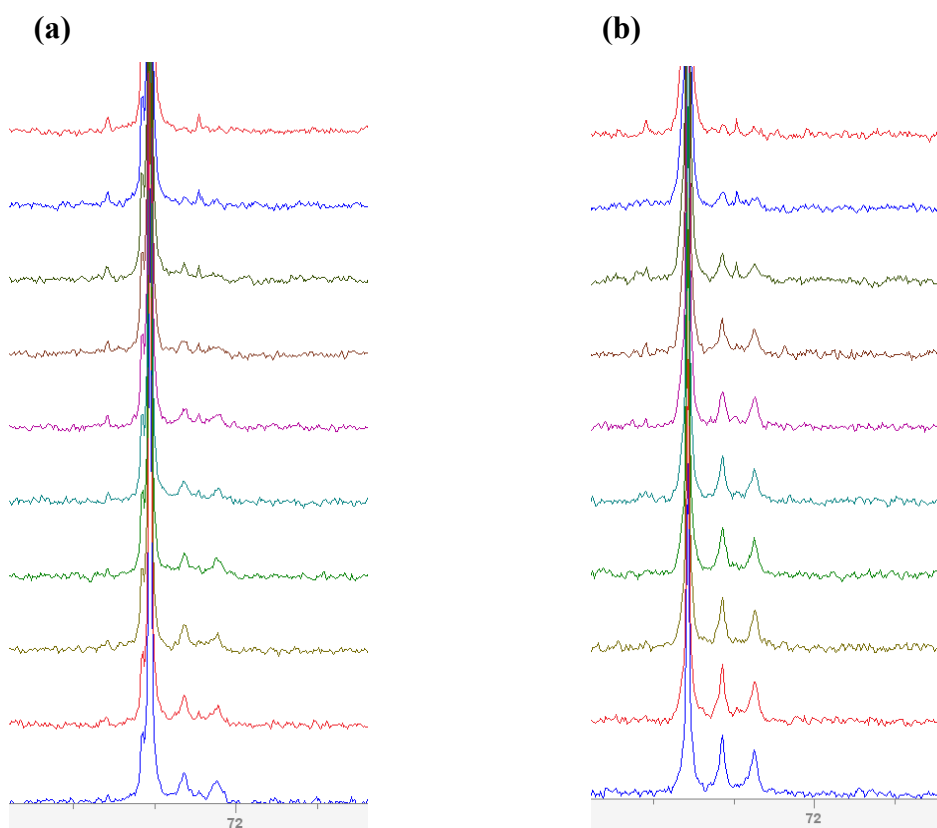


Figura 8- Espectros comparativos de RMN de ^{13}C (125 MHz, $\text{CD}_3\text{OD-d}_4$), sendo **(a)** obtidos a 5 °C, e **(b)** a 25 °C, realizados ao longo de, aproximadamente, 59 h, cujo surgimento progressivo do tripleto δ 72,7, correspondente ao carbono aromático ligado ao deutério, é observado em função do tempo decorrido de preparo da amostra.

Apesar de presente em ambos os experimentos, a concentração de moléculas que possuem o acoplamento C-D é expressivamente maior a 25 °C, após 59 h de preparo de amostra, marcado pelo surgimento do tripleto largo de proporção relativa 1:1:1. Tal observação é condizente com os resultados obtidos a partir dos espectros de RMN de ^1H , que corroboram uma maior diferença na proporção dos sinais com o aumento da temperatura, ou seja, condizente com o aumento do deslocamento do equilíbrio tautomérico para a forma imina em maiores temperaturas.

Em relação aos espectros de RMN de ^1H , no experimento realizado em DMSO-d_6 (solvente aprótico) a 25 °C, observou-se que a proporção entre as integrais das áreas dos sinais permaneceu estável desde o início até o final do experimento, isto é, entre a amostra recém-preparada e a amostra analisada após aproximadamente 59 h de aquisição, mantendo-se compatível com a proporção esperada para a molécula de minoxidil. Assim, diferentemente do comportamento

observado em solvente prótico deuterado, não foram verificadas variações sistemáticas na razão entre as integrais do hidrogênio aromático (δ 5,40) e dos hidrogênios metilênicos do anel piperidina ($\text{CH}_2\text{-4}'$ em δ 1,66 e $\text{CH}_2\text{-3}'$ em δ 1,56), indicando que, nessas condições, a amostra manteve perfil de integração consistente com a contagem relativa de núcleos prevista para a estrutura.

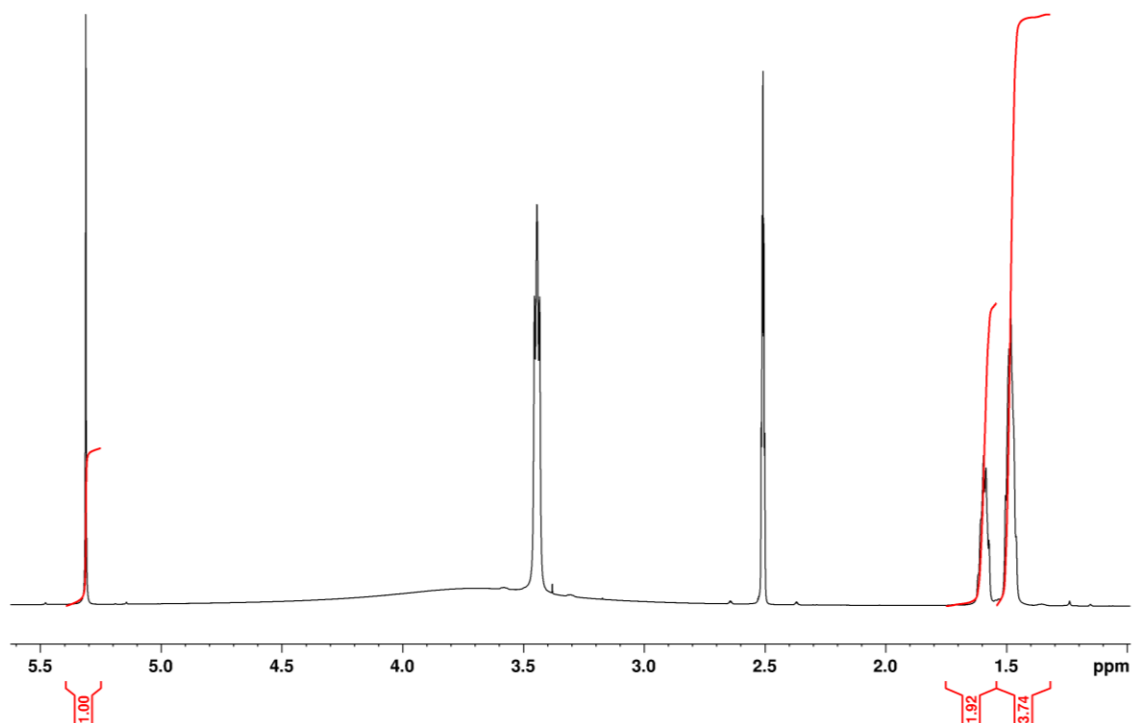


Figura 9- Espectro de RMN de ¹H (500 MHz, DMSO-_d₆), obtido a 25 °C, imediatamente após a preparação da amostra, com as integrais dos sinais dos hidrogênios 3', 4' e 5 da molécula de minoxidil evidenciadas em vermelho. O sinal do hidrogênio aromático em δ 5,40 está expresso como integração relativa para 1,000.

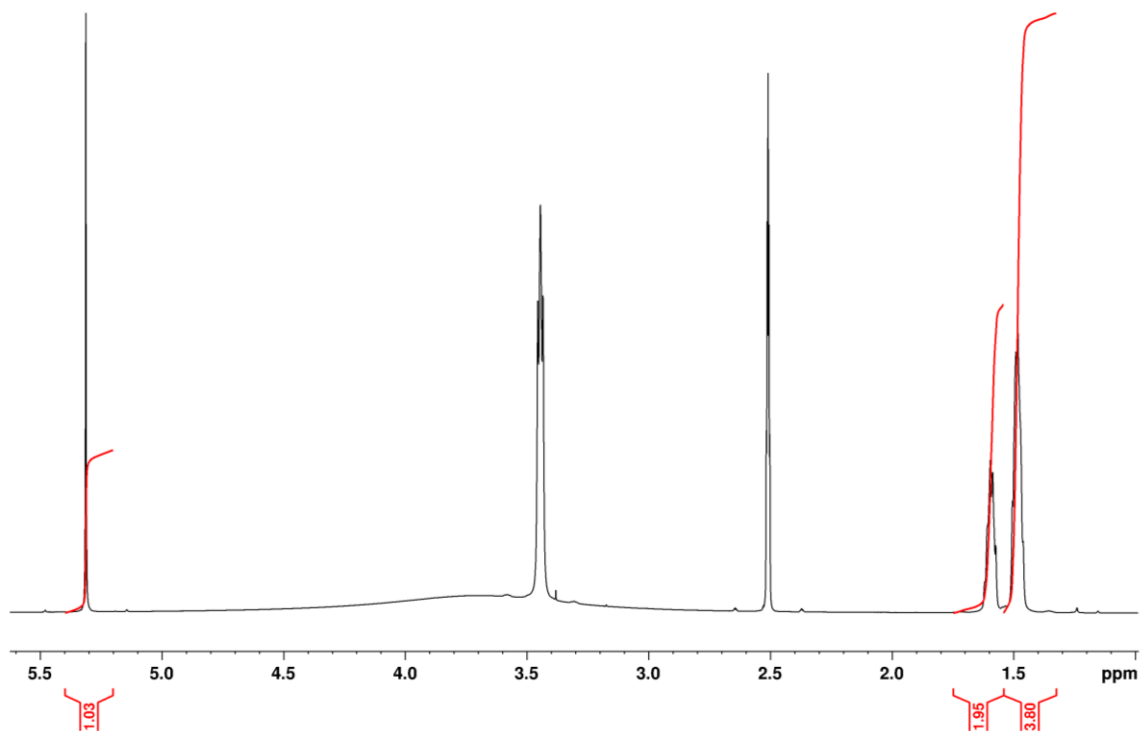


Figura 10- Espectro de RMN de ^1H (500 MHz, DMSO-d_6), obtido a 25 °C, aproximadamente, 2 dias após a preparação da amostra, com as integrais dos sinais dos hidrogênios 3', 4' e 5 da molécula de minoxidil evidenciadas em vermelho. O sinal do hidrogênio aromático em δ 5,40 da Figura 9 foi utilizado como integração relativa para 1,000.

Nos espectros de RMN de ^{13}C , obtidos em DMSO-d_6 ao longo de aproximadamente 59 h de experimento, não foi observado o surgimento do tripleto largo atribuído ao acoplamento C-D, nem quaisquer outras alterações relevantes no perfil espectral ao longo do tempo. Os sinais de carbono mantiveram-se estáveis quanto à posição e ao padrão observado, sem evidências de modificações progressivas que indicassem ocorrência de *exchange* H/D ou mudanças estruturais detectáveis nas condições avaliadas. Esse comportamento é coerente com a estabilidade observada para a amostra em solvente aprótico.

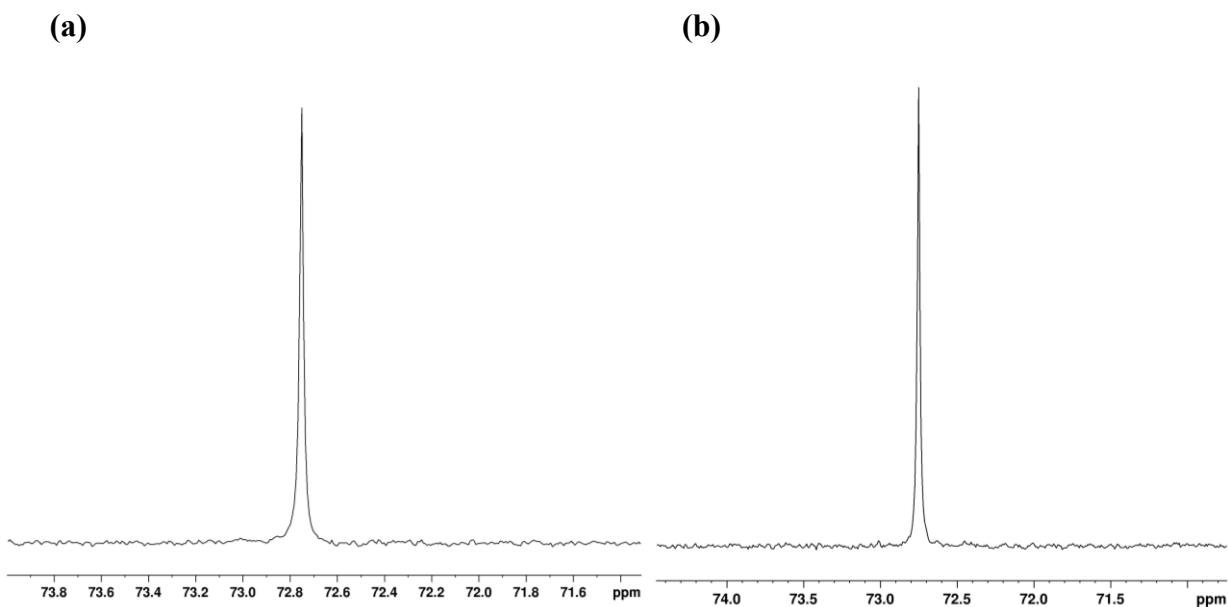
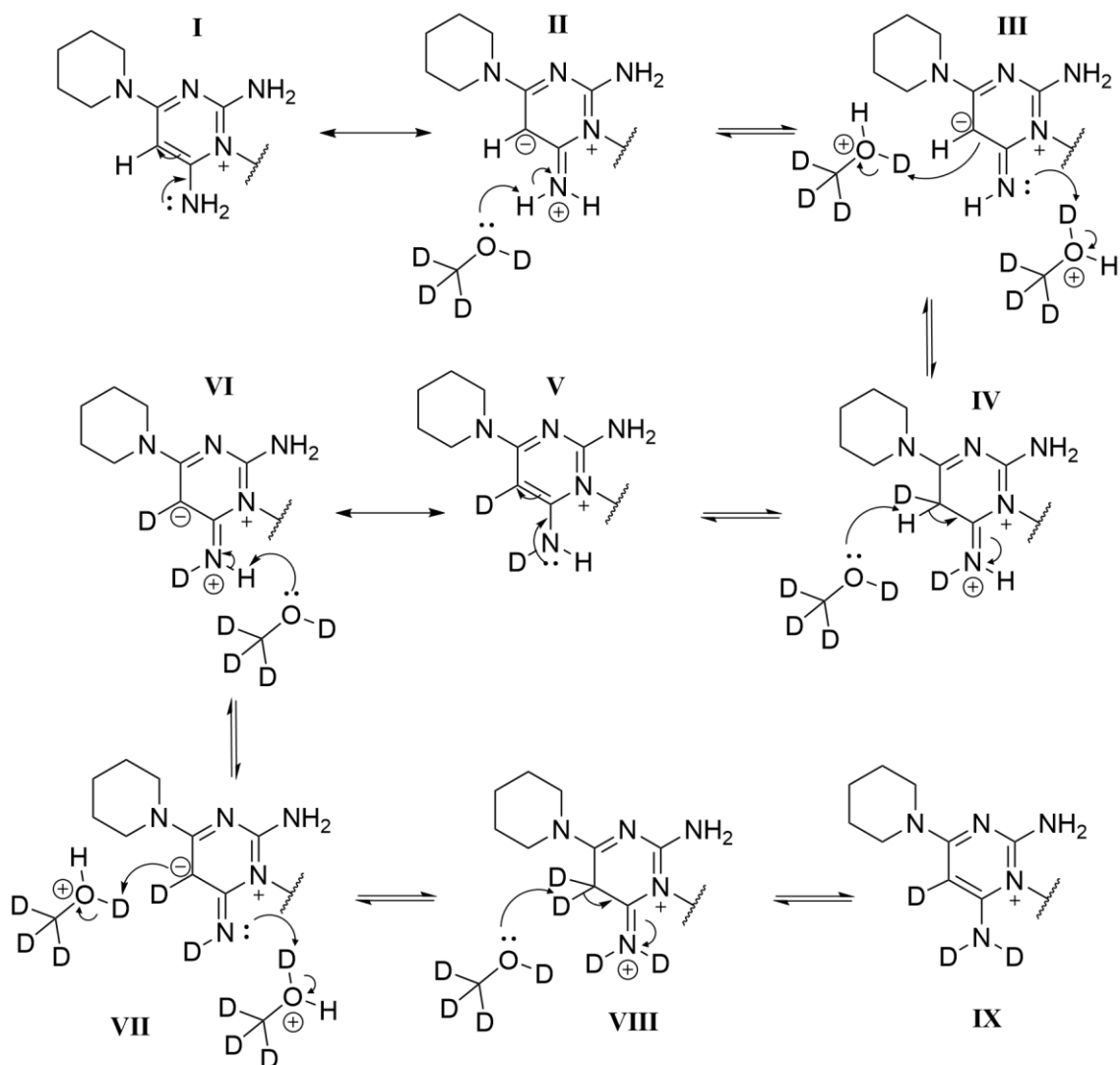


Figura 11- Espectros comparativos de RMN de ^{13}C (125 MHz, DMSO-d_6) a $25\text{ }^\circ\text{C}$, relativos ao sinal do carbono aromático C-5, sendo **(a)** obtido imediatamente após a preparação da amostra, e **(b)** realizado após, aproximadamente, 2 dias.

Diante dos resultados de RMN, a hipótese proposta para equilíbrio entre os tautômeros (Esquema 1) é que inicialmente, na amina primária ligada a um anel pirimidínico (contribuinte de ressonância I, enamina), o par de elétrons não-ligantes do nitrogênio é deslocalizado para o anel aromático, correspondente a um contribuinte de ressonância que equivale a uma ligação π do tipo $\text{N}=\text{C}$, gerando-se uma carga negativa no carbono orto à amina, no qual está ligado ao hidrogênio (contribuinte de ressonância II). Esse contribuinte de ressonância é menos estável.

No contribuinte de ressonância II, o nitrogênio, agora parcialmente carregado positivamente devido à ligação $\text{N}=\text{C}$, torna-se mais suscetível à desprotonação pelo metanol tetradeuterado ($\text{CD}_3\text{OD-d}_4$) presente no meio, já que o oxigênio apresenta um par de elétrons livres (estrutura III). A próxima etapa, o *exchange* H/D, leva à captura do cátion de deutério do metanol tetradeuterado protonado, pelo par de elétrons livres do nitrogênio e, por conseguinte, a formação de uma ligação $\text{N}-\text{D}$ (estrutura IV, a imina com *exchange* H/D). Em seguida, o carbono aromático, que anteriormente sustentava a carga negativa, captura um cátion de deutério (D^+) do metanol tetradeuterado protonado. Posteriormente, o $\text{CD}_3\text{OD-d}_4$ captura o próton do carbono aromático reestabelecendo a aromaticidade no anel (estrutura V).

Com o restabelecimento da aromaticidade, a ligação π entre o nitrogênio e o anel é desfeita, e o par de elétrons retorna ao nitrogênio, retornando a amina à sua forma neutra, porém agora mono-deuterada (estrutura V). Esta estrutura V novamente corresponde a um dos contribuintes de ressonância (contribuintes de ressonância V e VI). Como o nitrogênio ainda possui um próton remanescente (NH-D), uma segunda desprotonação promovida pelo $\text{CD}_3\text{OD-d}_4$ pode ocorrer, formando uma nova ligação $\pi \text{N}=\text{C}$, que captura outro D^+ de um metanol tetradeuterado protonado (estrutura VI). Novamente, o carbono aromático que sustentava a carga negativa captura um cátion de deutério (D^+) do metanol tetradeuterado protonado (estrutura VII) cujo $\text{CD}_3\text{OD-d}_4$ captura o cátion de deutério do carbono aromático reestabelecendo a aromaticidade no anel (estrutura VIII). Essa etapa final gera o grupo ND_2 , restabelecendo a aromaticidade, novamente (estrutura IX, novamente a enamina, mas com o *exchange* H/D).



Esquema 1. Representação esquemática do tautomerismo imina-enamina do minoxidil, o qual ocorre juntamente com a troca hidrogênio/deutério (*exchange* H/D) induzida pelo solvente prótico deuterado (CD₃OD-d₄, neste caso).

O produto final desse processo exibe dois átomos de deutério ligados ao nitrogênio (ND₂) e um deutério incorporado ao anel aromático, comprovando a hipótese do *exchange* entre o hidrogênio e o deutério da amostra e do solvente, decorrente do tautomerismo enamina-imina presente na molécula de minoxidil Figura 12.

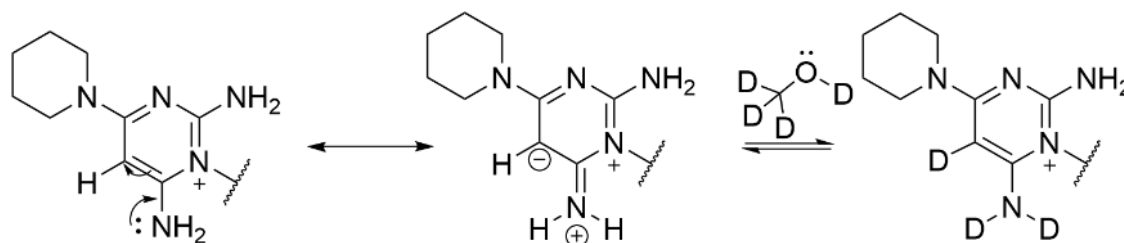


Figura 12- Equilíbrio tautomérico previsto para a molécula de minoxidil com *exchange* H/D, devido à presença de solvente prótico deuterado.

Estes resultados são coerentes com a observação experimental do acoplamento C-D (triplete 1:1:1 no espectro de RMN de ¹³C), com o deslocamento químico altamente blindado para o carbono aromático C-5 e também com a redução na área do sinal de H-5 devido ao *exchange* H/D observado em decorrência do tautomerismo na molécula de minoxidil.

6. Conclusão

Com base nos resultados obtidos, este estudo mostrou que as características estruturais do minoxidil em solução são fortemente dependentes do solvente e da temperatura. Em metanol tetradeuterado (CD₃OD-d₄), observou-se a redução seletiva da integral do hidrogênio aromático ao longo do tempo, com efeito mais pronunciado a 25 °C do que a 5 °C, enquanto os sinais dos hidrogênios metilênicos do anel piperidina mantiveram proporções compatíveis com a estrutura. De forma complementar, os espectros de RMN de ¹³C evidenciaram o surgimento progressivo de um tripleto largo atribuído ao acoplamento C–D, reforçando que, em solvente prótico deuterado, o sistema é consistente com a ocorrência concomitante de tautomerismo imina-enamina e troca hidrogênio-deutério (*exchange* H/D).

Em contraste, nos experimentos realizados em DMSO-d₆, solvente aprótico, a proporção entre as integrais dos sinais de RMN de ¹H permaneceu estável ao longo de aproximadamente 59 h, mantendo a relação esperada para a molécula de minoxidil. Da mesma forma, os espectros de RMN de ¹³C não apresentaram surgimento do tripleto atribuído ao acoplamento C–D nem outras alterações relevantes no perfil espectral. Esses achados indicam que, nas condições avaliadas, o DMSO-d₆ não favoreceu as mesmas transformações observadas em CD₃OD-d₄, o que evidencia o papel do meio na modulação da troca H/D.

Além disso, os testes de solubilidade mostraram que o metanol deuterado foi o solvente mais adequado entre os sistemas testados, enquanto DMSO-d₆, água deuterada e a mistura etanol + propilenoglicol apresentaram baixa solubilidade, e a acetona hexadeuterada se mostrou praticamente insolúvel, confirmando a importância da escolha do solvente para o preparo e a interpretação analítica das amostras.

Dessa forma, os resultados obtidos contribuem para a compreensão dos desafios estruturais do minoxidil em solução e indicam que a interpretação espectral e a futura quantificação desse fármaco por RMN devem considerar, de modo cuidadoso, os efeitos do solvente, da temperatura e do tempo após o preparo da amostra. O trabalho também oferece evidências experimentais úteis para o estabelecimento de condições analíticas mais reprodutíveis, podendo servir de base para estudos futuros voltados ao controle de qualidade, à caracterização de amostras suspeitas e ao aprimoramento de metodologias de quantificação do minoxidil em formulações farmacêuticas.

7. Referências bibliográficas

ARNONE, A. *et al.* NMR study of tautomerism in natural perylenequinones. *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 2*, London, n. 8, p. 1447–1454, ago. 1993. DOI: 10.1039/P29930001447.

ARTECHE, O. S.; VILLANUEVA, J. P.; ESPINOSA, J. F. P.; BENÍTEZ, J. F. C. *Bases de la química heterocíclica aplicada a la obtención de compuestos orgánicos de interés farmacéutico*. 1. ed. Ciudad de México: Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Xochimilco, 2020. p. 22–24. ISBN 978-607-28-1887-3.

BAHADOOR, A. *et al.* Tautomerization and isomerization in quantitative NMR: a case study with 4-deoxynivalenol (DON). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 70, n. 8, p. 2733–2740, feb. 2022. DOI: [10.1021/acs.jafc.1c08053](https://doi.org/10.1021/acs.jafc.1c08053).

BEATRIZ, A.; LACERDA JÚNIOR, V. *Fundamentos de espectrometria e aplicações*. 1. ed. São Paulo: Atheneu, 2018. 1 recurso online. ISBN 9788538808077.

BERTOLI, M. J. et al. Female pattern hair loss: a comprehensive review. *Dermatologic Therapy*, v. 33, n. 6, e14055, nov. 2020. DOI: 10.1111/dth.14055.

CLARAMUNT, R. et al. The use of NMR spectroscopy to study tautomerism. *Progress in Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy*, v. 49, n. 3-4, p. 169–206, 2006. DOI: 10.1016/j.pnmrs.2006.07.001.

CLARIDGE, T. D. W. *High-resolution NMR techniques in organic chemistry*. 2. ed. Oxford: Elsevier, 2009.

EISAVI, R. et al. The promoted synthesis of minoxidil by magnetic nanoparticles of cobalt ferrite (CoFe₂O₄) as a heterogeneous reusable catalyst. *Turkish Journal of Chemistry*, v. 43, p. 1425–1435, 2019. DOI: 10.3906/kim-1903-46.

FRYDRYCH, A.; JUROWSKI, K. Toxicity of minoxidil – Comprehensive in silico prediction of main toxicity endpoints: Acute toxicity, irritation of skin and eye, genetic toxicity, health effect, cardiotoxicity and endocrine system disruption. *Chemico-Biological Interactions*, v. 393, p. 110951, 2024. DOI: 10.1016/j.cbi.2024.110951.

GORECKI, D. K. J. Minoxidil. In: FLOREY, K. (ed.). *Analytical profiles of drug substances*. San Diego: Academic Press, v. 17, p. 185-219, 1988. ISBN 9780122608179. DOI: 10.1016/S0099-5428(08)60220-8.

HUANG, X. et al. Introduction to NMR and its application in metabolite structure determination. In: ZHANG, D. et al. (ed.). *Drug metabolism in drug design and development: basic concepts and practice*. Hoboken, NJ: Wiley-Interscience, 2007. p. 369-409. DOI: 10.1002/9780470191699.ch12.

KLEINPETER, E. et al. ¹³C NMR, ¹⁵N NMR and quantum-chemical study of the tautomerism of 2-substituted 5-Me-7-OH-1,2,4-triazolo[1,5-a] pyrimidines. *Journal of Molecular Structure*, v. 435, p. 65–76, 1997. DOI: 10.1016/S0022-2860(97)00138-5.

LAURELLA, S. L. et al. NMR as a tool for studying rapid equilibria: tautomerism. In: RAHMAN, A.; CHOUDHARY, M. I. (ed.). *Applications of NMR Spectroscopy*. [S. l.]: Bentham Science Publishers, v. 6, p. 1-46, 2017. DOI: 10.2174/9781681084398117060003.

MAKUC, D. et al. Determination of D-Cycloserine impurities in pharmaceutical dosage forms: comparison of the International Pharmacopoeia HPLC-UV method and the DOSY NMR method. *Molecules, Basel*, v. 25, n. 7, art. 1684, 2020. DOI: 10.3390/molecules25071684.

MFUH, A. M.; LARIONOV, O. V. Heterocyclic N-oxides – An emerging class of therapeutic agents. *Current Medicinal Chemistry*, v. 22, n. 24, p. 2819–2857, 2015. DOI: 10.2174/0929867322666150619104007.

MITCHELL, T. N.; COSTISELLA, B. NMR – *From spectra to structures: an experimental approach*. 2. ed. Berlin: Springer-Verlag, 2007. ISBN 978-3-540-72195-6.

NANUBOLU, J. B.; SRIDHAR, B.; RAVIKUMAR, K. Understanding the amino ↔ imino tautomeric preference in (imidazole)imidazolidine-N-aryl(alkyl) systems: a case study of moxonidine drug and insights from Cambridge Structural Database (CSD). *CrystEngComm*, v. 16, p. 10602-10617, 2014. DOI: 10.1039/c4ce01541j.

NASCIMENTO, J. M. R.; SANTOS, M. R.; QUINTILIO, M. S. V. O controle de qualidade nas indústrias farmacêuticas. *Revista JRG de Estudos Acadêmicos*, v. 5, n. 11, p. 43-55, 2022. DOI: 10.5281/zenodo.7110754.

NMRDB. NMR Predict. [S. l.], [s. d.]. Disponível em: https://www.nmrdb.org/new_predictor/index.shtml?v=v2.157.0. Acesso em: 11 nov. 2023.

NOGUEIRA, E.; VECINA NETO, G. Falsificação de medicamentos e a Lei n. 11.903/09: aspectos legais e principais implicações. *Revista de Direito Sanitário*, São Paulo, v. 12, n. 2, p. 112-139, jul./out. 2011. DOI: 10.11606/issn.2316-9044.v12i2p112-139.

PIRHAYATI, F. H. *et al.* Experimental and computational approaches for measuring minoxidil solubility in propylene glycol + water mixtures at different temperatures. *Journal of Molecular Liquids*, v. 280, p. 334-340, 2019. DOI: 10.1016/j.molliq.2019.01.120.

PUSZKO, A. *et al.* Specificity of ¹⁵N NMR chemical shifts to the nature of substituents and tautomerism in substituted pyridine N-oxides. *Structural Chemistry*, v. 24, p. 333-337, 2013. DOI: 10.1007/s11224-012-0069-0.

SEČKÁŘOVÁ, P. *et al.* Direct determination of tautomerism in purine derivatives by low-temperature NMR spectroscopy. *Tetrahedron Letters*, v. 45, n. 33, p. 6259–6263, 2004. DOI: 10.1016/j.tetlet.2004.06.088.

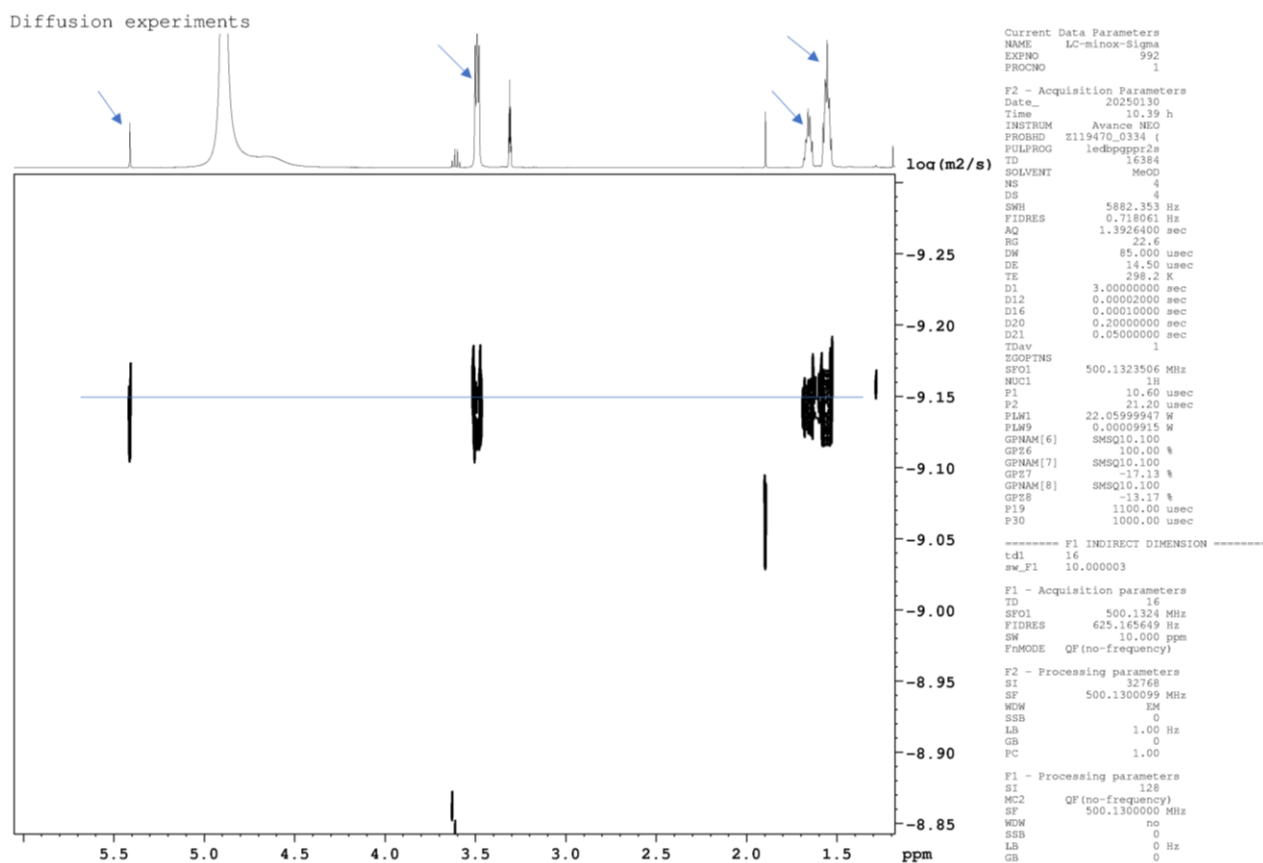
SEMENOV, V. A. *et al.* Theoretical and experimental ¹⁵N NMR study of enamine–imine tautomerism of 4-trifluoromethyl[b]benzo-1,4-diazepine system. *Magnetic Resonance in Chemistry*, v. 53, n. 12, p. 1031–1034, 2015. DOI: 10.1002/mrc.4296.

TAMASHUNAS, N. L.; BERGFELD, W. F. Male and female pattern hair loss: treatable and worth treating. *Cleveland Clinic Journal of Medicine*, v. 88, n. 3, p. 173-182, mar, 2021. DOI: 10.3949/ccjm.88a.20014.

YAN, H. *et al.* Solubility of minoxidil in methanol, ethanol, 1-propanol, 2-propanol, 1-butanol, and water from (278.15 to 333.15) K. *Journal of Chemical & Engineering Data*, v. 56, n. 5, p. 2720-2722, 2011. DOI: 10.1021/je1012839.

ANEXO A – EXPERIMENTO DOSY

Figura 1- Experimento DOSY realizado pela Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear, com os sinais dos hidrogênios da molécula de minoxidil evidenciados por setas azuis, assim como seus respectivos coeficientes de difusão delimitados pela reta azul.



Fonte: Elaborado pela autora (2026).