

Determinação de minoxidil em formulações farmacêuticas usando permanganometria

Rogério Adelino de Sousa¹, Éder Tadeu Gomes Cavalheiro^{2*}.

1 – Departamento de Química, Universidade Federal de São Carlos, Rod. Washington Luiz Km 235, São Carlos, São Paulo, Brasil, CEP 13565-905, Caixa Postal 676.

2 – Departamento de Química e Física Molecular, Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, Av Trabalhador São-carlense, 400, Centro, São Carlos, São Paulo, Brasil, CEP 13560-970, Caixa Postal 780.

*Corresponding author: Prof. Dr. Éder Tadeu Gomes Cavalheiro, Departamento de Química e Física Molecular- DQFM, Instituto de Química de São Carlos / USP, Avenida do Trabalhador São-Carlense, 400, CxP 780, CEP 13560-970 - São Carlos/SP - Brasil, Telefone: +551633738054 FAX: +551633739987
E-mail: cavalheiro@iqsc.usp.

Resumo: Um método clássico para a determinação de minoxidil em formulações farmacêuticas é proposto baseado na reação redox entre KMnO_4 e o minoxidil. Os melhores resultados na permanganometria foram obtidos usando concentrações de $1,00 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$ para o permanganato. O minoxidil foi usado como titulante na concentração de $2,00 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$ diluído em solução de H_2SO_4 $2,00 \text{ mol L}^{-1}$. As recuperações para método proposto foram da ordem de 94,5 a 95,2 % dependendo da amostra comercial. O método proposto foi aplicado à amostras comerciais contendo minoxidil e comparado com resultados obtidos a partir de procedimentos cromatográficos com erros relativos da ordem de -1 a -5,26%. O procedimento se mostrou simples, rápido e pode ser uma alternativa para a determinação de minoxidil em amostras farmacêuticas, nas quais a concentração do fármaco é relativamente elevada.

Palavras Chave: Determinação de minoxidil; titulação, permanganato de potássio.

Introdução

O minoxidil, 3-óxido-2,4-diamino-6-piperidinopirimidina (Figura 1) é um sólido cristalino branco, inodoro, insolúvel em água em acetona ou soluções alcalinas, é pouco solúvel em álcoois e solúvel em soluções ácidas [1]. O minoxidil age como vasodilatador periférico, quando ingerido é metabolizado no fígado pela ação da *sulfotransferase*, transformando-se na molécula ativa hidralazina. Como a hidralazina produz apenas vaso-dilatação arteriolar, não tendo ação em vasos de capacitância, causa ativação simpática

reflexa, taquicardia e retenção hidro-salina, portanto o minoxidil deve ser administrado em conjunto com diuréticos e bloqueadores simpáticos para minimizar as reações adversas citadas acima [2 – 4].

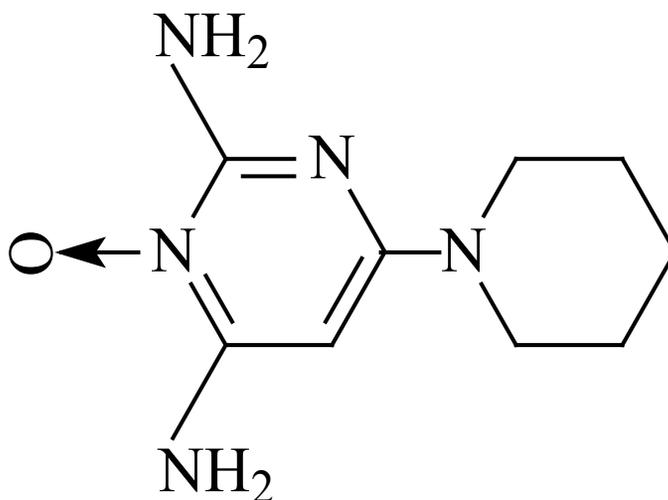
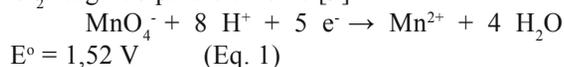


Figura 1: Fórmula estrutural do minoxidil

Devido à sua propriedade vaso dilatadora, o minoxidil é usado no controle da *Hipertensão Arterial* e no tratamento da *Alopécia Areata*, um tipo de calvície conhecida vulgarmente como “pe-lada” [4 – 8].

A permanganometria se refere às reações redox, nas quais se usa KMnO_4 como agente oxidante para a determinação volumétrica de um agente redutor. Este tipo de reação foi proposto inicialmente por F. Margueritte na determinação de Fe(II) em soluções ácidas. O potencial padrão de redução do MnO_4^- , em meio de ácido sulfúrico 1 mol L^{-1} , é de 1,52 volts o que indica que o KMnO_4 é um oxidante forte (Eq. 1). O meio é acidificado com ácido sulfúrico (H_2SO_4), pois esse ácido não se oxida frente ao KMnO_4 , como ocorre com o ácido clorídrico (HCl), que se oxida formando Cl_2 reagindo paralelamente [9].



Em meio ácido, o KMnO_4 , que se apresenta na forma de uma solução de coloração violeta, se reduz a Mn (II), incolor [10,11].

O KMnO_4 apresenta a desvantagem de não ser padrão primário devido à instabilidade à incidência de luz e a instabilidade térmica o permanganato de potássio. Entretanto, apesar disso,

o KMnO_4 apresenta como vantagens um alto poder oxidante e, ainda, quando usado em titulações em que a substância a ser titulada é incolor ou levemente colorida, o KMnO_4 além de oxidante é auto-indicador devido à mudança de coloração de rosa (MnO_4^-) para incolor (Mn^{2+}). A reação é geralmente lenta à temperatura ambiente, podendo ser acelerada pela temperatura, geralmente na ordem de 60°C [10,11].

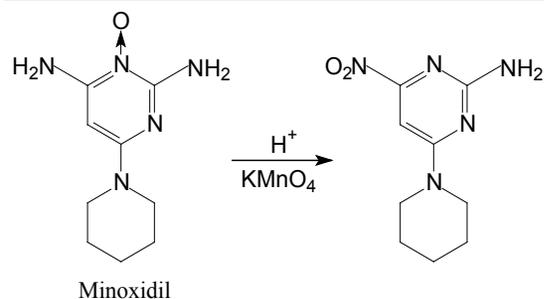
A análise titrimétrica, ou titulação volumétrica, consiste na determinação exata do volume, de uma solução padrão, necessário para reagir quantitativamente com uma solução cuja concentração será determinada [12]. Trata-se de uma técnica muito utilizada para a determinação quantitativa de diversas substâncias atualmente, mesmo sendo uma técnica clássica de determinação. A Association of Official Analytical Chemists (AOAC) é uma organização internacional com mais de 120 anos de experiência em validar e aprovar métodos para análise de alimentos, medicamentos e produtos agrícolas [13]. A AOAC conta com uma coleção exclusiva de análises químicas. Na 18ª Edição dos Métodos Oficiais de Análises da AOAC são descritos um total de 2813 métodos analíticos [14], dos quais 442 procedimentos, 16%, são mé-

todos titrimétricos [15], mostrando a sua importância e aplicabilidade.

Procedimentos para a determinação de minoxidil tais como eletroquímicos [16, 17], espectrofotométricos [18], cromatográfico [19 – 21] já foram descritos anteriormente.

Com o objetivo de simplificar os procedimentos analíticos e reduzir custos de análise em amostras farmacêuticas com concentrações relativamente elevadas, Sousa e colaboradores [22], propuseram um método de titulação espectrofotométrica baseada na reação redox entre minoxidil em meio ácido e KMnO_4 . O método monitora o decréscimo da absorbância em 550 nm pela redução do KMnO_4 pelo minoxidil (Eq. 2).

O presente trabalho tem por objetivo propor uma metodologia simples e de baixo custo para determinação de minoxidil em formulações farmacêuticas de uso tópico. Devido ao grande número de farmácias de manipulação a titulação proposta nesse trabalho pode ser empregada no controle de qualidade dessas farmácias exigindo baixo investimento para a implementação, sem a necessidade de instrumentação sofisticada.



(Eq. 2)

Materiais e Métodos

Reagentes e soluções

Todos os reagentes utilizados no presente trabalho foram grau analítico, PA. As soluções foram preparadas em água

bidestilada num destilador de quartzo. As soluções de KMnO_4 (Merck) foram preparadas pela dissolução direta do sal em água bidestilada. A solução de KMnO_4 foi padronizada com oxalato de sódio (Merck, USA) dissolvido em ácido sulfúrico (Mallinckrodt, México) $2,00 \text{ mol L}^{-1}$ [23]. O minoxidil foi adquirido da *Natural Pharma Produtos Farmacêuticos Ltda*, lote nº 1901.

Padronização do permanganato de potássio

Uma vez que o permanganato não é padrão primário, recomenda-se a padronização de suas soluções com oxalato de sódio em meio ácido. Neste meio o sal do ácido fraco é protonado formando o ácido oxálico. A padronização é realizada adicionando-se o padrão à solução de KMnO_4 até 90 a 95 % do volume requerido para o ponto de equivalência calculado previamente a uma temperatura na ordem de $60 \text{ }^\circ\text{C}$, tendo como ponto final da titulação uma coloração rosa pálido devido ao pequeno excesso de KMnO_4 [23]. Normalmente se utilizam concentrações de KMnO_4 da ordem de $2 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$ e $\text{Na}_2\text{C}_2\text{O}_4$ da ordem de $1 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$, sob agitação rigorosa.

Titulação de KMnO_4 com minoxidil

As titulações foram realizadas adicionando-se solução de minoxidil ($0,01 \text{ mol L}^{-1}$) em meio de H_2SO_4 ($2,00 \text{ mol L}^{-1}$) à 20,0 mL de solução de KMnO_4 à partir de uma bureta sob a temperatura desejada. O ponto final foi determinado pelo desaparecimento da cor púrpura característica do KMnO_4 .

Método comparativo

Foi usado um método comparativo para determinação de minoxidil nas amostras comerciais proposto por Zarghi *et al.* [21], e que consiste de um procedimento de cromatografia líquida de alta performance (HPLC). Foram encontrados erros relativos de - 3,0 % para o *Neoxidil*[®] e 4,0 % para o *Regaine*[®] em relação aos valores das quantida-

des de minoxidil citados nos rótulos, 20 mg mL⁻¹ para ambos.

Resultados e discussão

Para a otimização da permanganometria para a determinação de minoxidil em amostras farmacêuticas foram estudados o efeito da ordem da adição dos reagentes: qual o melhor titulante e titulado, influência da concentração de H₂SO₄, influência das concentrações de minoxidil e permanganato de potássio, influência da temperatura na reação redox. A avaliação do método foi feita com base no estudo da repetibilidade, análise das amostras comerciais e teste de adição e recuperação, conforme se descreve a seguir.

Estudo do efeito da ordem da adição de amostra

Neste caso investigou-se o efeito da ordem de adição de reagentes, isto é, definiu-se o titulado e o titulante. Na padronização do KMnO₄ este é usado como titulante e auto-indicador, porém na determinação titrimétrica de minoxidil o permanganato, quando usado como titulante auto-indicador impossibilitava a visualização do ponto final da titulação pois, mesmo com um pequeno excesso do permanganato de potássio, a cor rosa pálido, que indicaria o ponto final da titulação, ainda não era observada [23].

Após a adição de excesso de KMnO₄ ocorria o aparecimento de um precipitado marrom típico de óxido de manganês IV (MnO₂), todavia ao inverter a ordem de adição, ou seja, o minoxidil como titulante e o permanganato como titulado, o ponto final da titulação pode ser visualizado no momento da descoloração total da solução de permanganato de potássio. Portanto optou-se pela utilização do minoxidil como titulante e do KMnO₄ como titulado. Provavelmente pelo efeito catalítico do Mn²⁺, na decomposição do MnO₄⁻ [8].

Estudo da influência da concentração de ácido sulfúrico

Variou-se a concentração de ácido sulfúrico com o propósito de desenvolver um procedimento envolvendo a menor quantidade de ácido possível, sem deixar de considerar que a redução do KMnO₄ em meio ácido requer 8 mols do íon H⁺ para cada mol de KMnO₄ de acordo com a semi-reação apresentada anteriormente na Equação 1 [9]. O efeito da concentração de ácido sulfúrico na reação redox entre o minoxidil e permanganato de potássio foi investigado no intervalo de 0,100 a 4,00 mol L⁻¹. Para valores de concentração menores que 2,00 mol L⁻¹ de ácido sulfúrico formava-se, preferencialmente, MnO₂ marcado pela formação de um precipitado marrom indicando que a reação não ocorreu como esperado, com a conversão do MnO₄⁻ em Mn²⁺ [23]. Portanto, a concentração mínima de ácido sulfúrico foi de 2,00 mol L⁻¹ para a reação redox entre o minoxidil e permanganato de potássio.

Estudo da influência das concentrações de minoxidil e de permanganato de potássio

As concentrações de minoxidil e de KMnO₄ foram variadas no sentido de se poder trabalhar com amostras mais diluídas quanto possível. Entretanto, concentrações significativamente diferentes de 1,00 X 10⁻² mol L⁻¹ de minoxidil e 2,00 X 10⁻² mol L⁻¹ de permanganato de potássio, também provocaram a formação de MnO₂. Portanto, as concentrações selecionadas se situaram em torno daquelas apresentadas acima tanto para o minoxidil, quanto para o permanganato de potássio. Essas concentrações coincidem com as recomendadas para a padronização do KMnO₄ [23], com o oxalato de sódio em meio ácido.

Estudo da influência da temperatura na reação redox

Por questões relacionadas à cinética de redução do MnO₄⁻, recomenda-se o uso de temperaturas maiores que a ambiente nas reações com este íon. [23], Neste estudo, avaliou-se o tempo decorrido para o consumo do KMnO₄ pela adição

dos 90 % do volume do ponto de equivalência para a solução de minoxidil recomendado para o início da titulação. Os resultados são apresentados na Figura 2, que representa a variação do tempo gasto na titulação, em função da temperatura do sistema.

Sousa *et al.* Figura 2

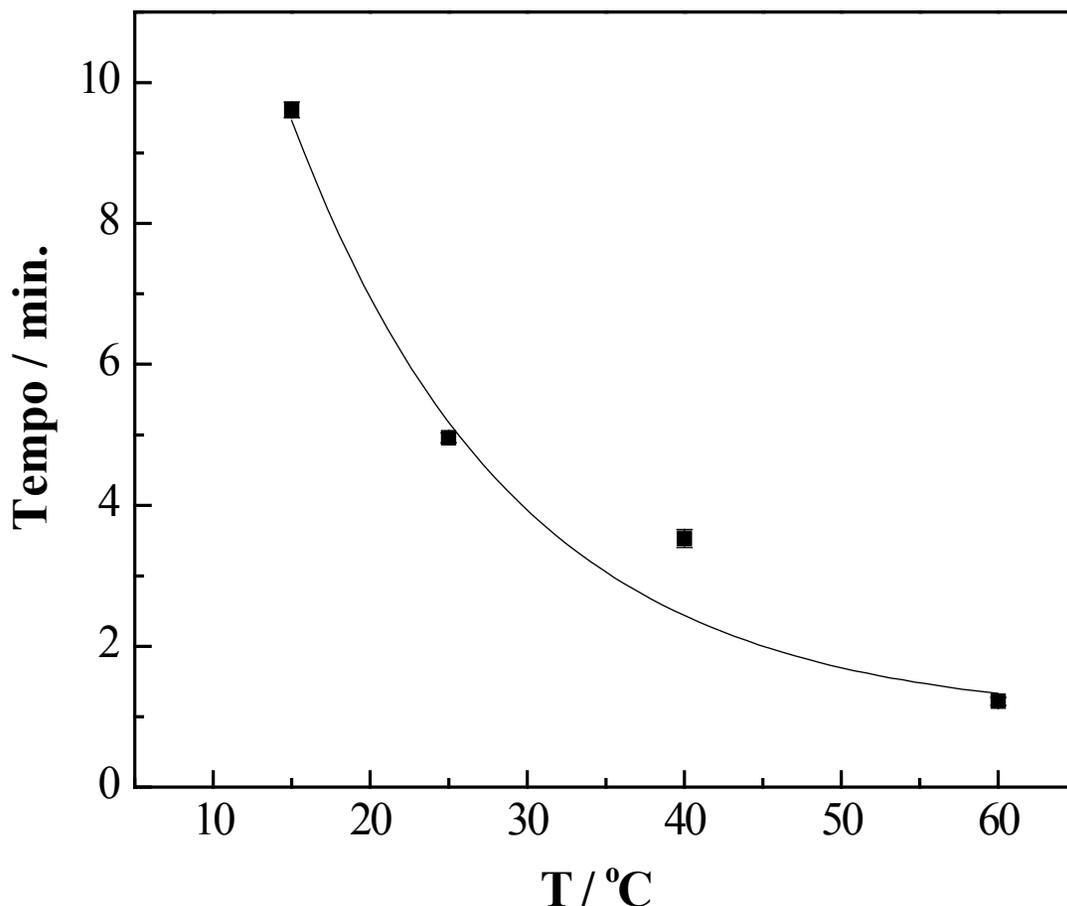


Figura 2: Variação do tempo para consumir 90% de MnO_4^- necessário para o ponto final, em função da temperatura do sistema. Cada ponto representa a média, de três determinações.

Volume de $KMnO_4 = 5,00$ mL;
 $[KMnO_4] = 2,13 \times 10^{-2}$ mol L^{-1} e
 $[minoxidil] = 1,05 \times 10^{-2}$ mol L^{-1}

Observou-se que, em temperaturas maiores do que 60°C, houve a formação de MnO_2 e, portanto, considerou-se esta como a temperatura limite para que não haja a formação do óxido de manganês. Por outro lado, observou-se que titulações realizadas com as mesmas soluções de titulante e titulante, porém em temperaturas menores que

60°C, apresentaram pontos de equivalência muito próximos entre si, isto é, a temperatura não influencia no ponto final da titulação, mas tem influência no tempo necessário para se consumir 90% do titulante: quanto maior a temperatura mais rápida a reação, com limite de 60°C.

Considerando-se o menor tempo experimental, selecionou-se a temperatura de 60°C para os estudos posteriores.

Estudo da repetibilidade

Avaliou-se a repetibilidade dos resultados titulando-se o padrão de permanganato com uma solução padrão de minoxidil por dez vezes consecutivas. Os resultados são apresentados na Tabela 1 e mostram uma repetibilidade de $6,0 \pm 0,1$ mL para o ponto final, considerando-se os resultados das 10 determinações consecutivas, com erro relativo da ordem de 1%, considerando-se as concentrações padronizadas dos reagentes.

Tabela 1: Resultados obtidos no estudo da repetibilidade do método titrimétrico com $KMnO_4$

Replicata	Volume do ponto final / mL
1	6,10
2	6,10
3	5,90
4	5,95
5	6,10
6	6,05
7	6,05
8	5,85
9	5,95
10	6,15
Média	$6,0 \pm 0,1$ (n = 10)

Ponto de equivalência calculado = 5,96 mL;

Erro % = [(média – calculado) / calculado].100 = 1,01 %;

Volume de $KMnO_4$ = 5,00 mL;

$[KMnO_4]$ = $2,13 \times 10^{-2}$ mol L⁻¹ e

$[minoxidil]$ = $1,05 \times 10^{-2}$ mol L⁻¹

Análise das amostras comerciais

Após a otimização do sistema e o estudo repetibilidade, aplicou-se o método desenvolvido em duas formulações farmacêuticas contendo minoxidil (*Neoxidil*[®] e *Regaine*[®]) para uso tópico. Investigou-se a provável interferência do etanol e do propilenoglicol, presentes como veículo nas formulações farmacêuticas [24,25]. Os grupos hidroxila presentes no etanol e no propilenoglicol poderiam ser oxidados pelo permanganato de potássio. Portanto, amostras foram tituladas na presença do veículo e após a extração do mesmo o mesmo, para comparação.

A preparação das amostras das quais não foi extraído o veículo, consistiu na simples diluição de um volume exato da solução tópica em ácido sulfúrico 2,00 mol L⁻¹, suficiente para atingir a concentração de $1,00 \times 10^{-2}$ mol L⁻¹.

A extração do veículo das formulações farmacêuticas consistiu na retirada do máximo de etanol contido em um volume conhecido de amostra com auxílio de um evaporador rotatório a 70 °C com pressão reduzida. Nessa etapa, o propilenoglicol (ponto de ebulição = 187,2 °C) não é eliminado, devido a seu ponto de ebulição, formou-se uma mistura viscosa de minoxidil e propilenoglicol à qual adicionou-se acetona para

a precipitação do minoxidil. O minoxidil foi separado por filtração a vácuo, utilizando-se um funil com uma placa sinterizada. Secou-se o precipitado em estufa a aproximadamente 60 °C por 30 minutos o qual foi diluído em ácido sulfúrico 2,00 mol L⁻¹, obtendo-se a solução de trabalho.

Comparando-se os pontos finais das titulações das amostras sem extração ou com extração do veículo, verificou-se que o etanol e propilenoglicol contidos nos fármacos não interferiram no método de determinação proposto para o minoxidil (Tabela 2), já que os resultados concordam entre si em 95% de confiança de acordo com o teste t-Student [26]. Isto pode ser explicado pela maior facilidade de oxidação do álcool em meio básico, segundo Solomons [27]. No presente procedimento, usando meio ácido, a oxidação do etanol ocorreria com maior lentidão

Tabela 2: Comparação entre os pontos finais das titulações das amostras com e sem extração do veículo

Amostras	Com extração do veículo / ml*	Sem extração do veículo / mL*
Neoxidil®	19,5± 0,03	19,2 ± 0,12
Regaine®	19,6± 0,01	19,8 ± 0,13

* média ± desvio padrão, n = 3

Portanto decidiu-se analisar a amostras comerciais sem a extração do veículo, devido a maior simplicidade e rapidez do procedimento.

Seguindo os parâmetros definidos nos estudos de otimização do método proposto para a determinação de minoxidil, as amostras comerciais, *Neoxidil*® e *Regaine*®, foram analisadas e os resultados são apresentados na Tabela 3.

Tabela 3: Resultados obtidos na análise da amostra usando o método proposto, comparados com os valores rotulados e aqueles obtidos com o método comparativo

Amostras	Rótulo ^a	Titulação ^b	Comparativo ^b	E1 / % ^c	E2 / % ^d
Neoxidil®	20,0	19,2 ± 0,12	19,4 ± 0,41	-4,00	-1,03
Regaine®	20,0	19,8 ± 0,13	20,9 ± 0,47	-1,00	-5,26

a – valores dados em mg mL⁻¹

b – valores dados em mg mL⁻¹ ± desvio padrão, n = 3

c – erros relativos ao rótulo

d – erros relativos ao método comparativo

Os resultados obtidos (Tabela 3) pelo método proposto se mostraram coerentes com os valores rotulados das amostras comerciais e com o método comparativo. Os resultados obtidos pelo método proposto concordam com os valores rotulados das amostras comerciais em 99,9 % de confiança e concordam em 90,0 % de confiança com o método comparativo, usando o teste t-Student [26].

Teste de adição e recuperação

A exatidão do método proposto foi avaliada pelo teste de adição e recuperação, observando-se recuperação entre 94,5 % para o *Neoxidil*®, 95,2 % *Regaine*®.

Conclusões

A determinação titrimétrica de minoxidil em formulações farmacêuticas usando KMnO₄ mostrou-se um método de aplicação simples e de

baixo custo. Os valores de concentração de minoxidil obtidos pelo método proposto foram concordantes tanto quanto ao rótulo e tanto quanto ao método comparativo. Portanto, conclui-se que o método aqui proposto é eficiente na determinação de minoxidil em amostras comerciais, dentro das limitações de um procedimento volumétrico clássico.

O método pode ser útil para a determinação e controle de qualidade, em farmácias de manipulação e laboratórios

que não disponham de equipamentos mais sofisticados, quando aplicado em amostras com concentrações relativamente elevadas como as formulações farmacêuticas de uso tópico e/ou comprimidos contendo minoxidil.

Determination Of Minoxidil In Pharmaceutical Formulations Using A Permanganometric Titrimetric Procedure

ABSTRACT: A titrimetric procedure for the determination of minoxidil using KMnO_4 as oxidizing agent is described. The best conditions were optimized considering the H_2SO_4 , KMnO_4 and minoxidil concentrations, the temperature of the system and the order of addition of the reactants. The method was applied to commercial samples and compared with the results from a standard chromatographic procedure. Recoveries from 94.5 to 95.2 % were observed depending on the sample. Comparison with the chromatographic procedure revealed relative errors of -1.00 to - 5.26 %. The method was relatively fast, easy to perform and can be a low cost alternative for pharmaceutical samples in which minoxidil concentration is relatively high..

KEYWORDS: Minoxidil determination; titration; potassium permanganate.

Referências Bibliográficas

- [1] S. S. Budavari, M.J. O'Neil, A. Smith, P.E. Heckelman, J.F. Kinneary, The Merck Index, 13th, Merck & Company Incorporated, Whitehouse Station, New Jersey, 2001, 6229p.
- [2] Medina, A. R.; Córdova, M. L. F.; Molina-Díaz, A., "Integrated flow injection-solid phase spectrophotometric determination of minoxidil". *Talanta*, 50: 277, 1999
- [3] Han, J. H.; Kwon, O. S.; Chung, J. H.; Cho, K. H.; Eun, H. C.; Kim, K. H. "Expression of androgen receptor, estrogen receptor alpha and beta in the dermal papilla of human hair follicles in vivo". *J. Dermatol. Science*, 36 (3): 176, 2004
- [4] Nobre, F.; Lima, N.K.C. "Hipertensão arterial: conceito, classificação e critérios diagnósticos". *in manual de cardiologia SOCESP*, Atheneu, São Paulo, 2000.
- [5] Mano, R. "Manual de hipertensão arterial". Mano, Ladário, 2002
- [6] <http://www.tuotromedico.com/temas/hipertension.htm>, consultado em abril de 2005
- [7] Kapln, N.M. Systemic hypertension: mechanism and diagnosis. "In Heart disease" BRANWALD, E.; Zipes, D.P.; Libby, P (eds.). 6th Ed., saunders, Philadelphia, 2001.
- [8] Latufo, P.A.; Lolio, C.A. "Epidemiologia da Hipertensão Arterial no Brasil". *In SOCESP Cardiologia*, Vol. 2, Atheneu, São Paulo, 1996.
- [9] Jeffery, G.H.; Bassett, J.; Mendham, J.; Denney, R.C.; Vogel. *Análise Química Quantitativa*; quinta edição; 260; LTC Ltda.; 1992.
- [10] W. Misiuk, H. Puzanowska-Tarasiewicz, *Anal. Lett.*, 35 (2002) 1163-1170.
- [11] Jeffery, G.H.; Bassett, J.; Mendham, J.; Denney, R.C.; Vogel. *Análise Química Qualitativa*; quinta edição; 396; LTC Ltda.; 1992.
- [12] Jeffery, G.H.; Bassett, J.; Mendham, J.; Denney, R.C.; Vogel. *Análise Química Quantitativa*; quinta edição; 168; LTC Ltda.; 1992.
- [13] Terra, J.; Rossi, A. V. "Sobre o desenvolvimento da análise volumétrica e algumas aplicações atuais". *Quim. Nova*, 28 (1): 166, 2005
- [13] Página da internet acessada no dia 03/08/2008: <http://www.eoma.aoac.org/methods/result.asp?string=b>
- [15] Página da internet acessada no dia 03/08/2008: <http://www.eoma.aoac.org/methods/result.asp?string=b>
- [16] Amankwa, L.; Chatten, L.G.; Pons, S.; "Electrochemical studies on minoxidil and determination in tablets by differential-pulse polarography" *Analyst*, 108: 1221, 1983.
- [17] Pfaffen, V.; Ortiz, P.I.; "Electrochemical determination of minoxidil in different Pharmaceutical formulations by flow injection analysis". *Analytical Sciences*, 22: 91, 2006
- [18] Ruiz-Medina, A.; Fernandez-de Cordova, M.L.; Molina-Díaz, A.; "Integrated flow injection-solid phase spectrophotometric determination of minoxidil". *Talanta*, 50 (2): 277, 1999.

- [19] Zarghi, A.; Shafaati, A.; Foroutan, S.M.; Khoddam, A.; "Rapid determination of minoxidil in human plasma using ion-pair HPLC". *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **36**: 377, 2004.
- [20] Fanali, S.; Cristalli, M.; Catellani, P.; "Determination of minoxidil in pharmaceutical forms by capillary isotachopheresis". *J. Chromatogr. A*, **405**: 385, 1987.
- [21] Zarghi, A.; Jenabi, M.; Ebrahimian, A. J. "HPLC determination of the tretonoin-minoxidil solution" *Pharm. Acta Helvet.*, **73**: 163, 1998.
- [22] Sousa, R. A.; Semaan, F.S.; Fragali, J.A.B.; Cavalheiro E.T.G.; "Fast Determination of Minoxidil by Photometric Flow Titration". *Eclética Química*, **30** (3): 79, 2005.
- [23] Jeffery, G.H.; Bassett, J.; Mendham, J.; Denney, R.C.; Vogel. *Análise Química Quantitativa*; quinta edição; 268; LTC Ltda. 1992
- [24] Karlberg, B.; Pacey, G.E. *Flow Injection Analysis: A Practical Guide*. Elsevier, Amsterdam, 1989.
- [25] Zhong, W. Z. *et al*, Quantitative analysis of 2-n-nonyl-1,3-dioxolane by stable-isotope dilution gas chromatography mass spectrometry. *J. Chromatogr. B*, **705**: 39, 1998.
- [26] Harris, D.C. *Análise Química Quantitativa*, quinta edição, p. 61, LTC – Livros técnicos e Científicos Editora AS, 2001.