

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALFENAS

THÚLIO WLIANDON LEMOS BARBOSA

**ESTUDOS QUÍMICO-FARMACÊUTICOS DE FORMAS SÓLIDAS DE
ALOPURINOL**

Alfenas/MG

2019

THÚLIO WLIANDON LEMOS BARBOSA

**ESTUDOS QUÍMICO-FARMACÊUTICOS DE FORMAS SÓLIDAS DE
ALOPURINOL**

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Alfenas.

Orientador: Prof. Dr. Rudy Bonfilio.

Co-orientador: Prof. Dr. Antônio Carlos Doriguetto

Alfenas/MG

2019

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)
Sistema de Bibliotecas da Universidade Federal de Alfenas

B238e Barbosa, Thúlio Wliandon Lemos.
Estudos químico-farmacêuticos de formas sólidas de alopurinol / Thúlio
Wliandon Lemos Barbosa -- Alfenas/MG, 2019.
102 f. : il. --

Orientador: Rudy Bonfilio
Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade
Federal de Alfenas, 2019.
Bibliografia.

1. Alopurinol. 2. Solubilidade. 3. Dissolução. 4. Estabilidade de
Medicamentos. I. Bonfilio, Rudy. II. Título.

CDD-615.19

THÚLIO WLIANDON LEMOS BARBOSA

"ESTUDOS QUÍMICO-FARMACÉUTICOS DE FORMAS SÓLIDAS DE ALOPURINOL"

A Banca examinadora, abaixo assinada, aprova a Dissertação apresentada como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacéuticas pela Universidade Federal de Alfenas.

Aprovado em: 18/12/2019

Prof. Dr. Rudy Bonfílio
Instituição: UNIFAL-MG

Assinatura: 

Prof. Dr. Christian Fernandes
Instituição: UFMG

Assinatura: 

Profa. Dra. Gislaíne Ribeiro Pereira
Instituição: UNIFAL-MG

Assinatura: 

Dedico essa dissertação a minha vó Nair, que sempre foi um exemplo de força e dedicação; e a todos que de alguma forma me apoiaram ou participaram desta conquista.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por me dar forças para conseguir completar mais essa etapa.

À minha família, principalmente minha mãe, Cleide, que amo tanto e que sempre me apoiou nas escolhas que faço. Às minhas tias, Ner e Nair, que sempre me acolheram quando mais precisava. E ao meu parceiro, Rodrigo Martins, que desde o começo do meu mestrado sempre esteve ao meu lado nos momentos bons e ruins.

Um agradecimento especial ao meu orientador, professor Dr. Rudy Bonfilio, pela parceria, paciência, e todo conhecimento que tem compartilhado comigo.

Agradeço aos meus professores, professora Dra. Magali Benjamim de Araújo pelo acolhimento no laboratório, co-orientador professor Dr. Antônio Carlos Doriguetto pelo auxílio nas pesquisas e professora Dr. Lilian Pereira Franco pela amizade e companheirismo.

Às professoras Dra. Gislaine Ribeiro Pereira e Dra. Jeniffer Jacon Freitas pelas contribuições que deram ao trabalho.

Aos alunos Rafaella Talmeli, Ataislaine Batista, Homero Junior, Rayssa Araújo, Marillia Toti e Maria Teresa, pela amizade e auxílio na realização desse mestrado e a toda equipe do Laboratório Núcleo de Controle de Qualidade da Unifal-MG.

À Universidade Federal de Alfenas, em especial à Faculdade de Ciências Farmacêuticas e ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Unifal-MG.

Aos órgãos de fomento CNPq pela bolsa, CAPES pelo financiamento ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Fapemig e Finep pela contribuição financeira.

E a todos que participaram de alguma forma desta conquista.

RESUMO

O alopurinol ($C_5H_4N_4O$) é um ingrediente farmacêutico ativo (IFA) amplamente utilizado no tratamento de hiperuricemia e gota. É um fármaco classificado como classe IV pelo Sistema de Classificação Biofarmacêutica (SCB). Atualmente, existem descrições de três formas sólidas cristalinas do alopurinol no banco de dados da *Cambridge*: base livre (ALOBL), cloridrato de alopurinol (ALOCL) e hemissulfato de alopurinol. Considerando que cada forma sólida de um IFA pode exibir propriedades físico-químicas particulares, estudos em IFAs sobre os efeitos de variações no estado sólido na qualidade de matérias-primas e medicamentos são de grande relevância. Sendo assim, o objetivo principal desse trabalho foi obter pelo menos uma forma sólida de alopurinol diferente da forma comercializada e realizar estudos de caracterização, estabilidade acelerada, solubilidade e dissolução intrínseca. Para os estudos envolvendo análises quantitativas, um método por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) indicativo de estabilidade foi otimizado e validado. Os estudos de validação mostraram que todos os parâmetros atenderam a resolução RDC da ANVISA 166 de 2017. ALOBL foi identificado em matérias-primas e ALOCL foi obtido a partir de processos de recristalização de ALOBL em ácido clorídrico $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$. Os resultados de caracterização por espectroscopia na região do infravermelho (IV), difração de raios-X por policristais (DRXP), calorimetria exploratória diferencial (DSC) e termogravimetria (TG) demonstraram que todas as técnicas são eficazes para diferenciação das formas estudadas. Os estudos de solubilidade demonstraram que ALOCL é mais solúvel que ALOBL a $37 \text{ }^\circ\text{C}$ nos meios de pH 4,5 e 5,4 após 48 horas de estudo. Entretanto, a solubilidade das duas formas se igualou após 72 horas, devido à conversão de ALOCL em ALOBL durante os estudos de solubilidade. Os estudos de dissolução intrínseca revelaram que ALOCL apresentou menor taxa de dissolução do que ALOBL em pH 1,2, devido ao efeito de íon comum. Os estudos de estabilidade acelerada revelaram que ALOCL se converte parcialmente em ALOBL no período de 6 meses sob as condições descritas. Considerando que alguns métodos de síntese e purificação de alopurinol descritos na literatura utilizam ácido clorídrico, verifica-se a possibilidade de formação de ALOCL em matérias-primas. Sendo assim, este trabalho contribuiu para o entendimento de importantes aspectos relacionados à qualidade do alopurinol. Portanto, estudos químico-farmacêuticos em diferentes formas sólidas de um IFA são de grande relevância para assegurar a qualidade de fármacos e medicamentos.

Palavras-chave: Cloridrato de alopurinol. Solubilidade. Dissolução intrínseca. Estabilidade acelerada.

ABSTRACT

Allopurinol ($C_5H_4N_4O$) is an active pharmaceutical ingredient (API) widely used in the treatment of hyperuricemia and gout. It is a drug classified as class IV in the biopharmaceutics classification system (BCS). There are descriptions of three crystalline solid forms of allopurinol in the Cambridge database: freebase (ALOBL), allopurinol hydrochloride (ALOCL) and allopurinol hemisulfate. Since each solid form of an IFA can exhibit particular physicochemical properties, studies in IFAs about the effects of solid state variations on the quality of raw materials and medicines are of great relevance. Thus, the main objective of this work was to obtain at least one solid form of allopurinol different from the commercialized form and to perform characterization, accelerated stability, solubility and intrinsic dissolution studies. For studies involving quantitative analysis, a stability-indicating high performance liquid chromatography (HPLC) method was optimized and validated. Validation studies showed that all parameters meet ANVISA resolution RDC no. 166/2017. ALOBL has been identified in the raw materials and ALOCL was obtained from recrystallization of ALOBL in 0.1 mol.L^{-1} hydrochloric acid. The results of characterization by infrared spectroscopy (IR), X-ray powder diffraction (XRPD), differential scanning calorimetry (DSC) and thermogravimetric analysis (TGA) showed that the techniques are effective for differentiation of the studied forms. Solubility studies have shown that ALOCL is more soluble than ALOBL at 37°C in pH 4.5 and 5.4 media after 48 hours of study. However, the solubility of both forms was equal after 72 hours probably due to the conversion of ALOCL to ALOBL. Intrinsic dissolution studies revealed that ALOCL showed lower dissolution rate than ALOBL at pH 1.2 due to the common ion effect. Accelerated stability studies have shown that ALOCL partially converts to ALOBL after conditioning up 6 months under described conditions. Considering that some methods for synthesis and purification of allopurinol described in the literature use hydrochloric acid, there is a possibility of formation of ALOCL in raw materials. Thus, this work contributed to the understanding of important aspects related to the quality of allopurinol. Therefore, chemical and pharmaceutical studies of different solid forms of an IFA are of great relevance for ensuring the quality of drugs and medicines.

Keywords: Allopurinol hydrochloride. Solubility. Intrinsic dissolution. Accelerated stability.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 –	Estrutura química do alopurinol	17
Figura 2 –	Estrutura do alopurinol e suas impurezas	18
Figura 3 –	pKas e estruturas tautoméricas do alopurinol.	19
Figura 4 –	Representação das interações intermoleculares das estruturas cristalinas...	20
Figura 5 –	Espectros de absorção de soluções padrões de alopurinol SQR a 10 ug.mL ⁻¹ e 20 ug.mL ⁻¹ no intervalo de 200 a 400 nm.	49
Figura 6 –	Cromatograma de alopurinol SQR com detecção em 250 nm.	50
Figura 7 –	Espectros de varredura das soluções padrões de Alopurinol a 10 µg.mL ⁻¹ e 20 µg.mL ⁻¹ e de soluções de degradação do fármaco em HCl 5 mol.L ⁻¹ (10 µg.mL ⁻¹), NaOH 5 mol.L ⁻¹ (10 µg.mL ⁻¹), NaOH 5 mol.L ⁻¹ (20 µg.mL ⁻¹) e H2O2 10 % (10 µg.mL ⁻¹).	51
Figura 8 –	Espectros de absorção das soluções padrões de alopurinol a 10 µg.mL ⁻¹ e 20 µg.mL ⁻¹ , em relação às soluções de amido (10 µg.mL ⁻¹), estearato de magnésio (20 µg.mL ⁻¹) e lactose (20 µg.mL ⁻¹).	52
Figura 9 –	Gráfico de resposta do alopurinol em ampla faixa de concentração	56
Figura 10 –	Gráfico de linearidade em 230 nm na faixa de concentração de 8 a 24 µg.mL ⁻¹	58
Figura 11 –	Gráfico de linearidade em 250 nm na faixa de concentração de 8 a 24 µg.mL ⁻¹	58
Figura 12 –	Gráfico de dispersão dos resíduos a partir dos resultados em 230 nm.	59
Figura 13 –	Gráfico de dispersão dos resíduos a partir dos resultados em 250 nm.....	59
Figura 14 –	Difratogramas experimentais das tentativas de obtenção de formas sólidas de alopurinol em comparação com padrões de difração calculados para alopurinol forma anidra (PRUSINER, SUNDARALINGAM, 1972) e cloridrato de alopurinol (SHELDRICK; BELL, 1987a; SHELDRICK; BELL, 1987b).	67
Figura 15 –	Difratogramas experimentais de alopurinol matéria-prima e cloridrato de alopurinol obtido por processo de recristalização, em comparação com padrões de difração calculados para alopurinol base livre (PRUSINER; SUNDARALINGAM, 1972) e cloridrato de alopurinol (SHELDRICK; BELL, 1987b).	68
Figura 16 –	Espectros de IV de ALOBL (preto) e do ALOCL (vermelho).	69

Figura 17 –	Curvas de DSC de ALOBL (preto) e de ALOCL (vermelho).	71
Figura 18 –	Curvas de TG de ALOBL (preto) e ALOCL (vermelho).	72
Figura 19 –	Difratogramas experimentais de amostras de ALOCL após aquecimento a 60, 105 e 250 °C, comparados aos padrões de difração calculados para ALOBL (PRUSINER; SUNDARALINGAM, 1972) e ALOCL (SHELDRIK; BELL, 1987b)	73
Figura 20 –	Difratogramas do ensaio de estabilidade acelerada. ALOBL (calculado): padrão de difração calculado para a forma anidra de alopurinol; ALOCL (calculado): padrão de difração calculado para cloridrato de alopurinol; ALOBL - início: ALOBL experimental analisado no tempo 0; ALOBL - 3 meses: ALOBL experimental analisado no tempo 3 meses; ALOBL - 6 meses: ALOBL experimental analisado no tempo 3 meses.	75
Figura 21 –	Difratogramas do ensaio de estabilidade acelerada. ALOBL (calculado): padrão de difração calculado para a forma anidra de alopurinol; ALOCL (calculado): padrão de difração calculado para cloridrato de alopurinol; ALOCL - início: ALOCL experimental analisado no tempo 0; ALOCL - 3 meses: ALOCL experimental analisado no tempo 3 meses; ALOCL – 6 meses: ALOBL experimental analisado no tempo 3 meses.....	76
Figura 22 –	Solubilidade de ALOBL e ALOCL a 25 °C e 48 horas (n=3).	78
Figura 23 –	Solubilidade do alopurinol a 37 °C e 48 horas para os meios com pH em 3,4, 4,5, 5,4 e H ₂ O (n=3), e 72 horas para os meios com pH 1,2 e 6,8 (n=3).	81
Figura 24 –	Difratogramas experimentais de pós remanescentes após ensaios de solubilidade a 37 °C das amostras ALOBL em pH 1,2 (3), 3,4 (4), 4,5 (5), 5,4 (6), 6,8 (7) e em água (8), e ALOCL em pH 1,2 (9), 3,4 (10), 4,5 (11), 5,4 (12), 6,8 (13) e em água (14), em comparação com padrões de difração calculados para a forma anidra de alopurinol (1) (PRUSINER; SUNDARALINGAM; 1972) e cloridrato de alopurinol (2) (SHELDRIK; BELL; 1987a; SHELDRIK; BELL; 1987b).	82
Figura 25 –	Comparação da solubilidade das formas sólidas coletadas nos tempos de 24, 48 e 72 horas a 37 °C (n=3).	83
Figura 26 –	Diagramas de Pareto (n = 2 ²) para otimização de condições de ensaios de dissolução.	87
Figura 27 –	Estudo de comparação de dissolução intrínseca de ALOBL (n=3) entre os	

	pHs 1,2 (azul), 4,5 (laranja) e 6,8 (cinza).....	88
Figura 28 –	Estudos de dissolução intrínseca (n=3) de ALOBL (azul) e ALOCL laranja) em meio pH 1,2.....	89
Figura 29 –	Estudos de dissolução intrínseca (n=3) de ALOBL (azul) e ALOCL (vermelho) em meio pH 4,5.....	89
Figura 30 –	Estudos de dissolução intrínseca (n=3) de ALOBL (azul) e ALOCL (vermelho) em pH 6,8.....	90
Figura 31 –	Difratogramas experimentais de pós remanescentes de ALOBL e ALOCL após experimentos de dissolução intrínseca	91

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 –	Percentagens aceitáveis de Desvio Padrão Relativo (DPR).	27
Tabela 2 –	Percentagens de recuperação aceitáveis, dependendo da concentração do analito	28
Tabela 3 –	Parâmetros cromatográficos do método desenvolvido para análise de alopurinol na presença de produtos de degradação e excipientes.	53
Tabela 4 –	Estudo de seletividade pela recuperação do alopurinol em presença de produtos de degradação (A) e matriz de excipientes (B)	54
Tabela 5 –	Pureza do pico do alopurinol frente aos produtos de degradação.....	55
Tabela 6 –	Diferentes intervalos de linearidade do alopurinol.	57
Tabela 7 –	Áreas obtidas em função das concentrações no estudo de linearidade.	57
Tabela 8 –	Resultados da estatística de regressão a partir da curva de linearidade em 230 nm	59
Tabela 9 –	Resultados da estatística de regressão a partir da curva de linearidade em 230 nm	59
Tabela 10 –	Análise de variância da curva de linearidade para análise em 230 nm e 250 nm	60
Tabela 11 –	Estudo de efeito matriz em 230nm.	62
Tabela 12 –	Estudo de efeito matriz em 250 nm.	62
Tabela 13 –	Resultados de precisão e exatidão	63
Tabela 14 –	Condições e resultados dos ensaios de robustez em porcentagem de recuperação	65
Tabela 15 –	Principais bandas de absorção na região do infravermelho de ALOBL e ALOCL	70
Tabela 16 –	Valores médios de teor de ALOMP e ALOCL	74
Tabela 17 –	Resultados de doseamento de ALOBL E ALOCL nos tempos 0, 3 e 6 meses	77
Tabela 18 –	Resultados de solubilidade no equilíbrio de ALOBL e ALOCL a 25°C nos tempos 24, 48 e 72 horas	77
Tabela 19 –	Comparação estatística (ANOVA seguida de TUKEY) entre as médias de solubilidade nos tempos de 24, 48 e 72 horas para cada forma estudada	

	em cada meio.	78
Tabela 20 –	Resultados de solubilidade no equilíbrio de ALOBL e ALOCL a 37 °C nos tempos de 24, 48 e 72 horas	80
Tabela 21 –	Comparação estatística (ANOVA seguida de Tukey) entre as médias de solubilidade nos tempos de 24, 48 e 72 horas a 37 °C para cada forma estudada em cada meio	80
Tabela 22 –	Fatores e níveis estudados para otimização de condições para ensaio de dissolução intrínseca	84
Tabela 23 –	Otimização de condições para ensaio de dissolução intrínseca	84
Tabela 24 –	Resultados de dissolução intrínseca de ALOBL em meio pH 1,2	85
Tabela 25 –	Resultados de dissolução intrínseca de ALOBL em meio pH 4,5	85
Tabela 26 –	Resultados de dissolução intrínseca de ALOBL em meio pH 6,8	86
Tabela 27 –	Comparação de IDRs de ALOBL e ALOCL em pH 6,8	91

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- ALOB_L – Alopurinol base livre
- ALOC_L – Cloridrato de alopurinol
- ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária
- CLAE – Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
- DRXP – Difração de raios-X por policristais
- DSC – Calorimetria exploratória diferencial
- DPR – Desvio padrão relativo
- IFA – Ingrediente Farmacêutico Ativo
- IV – Infravermelho
- RDC – Resolução da Diretoria Colegiada
- BCS – Sistema de Classificação Biofarmacêutica
- SQR – Substância Química de Referência
- TG – Termogravimetria
- VDI – Velocidade de Dissolução Intrínseca

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	15
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	17
2.1	ALOPURINOL	17
2.2	DESENVOLVIMENTO E OTIMIZAÇÃO DE MÉTODOS	21
2.3	VALIDAÇÃO DE METODOS ANALÍTICOS.....	23
2.3.1	Seletividade	24
2.3.2	Linearidade	24
2.3.3	Efeito Matriz	25
2.3.4	Faixa de Trabalho.....	25
2.3.5	Precisão.....	26
2.3.6	Exatidão.....	27
2.3.7	Limite de detecção	29
2.3.8	Limite de Quantificação.....	29
2.3.9	Robustez	30
2.4	VARIAÇÃO NO ESTADO SÓLIDO DE IFAs	30
2.5	ESTUDOS DE ESTABILIDADE.....	33
2.6	ESTUDOS DE SOLUBILIDADE	34
2.7	DISSOLUÇÃO INTRÍNSECA	35
3	OBJETIVOS	36
3.1	OBJETIVO GERAL	36
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	36
4	MATERIAIS E MÉTODOS.....	36
4.1	AMOSTRAS E REAGENTES.....	36
4.2	EQUIPAMENTOS.....	37
4.3	OTIMIZAÇÃO DE MÉTODO ANALÍTICO POR CLAE.....	38
4.4	VALIDAÇÃO ANALÍTICA	39
4.4.1	Seletividade	39
4.4.2	Linearidade e Faixa de trabalho	40
4.4.3	Efeito Matriz	41
4.4.4	Precisão.....	41
4.4.5	Exatidão.....	42
4.4.6	Limite de detecção	43

4.4.7	Limite de quantificação.....	43
4.4.8	Robustez	43
4.5	OBTENÇÃO DE FORMAS SÓLIDAS	44
4.6	CARACTERIZAÇÃO DE FORMAS SÓLIDAS	45
4.6.1	Difração de Raios-X por pó (DRXP).....	45
4.6.2	Espectroscopia de infravermelho (IV).....	45
4.6.3	Análises Térmicas	45
4.7	HOMOGENEIZAÇÃO DO TAMANHO DE PARTÍCULAS	46
4.8	ESTUDOS DE ESTABILIDADE ACELERADA	46
4.9	ESTUDOS DE SOLUBILIDADE	46
4.10	DISSOLUÇÃO INTRÍNSECA	47
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	48
5.1	VALIDAÇÃO ANALÍTICA	48
5.1.1	Otimização.....	48
5.1.2	Seletividade	51
5.1.3	Linearidade	56
5.1.4	Faixa de Trabalho.....	61
5.1.5	Efeito Matriz	61
5.1.6	Precisão e Exatidão.....	63
5.1.7	Limite de detecção e limite de quantificação.....	64
5.1.8	Robustez	65
5.2	OBTENÇÃO DE FORMAS SÓLIDAS DE ALOPURINOL	66
5.3	CARACTERIZAÇÃO DE FORMAS SÓLIDAS DE ALOPURINOL	67
5.3.1	Difração de Raios-X por policristais (DRXP)	68
5.3.2	Espectroscopia de Infravermelho (IV)	69
5.3.3	Análises térmicas	71
5.3.4	Doseamento	74
5.5	ESTUDO DE ESTABILIDADE ACELERADA.....	74
5.6	ESTUDO DE SOLUBILIDADE A 25 °C	77
5.7	ESTUDO DE SOLUBILIDADE A 37 °C	79
5.8	DISSOLUÇÃO INTRÍNSECA	84
6	CONCLUSÃO.....	92
	REFERÊNCIAS	95

1 INTRODUÇÃO

Vários novos ingredientes farmacêuticos ativos (IFAs) são introduzidos no mercado a cada ano (KUMAR et al., 2012). Estima-se que os estágios de descobrimento e desenvolvimento de um novo IFA levam de 8 a 12 anos e envolvem um custo total de cerca de 900 milhões a 1,7 bilhões de dólares (SWARTZ; KRULL, 2012).

Os IFAs são utilizados frequentemente no estado sólido, podendo apresentar-se em uma variedade de formas sólidas, sendo este fenômeno muito comum (MCCAULEY; VASOLONA; LEVORSE, 1993). As formas sólidas são classificadas em formas anidras, solvatos, hidratos, sais e cocristais, além das suas possíveis combinações e seus polimorfos (BRITTAİN, 2009; AITIPAMULA et al., 2012; PRADO; ROCHA, 2015). Cada forma sólida de um mesmo IFA pode exibir diferentes propriedades, tais como: higroscopicidade, forma de partículas, hábito cristalino, cor, índice de refração, densidade, ponto de fusão, granulometria, ângulo de repouso, compactabilidade, estabilidade, solubilidade e taxas de dissolução (YU; 2003; PAYGHAN et al., 2010; LEE et al., 2011; EDDLESTON et al., 2013; FREITAS et al., 2017). Portanto, a presença de uma forma sólida indesejável pode comprometer a eficácia terapêutica de um IFA (BERNSTEIN, 2002; LLINÀS et al., 2008; BRITTAİN, 2009; LI et al., 2011; LOHANI et al., 2014; SANTOS et al., 2014; FREITAS et al., 2017).

Segundo Brittain (2009), torna-se crítico determinar os limites de estabilidade para as diferentes formas e como elas podem ser interconvertidas. No mínimo, é preciso determinar qual a forma cristalina é o estado mais estável, porque, a menos que circunstâncias atenuantes ditem de outra forma, essa forma seria a escolhida para o desenvolvimento contínuo.

Diferenças significativas de solubilidade ou taxas de dissolução entre formas sólidas de um mesmo IFA podem influenciar a biodisponibilidade de um medicamento, principalmente para fármacos de baixa solubilidade, para os quais a taxa de dissolução é o fator limitante para a absorção. Consequentemente, isto pode dificultar a obtenção de bioequivalência entre formulações contendo diferentes formas sólidas (SAIFEE et al., 2009; ROSA; VILHENA, 2012).

Os sais são frequentemente utilizados em preparações medicamentosas porque geralmente possuem melhores propriedades de solubilidade em relação ao fármaco na forma livre (BERGE et al., 1977). No entanto, a solubilidade de um sal depende não apenas das propriedades da molécula, mas também dos íons que se encontram em solução (WIEDMANN; NAQWI, 2016). A obtenção de sais a partir de sua forma livre correspondente

pode ser uma alternativa para melhorar propriedades biofarmacêuticas de estabilidade, dissolução e solubilidade de um fármaco de baixa solubilidade.

O alopurinol (ALO) é um fármaco amplamente utilizado para tratar a hiperuricemia e gota, diminuindo os níveis de ácido úrico (BENN et al., 2018). É comercializado principalmente na forma de comprimidos e é classificado como Classe IV de acordo com o Sistema de Classificação Biofarmacêutica (BCS) (baixa solubilidade e baixa permeabilidade) ("BCS Database Search", [s.d.]).

Atualmente, existem descrições de três formas sólidas cristalinas do alopurinol: base livre (ALOB) (PRUSINER; SUNDARALINGAM, 1972), cloridrato de alopurinol (ALOC) (SHELDRIK; BELL, 1987a; SHELDRIK; BELL, 1987b) e hemissulfato de alopurinol (RAVINDRA; PANPALIA; SARMA, 2008), além de inúmeras estruturas metalo-orgânicas.

Alguns métodos de síntese e purificação de alopurinol descritos na literatura utilizam ácido clorídrico, principalmente nas etapas de purificação do composto em meio ácido (LONG, 2011; HAIFENG; JIANFENG; XIAOXIA, 2013; HUI et al.; 2015; YINGBO et al., 2017). Sendo assim, a utilização de ácido clorídrico pode promover a formação do cloridrato de alopurinol em matérias primas.

Para análise de um fármaco, um aspecto fundamental a ser considerado desde as fases iniciais do desenvolvimento é o uso de métodos analíticos adequados (SWARTZ; KRULL, 2012). Métodos analíticos são utilizados para auxiliar o processo de síntese de novos fármacos, avaliar o potencial de candidatos a medicamentos, apoiar estudos de formulação, monitorar a estabilidade de produtos farmacêuticos e testar os produtos para liberação (SHRIVASTAVA; GUPTA, 2011). Portanto, verifica-se que as etapas de desenvolvimento, otimização e validação de métodos analíticos são fundamentais para garantir a qualidade de fármacos e medicamentos, demonstrando a importância de pesquisas nessa área.

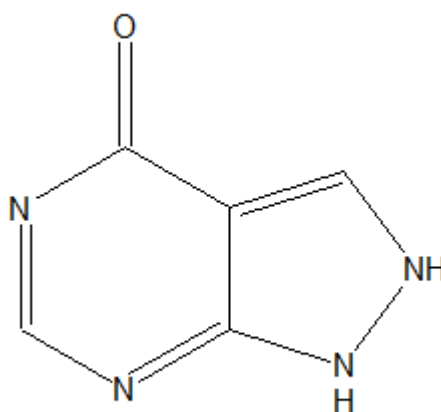
Até o presente momento, não foram encontrados trabalhos sobre os possíveis efeitos de diferentes formas sólidas do alopurinol na qualidade físico-química de fármacos e medicamentos, através de estudos de caracterização, estabilidade, solubilidade e dissolução intrínseca, apontando para perspectivas de pesquisas nessa área. Para atingir tais objetivos, a utilização de um método analítico adequadamente desenvolvido, otimizado e validado torna-se imprescindível.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 ALOPURINOL

O alopurinol (figura 1), 1,5-dihidro-4-H-pirazol-[3,4-d]pirimidin-4-ona, foi licenciado em 1966 pelo FDA para tratamento da hiperuricemia. Embora tenha sido criado inicialmente como agente antineoplásico, sua capacidade de reduzir os níveis séricos de ácido úrico levou ao seu uso para o tratamento de gota e hiperuricemia. Seu mecanismo de ação se deve à inibição da enzima xantina oxidase, inibindo assim a formação de ácido úrico (KELKAR; KUO; FRISHMAN, 2011).

Figura 1 – Estrutura química do alopurinol



Fonte: adaptado da farmacopeia USP (2017)

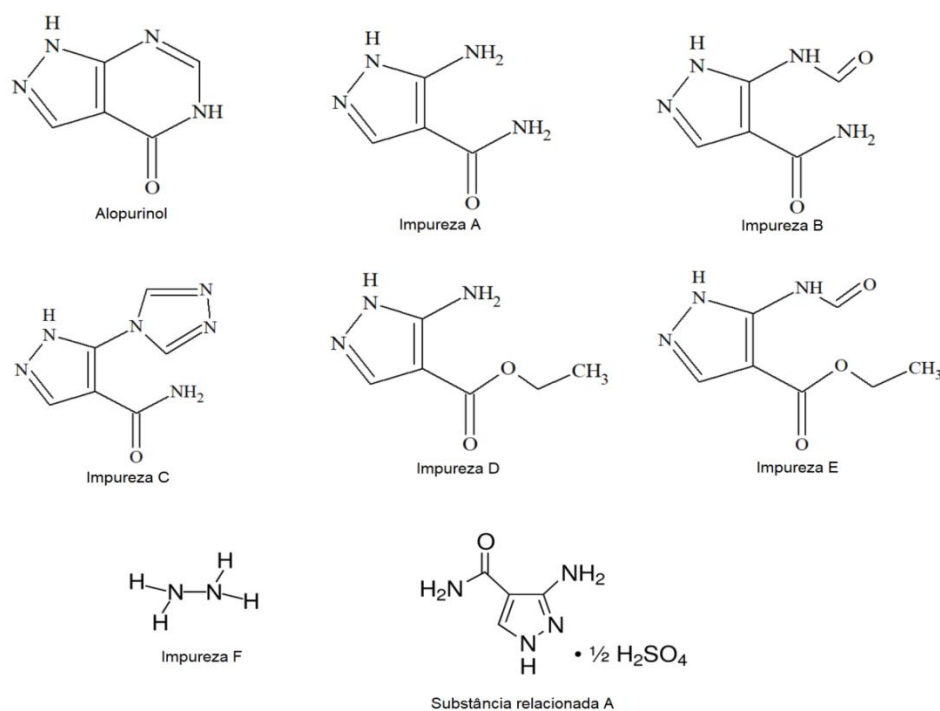
Apresenta-se no mercado na forma de suspensão oral, comprimidos orais contendo a molécula na forma de base livre (ALOB) nas dosagens de 100, 200 e 300 mg e na forma de alopurinol sódico como pó liofilizado para solução intravenosa na dosagem de 500 mg a cada 25 mL (20 mg.mL⁻¹) de solução (USP, 2017; DRUGBANK, 2019a). É também comercializado em associação com lesinurad, um inibidor da enzima transportadora de ácido úrico (URAT1) (DRUGBANK, 2019b).

Possui registro CAS número 315-30-0, fórmula molecular C₅H₄N₄O, peso molecular 136,11 g.mol⁻¹, ponto de fusão acima de 380°C, máximos de absorção no ultravioleta em 257 nm (em solução de NaOH 0,1 mol.L⁻¹) e 250 nm (em solução de HCl 0,1 mol.L⁻¹), e coeficiente de partição octanol/água (Log P) igual a 0,28. Apresenta solubilidade em água a

37 °C igual a 0,8 mg.mL⁻¹, sendo classificado como solúvel em soluções de hidróxido de sódio e potássio, muito pouco solúvel em etanol e praticamente insolúvel em clorofórmio e éter (O'NEIL, 2013). É considerado fármaco de classe IV (baixa solubilidade e baixa permeabilidade) no Sistema de Classificação Biofarmacêutica (“BCS Database Search”, [s.d.]; FDA, 2017).

A matéria-prima dessecada deve conter entre 98,0% e 102,0% de C₅H₄N₄O e os limites de metais pesados, substâncias voláteis e cinzas sulfatadas são: 20 ppm, 0,5% e 0,1%, respectivamente. É caracterizada como um pó branco ou quase branco e possui sete impurezas descritas. A matéria-prima deve ser armazenada em recipientes bem fechados e estocada em temperatura ambiente (O'NEIL, 2013; BRITISH, 2017; USP, 2017). A estrutura química do alopurinol e de suas impurezas descritas na British Farmacopoeia (2017) estão representadas na Figura 2.

Figura 2 – Estruturas do alopurinol e suas impurezas.

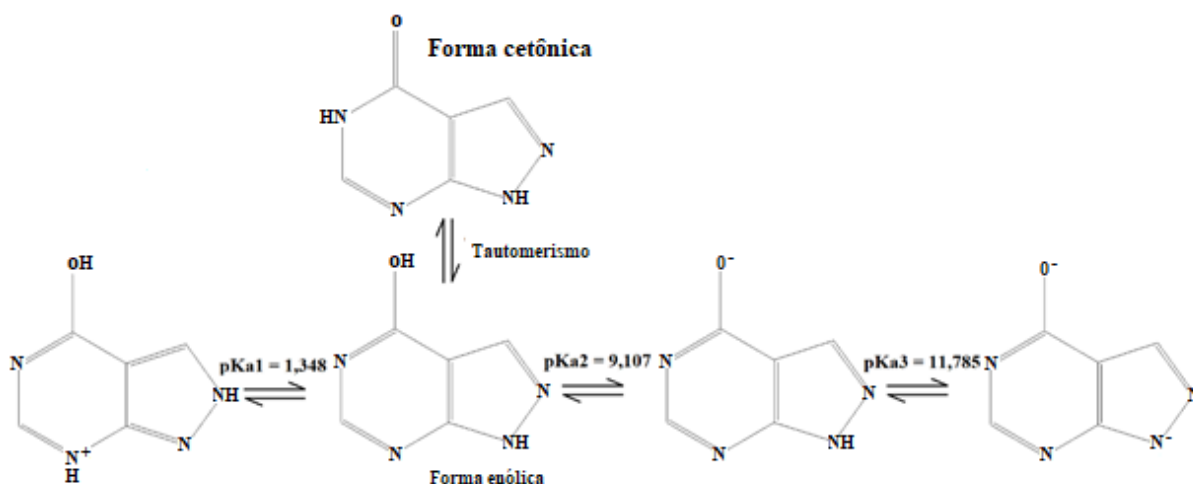


Fonte: adaptado de British, 2017; USP, 2017.

O alopurinol apresenta grupamentos químicos ionizáveis. Portanto, de acordo com o pH do meio, pode formar sais. Seus pKas descritos na literatura são: 1,348; 9,107 e 11,785 (SHELDRIK; BELL; 1987b; LINDER; STANFORD; WILLIAMS; 1976). Além disso, o alopurinol apresenta tautomerismo ceto-enólico (PRUSINER; SUNDARALINGAM; 1972).

As estruturas contendo os sítios de protonação e desprotonação do alopurinol, bem como os seus tautômeros na forma neutra estão demonstrados na Figura 3.

Figura 3 – pKas e estruturas tautoméricas do alopurinol.



Fonte: adaptado de PRUSINER, SUNDARALINGAM, 1972; LINDER, STANFORD, WILLIAMS, 1976.

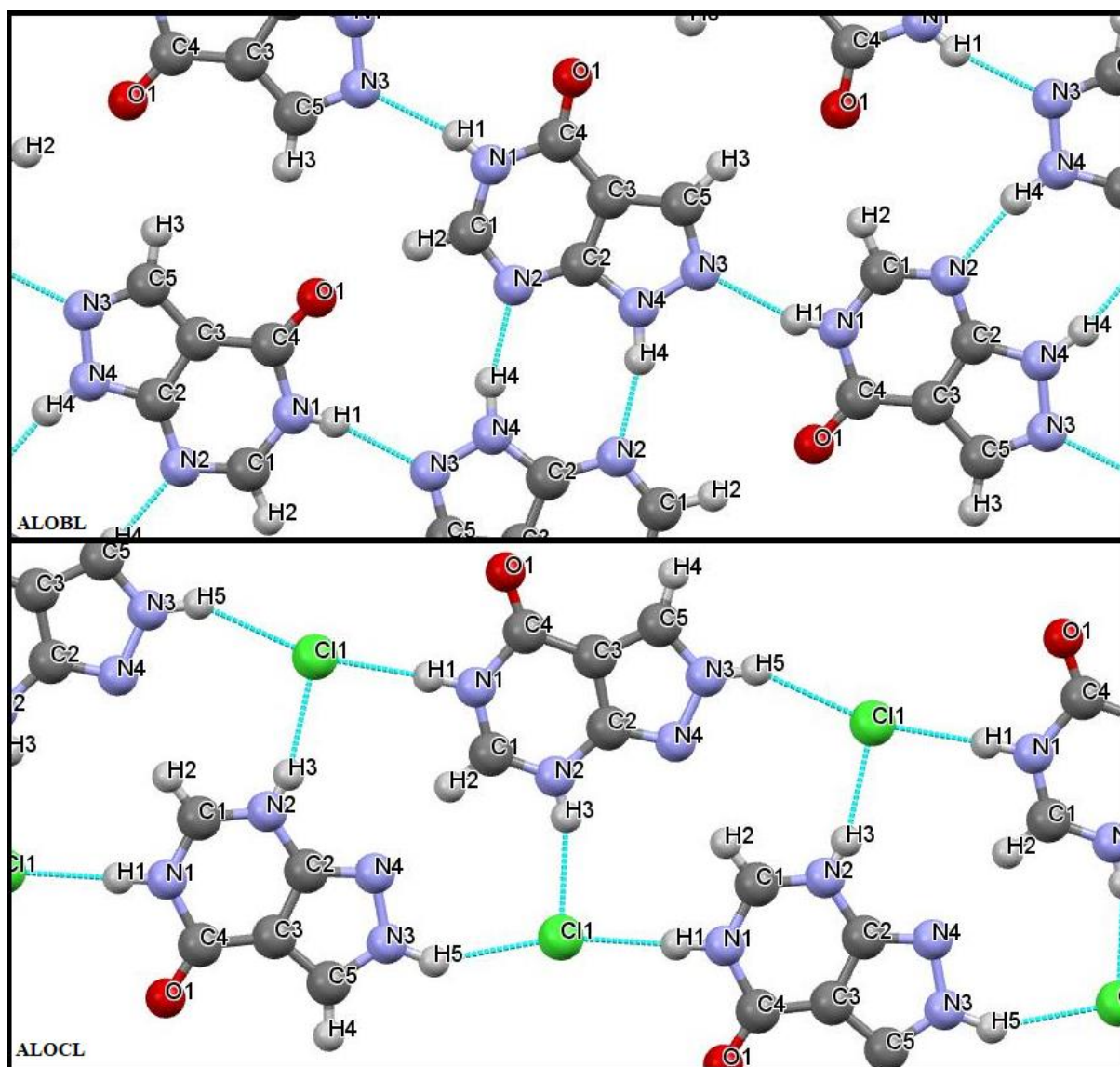
Ambas as estruturas tautoméricas (forma cetônica e enólica) podem estar presentes em soluções (PRUSINER; SUNDARALINGAM, 1972; SHELDRIK; BELL, 1987b). Entretanto, a forma cetônica é o tautômero preferido na estrutura cristalina da base livre (ALOBL) (PRUSINER; SUNDARALINGAM, 1972).

Uma busca em processos de síntese e purificação de alopurinol revelou que há patentes que descrevem a utilização de ácido clorídrico, principalmente nas etapas de purificação (LONG, 2011; HAIFENG; JIANFENG; XIAOXIA, 2013; HUI et al., 2015; YINGBO et al., 2017). Sendo assim, a utilização de ácido clorídrico pode promover a formação do cloridrato de alopurinol em matérias primas. Portanto, recomenda-se que sejam realizadas análises por DRXP, IV, DSC e TG para controle de qualidade de matérias-primas de alopurinol. Para realização das análises, as amostras não devem ser aquecidas à 105°C, como frequentemente recomendado em monografias de vários fármacos, pois, neste caso, o aquecimento pode levar à perda de HCl, inviabilizando a detecção de possíveis contaminações de ALOCL. Por outro lado, o aquecimento de todo o lote em temperatura até 250°C pode ser uma alternativa para evitar contaminações com ALOCL.

Uma pesquisa na base de dados *Cambridge Structural Database* (CSD) revelou que há descrições de estruturas cristalinas do ALOBL (PRUSINER; SUNDARALINGAM, 1972), do

ALOCL (SHELDRICK; BELL, 1987a; SHELDRICK; BELL, 1987b) e do hemissulfato de alopurinol (RAVINDRA; PANPALIA; SARMA, 2008). Não foram encontrados polimorfos descritos para cada forma. As interações intermoleculares das estruturas cristalinas de ALOBL e ALOCL estão demonstradas na figura 4.

Figura 4 – Representação das interações intermoleculares das estruturas cristalinas



Fonte: gerado pelo software Mercury (2015) a partir das estruturas de ALOBL (PRUSINER; SUNDARALINGAM, 1972) e ALOCL (SHELDRICK; BELL, 1987b) depositadas na base de dados CSD.

Pode-se observar que ALOCL apresenta interações entre os hidrogênios ligados aos nitrogênios N1, N2 e N3 e o íon cloreto. Entretanto, ALOBL apresenta interações intermoleculares do tipo ligações de hidrogênio com a participação de todos os nitrogênios da

molécula de alopurinol (N1, N2, N3 e N4). Além disso, pode-se observar a protonação do N2 em ALOCL, e a substituição do hidrogênio ligado ao N4 no ALOBL para o N3 no ALOCL, com a ressonância das duplas ligações do anel pirimidínico.

Em relação aos métodos de análise, existem várias técnicas analíticas descritas para determinação de alopurinol em matérias-primas e medicamentos, que incluem métodos por cromatografia líquida de alta eficiência (RAJKUMAR; BHAVYA; KUMAR, 2014; USP, 2017; BRITISH, 2018), espectrofotometria na região do ultravioleta/visível (LAGO; PEREIRA; BERTOL, 2012; BRITISH, 2018; FARMACOPEIA BRASILEIRA, 2019), espectroscopia na região do infravermelho próximo (SMETISKO; MILJANIC, 2017), cromatografia em camada delgada (BRITISH, 2018; USP, 2017) e métodos eletroquímicos (HASON et al., 2009; RAJ; JOHN, 2014; TKACH et al., 2018).

Além disso, várias técnicas são descritas para determinação de alopurinol em matrizes biológicas, tais como métodos por cromatografia líquida de alta eficiência (SHOSTAK, 1984; FUCHS et al., 1999; STAMP et al., 2011; LUI et al., 2013; SINGH; GADHAWALA, 2013; BARR et al., 2014; RATHOD et al., 2016; MARÁVOKÁ et al., 2017), espectrofotometria na região do ultravioleta/visível (SHOUKRALLAHA; SAKLAB; WINTERSTEIGERC, 1990; BEDAIRA; KORANYA; ELSAYEDA, 1990; ABDEL-HAYA; BARARYA; ELSAYED, 1991; KHAYOON et al., 2008; REFAT; MOHAMED; FATHI, 2010; YAZID; SUPRIYANTO; TJAHHANDARIE, 2014; PATEL; JAIN; RAJ, 2014), eletroforese capilar (WESSEL et al., 2000; PEREZ-RUIZ et al., 2003a), polarografia (CHATTEN et al., 1981; TOMMASO et al., 1989), oscilopolarografia (LIU et al., 1989), métodos eletroquímicos (DRYHURST; DE, 1972; HASON et al., 2009) e fosforimetria (PEREZ-RUIZ et al., 2003b).

2.2 DESENVOLVIMENTO E OTIMIZAÇÃO DE MÉTODOS

De acordo com a The International Council For Harmonisation Of Technical Requirements For Pharmaceuticals For Human Use (ICH), os tipos mais comuns de procedimentos analíticos são: testes de identificação; testes quantitativos para princípios ativos em matérias-primas ou medicamentos; testes quantitativos para impurezas; e ensaios limites para impurezas (ICH, 2005). No desenvolvimento de um método analítico, a escolha da instrumentação analítica e da metodologia deve ser baseada na finalidade e no escopo do método analítico (CHAUHAN; MITTU; CHAUHAN, 2015).

Existem várias razões para desenvolver novos métodos de análise: 1) ausência de método adequado para um analito específico em uma determinada matriz; 2) métodos propensos a

erros ou não confiáveis (baixa precisão e/ou exatidão); 3) métodos existentes são caros, demorados, consomem muita energia ou não são facilmente automatizados; 4) métodos existentes não possuem sensibilidade ou seletividade adequada ao analito em amostras de interesse; 5) instrumentos e técnicas recentes evoluíram para oferecer oportunidades de métodos melhorados, incluindo menores limites de detecção e quantificação, maior exatidão ou precisão, ou melhor retorno sobre o investimento; 6) por motivos legais ou científicos pode haver a necessidade de um método alternativo para confirmar os dados analíticos obtidos a partir de métodos existentes; 7) necessidade de desenvolvimento de um método indicativo de estabilidade (SWARTZ; KRULL, 2012).

Na etapa de desenvolvimento de método analítico, devem-se considerar todas as características do composto a ser analisado (analito) (VOGT; KORD, 2011). Inicialmente, devem-se pesquisar na literatura os métodos existentes para determinação do analito ou de estruturas semelhantes (SWARTZ; KRULL, 2012). Além disso, devem-se coletar todas as informações sobre o analito, tais como: pKa, logP, solubilidade, peso molecular, propriedades espectrais, modo de detecção. Em seguida, devem-se preparar soluções das amostras para desenvolvimento do método (GUPTA et al., 2012).

Vários outros fatores devem ser considerados na etapa de desenvolvimento analítico: desenvolvimento rápido de método; baixo custo no desenvolvimento e aplicação do método; detecção de todos os compostos de interesse; separação de todos os compostos de interesse; tempo de análise curto; redução da necessidade de pré-tratamento de amostra, precisão, exatidão e robustez do método (WATZIG, 2008).

As etapas que normalmente são seguidas durante o desenvolvimento de um método são: 1) obtenção de informações sobre a amostra e definição de objetivos a serem alcançados pelo método analítico; 2) definição se há necessidade de tratamento de amostra; 3) escolha de sistema de detecção; 4) escolha de método analítico; 5) definição de condições de método analítico; 6) análise de problemas ou necessidade de procedimento especial; 7) otimização do método; 8) validação do método (SNYDER; KIRKLAND; GLAJCH, 1997).

Para o desenvolvimento de métodos indicativos de estabilidade, utilizam-se amostras de estudos de degradação forçada. (BAKSHI; SINGH, 2002; ICH, 2003). No Brasil, a resolução 318/2019 dispõe sobre a realização de estudos de estabilidade de insumos farmacêuticos ativos. Segundo o documento, os testes de degradação forçada podem ser conduzidos apenas em um lote do insumo farmacêutico ativo e devem ser incluídos os efeitos da temperatura, da umidade, da oxidação, da luz e a susceptibilidade à hidrólise em ampla faixa de valores de pH. A natureza dos testes depende do tipo de molécula a ser estudada (BRASIL, 2019).

A quantidade de degradação de princípio ativo entre 5% e 20% tem sido aceita como razoável para validação de métodos cromatográficos. Alguns pesquisadores consideram que uma degradação de 10% é ideal para validação de método analítico com limite de estabilidade de 90% da quantidade declarada (BLESSY, 2014).

Durante o desenvolvimento de um método analítico indicativo de estabilidade por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), pode ocorrer co-eluição de um produto de degradação com o IFA. Por este motivo, para uma análise por detector ultravioleta (UV) torna-se necessário a análise da pureza do pico de interesse, utilizando um detector de arranjo de diodos (BLESSY, 2014). Se houver necessidade de identificação dos produtos de degradação, utilizar detector de massas acoplado com uma técnica de separação por cromatografia líquida de alta eficiência, é a melhor maneira de se identificar ou verificar uma estrutura em comparação com um padrão autêntico (USP, 2017).

Posteriormente ao desenvolvimento, o método analítico deve ser otimizado, alterando-se várias condições do método desenvolvido, buscando-se obter o melhor resultado analítico possível (WATZIG, 2008) e, após as etapas de desenvolvimento e otimização, o método obrigatoriamente deve ser validado (KUMAR et al., 2012).

2.3 VALIDAÇÃO DE METODOS ANALÍTICOS

A validação analítica trata-se de uma etapa posterior e intimamente relacionada às etapas de desenvolvimento e otimização de um método. Um processo de validação deve ser documentado e fornecer evidências científicas de que o método analítico é adequado ao uso desejado, para que o mesmo possa ser utilizado em análises de rotina (BELOUFA et al., 2017).

Vários guias regulatórios são referências sobre a validação de métodos analíticos, tais como: AOAC (ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTRY, 2002), IUPAC (THOMPSON; ELLISON; WOOD, 2002), ICH (ICH, 2005), EURACHEM (MAGNUSSON; ÖRNEMARK, 2014), FDA (FOOD AND DRUG ADMINISTRATION, 2015), USP (UNITED STATES PHARMACOPEIA, 2017).

No Brasil, a Resolução da Diretoria Colegiada (RDC) número 166, de 24 de julho de 2017 dispõe sobre a validação de métodos analíticos e dá outras providências. A resolução estabelece os seguintes parâmetros de validação analítica: seletividade, linearidade, efeito matriz, faixa de trabalho, precisão, exatidão, limite de detecção, limite de quantificação e robustez (BRASIL, 2017).

2.3.1 Seletividade

A seletividade analítica é definida como: “extensão pela qual o método pode ser utilizado para determinar analitos específicos em misturas ou matrizes, sem interferências de outros componentes de comportamento similar” (MAGNUSSON; ÖRNEMARK, 2014). Embora a IUPAC recomende o termo seletividade (THOMPSON; ELLISON; WOOD, 2002), o ICH utiliza o termo especificidade como sinônimo (ICH, 2005). Entretanto, vários autores consideram que o termo especificidade pode ser considerado como a ausência absoluta efeitos de interferência: especificidade = 100% de seletividade (GONZÁLEZ; HERRADOR, 2007).

Na prática, a seletividade do método analítico deve ser demonstrada por meio da sua capacidade de identificar ou quantificar o analito de interesse, inequivocamente, na presença de componentes que podem estar presentes na amostra, como impurezas, diluentes e componentes da matriz. Para métodos quantitativos e ensaios limite, a seletividade deve ser demonstrada por meio da comprovação de que a resposta analítica se deve exclusivamente ao analito, sem interferência do diluente, da matriz, de impurezas ou de produtos de degradação. No caso de métodos cromatográficos, deve ser comprovada a pureza cromatográfica do sinal do analito (BRASIL, 2017).

2.3.2 Linearidade

A linearidade de um método deve ser demonstrada por meio da sua capacidade de obter respostas analíticas diretamente proporcionais à concentração de um analito em uma amostra (BRASIL, 2017).

Para o estabelecimento da linearidade, deve-se utilizar, no mínimo, 5 (cinco) concentrações diferentes da substância química de referência (SQR) para as soluções preparadas em, no mínimo, triplicata. As soluções utilizadas para avaliação da linearidade devem ser preparadas de maneira independente, podendo ser utilizadas soluções diluídas de uma mesma solução mãe da SQR. Todos os cálculos para a avaliação da linearidade devem ser realizados a partir dos dados de concentrações reais e respostas analíticas individuais (BRASIL, 2017).

Para avaliação da linearidade, devem ser apresentados os seguintes dados: (1) representação gráfica das respostas em função da concentração do analito; (2) gráfico de dispersão dos resíduos, acompanhado de sua avaliação estatística; (3) equação da reta de regressão de y em x, estimada pelo método dos mínimos quadrados; (4) avaliação da

associação linear entre as variáveis por meio dos coeficientes de correlação (r , o qual deve estar acima de 0,990) e de determinação (r^2); (5) verificação da homocedasticidade dos dados utilizando modelo adequado e nível de significância de 5%; (6) avaliação da significância do coeficiente angular, o qual deve ser significativamente diferente de zero) (BRASIL, 2017).

2.3.3 Efeito Matriz

O efeito de matriz deve ser avaliado se os padrões de calibração são preparados como soluções simples do analito (analito + solvente) (THOMPSON; ELLISON; WOOD, 2002). O efeito matriz deve ser determinado por meio da comparação entre os coeficientes angulares das curvas de calibração construídas com a SQR do analito em solvente e com a amostra fortificada com a SQR do analito. As curvas devem ser estabelecidas da mesma forma que na linearidade para os mesmos níveis de concentração, utilizando, no mínimo, 5 (cinco) concentrações diferentes em, no mínimo, triplicata. O paralelismo das retas é indicativo de ausência de interferência dos constituintes da matriz e a sua demonstração deve ser realizada por meio de avaliação estatística adequada (BRASIL, 2017).

2.3.4 Faixa de Trabalho

A faixa de trabalho (ou intervalo de trabalho) de um procedimento analítico é definida como: “intervalo entre a concentração superior e inferior do analito na amostra para o qual foi demonstrado que o procedimento analítico possui níveis adequados de precisão, exatidão e linearidade” (ICH, 2005). A faixa de trabalho deve ser estabelecida a partir dos estudos de linearidade, juntamente com os resultados de precisão e exatidão, sendo dependente da aplicação pretendida (BRASIL, 2017).

Devem ser consideradas as seguintes faixas de trabalho: para teor: de 80% (oitenta por cento) a 120% (cento e vinte por cento); para uniformidade de conteúdo: de 70% (setenta por cento) a 130% (cento e trinta por cento); para teste de dissolução: de -20% (menos vinte por cento) da menor concentração esperada a +20% (mais vinte por cento) da maior concentração esperada a partir do perfil de dissolução; para determinação de impurezas: do limite de quantificação até 120% (cento e vinte por cento) da concentração no limite da especificação de cada impureza individual (BRASIL, 2017).

2.3.5 Precisão

A precisão de um procedimento analítico expressa a concordância entre uma série de medidas obtidas a partir de amostragens múltiplas de uma mesma amostra homogênea sob as condições prescritas (ICH, 2005).

A precisão deve ser demonstrada pela dispersão dos resultados, calculando-se o desvio padrão relativo (DPR) da série de medições, conforme a fórmula: $DPR=(DP/CMD)X100$, em que DP é o desvio padrão e CMD, a concentração média determinada (BRASIL, 2017).

As amostras para avaliação da precisão devem ser preparadas de maneira independente desde o início do procedimento descrito no método. No caso de amostras sólidas e semissólidas, não é aceita a utilização de soluções diluídas de uma mesma solução mãe (BRASIL, 2017).

A precisão pode ser considerada em três níveis: repetibilidade, precisão intermediária e reprodutibilidade (ICH, 2005).

A repetibilidade expressa a precisão sob as mesmas condições de operação durante um curto intervalo de tempo. A repetibilidade também é denominada precisão intra-ensaio (ICH, 2005). A determinação da repetibilidade deve obedecer aos seguintes critérios: 1) avaliar as amostras sob as mesmas condições de operação, mesmo analista e mesma instrumentação, em uma única corrida analítica; 2) utilizar, no mínimo, 9 (nove) determinações, contemplando o intervalo linear do método analítico, ou seja, três concentrações: baixa, média e alta, com três réplicas em cada nível ou seis réplicas a 100% da concentração do teste individualmente preparadas (BRASIL, 2017).

A precisão intermediária expressa variações dentro de laboratórios: dias diferentes, analistas diferentes, equipamentos diferentes etc. (ICH, 2005). A determinação da precisão intermediária deve obedecer aos seguintes critérios: 1) expressar a proximidade entre os resultados obtidos da análise de uma mesma amostra, no mesmo laboratório, em pelo menos dois dias diferentes, realizada por operadores distintos; 2) contemplar as mesmas concentrações e o mesmo número de determinações descritas na avaliação da repetibilidade (BRASIL, 2017).

A reprodutibilidade expressa a precisão entre os laboratórios (estudos colaborativos, geralmente aplicados à padronização da metodologia) (ICH, 2005).

A RDC 166 de 2017 não define os critérios de aceitação para a precisão, e determina que os critérios de aceitação devem ser definidos e justificados de acordo com o objetivo do

método; variabilidade intrínseca do método; concentração de trabalho; e concentração do analito na amostra (BRASIL, 2017).

Embora a RDC 166 de 2017 não aborde os limites aceitáveis para precisão de métodos, existem limites aceitáveis publicadas (GONZÁLEZ; HERRADOR, 2007). Os valores estão descritos na Tabela 1.

Tabela 1 – Percentagens aceitáveis de Desvio Padrão Relativo (DPR).

Concentração do analito na amostra	Limite (% DPR)
100 %	2,0
10 %	2,8
1 %	4,0
0,1 %	5,7
0,01 (100 ppm)	8,0
0,001 (10 ppm)	11,3
0,0001 (1 ppm)	16,0
0,00001 (100 ppb)	22,6
0,000001 (10 ppb)	32,0
0,0000001 (1 ppb)	45,3

Fontes: HORWITZ, 1982; GONZÁLEZ, HERRADOR, 2007.

2.3.6 Exatidão

A exatidão expressa a concordância entre o valor aceito como verdadeiro ou um valor de referência e o valor encontrado (ICH, 2005).

A exatidão deve ser verificada a partir de, no mínimo, 9 (nove) determinações, contemplando o intervalo linear do método analítico, ou seja, três concentrações: baixa, média e alta, com três réplicas em cada nível. As amostras para avaliação da exatidão devem ser preparadas de maneira independente, podendo ser utilizadas soluções diluídas de uma mesma solução mãe da SQR (BRASIL, 2017).

Para determinação de exatidão de método a ser utilizado na determinação de IFA, deve-se utilizar uma das seguintes abordagens: 1) aplicar o método proposto utilizando substância de pureza conhecida (SQR); 2) comparar os resultados obtidos com aqueles resultantes de um segundo método validado, cuja exatidão tenha sido estabelecida; 3) no caso de analito em

matriz complexa, realizar análise pelo método de adição de SQR no qual quantidades conhecidas de SQR são acrescentadas à amostra (BRASIL, 2017).

Para determinação de exatidão de método a ser utilizado na determinação de produto terminado, deve-se utilizar uma das seguintes abordagens: 1) aplicar o método proposto na análise de uma amostra, na qual quantidade conhecida de SQR foi adicionada à matriz; 2) na indisponibilidade de amostras de todos os componentes do medicamento, pode ser realizada a análise pelo método de adição de SQR, no qual quantidades conhecidas de SQR são acrescentadas à solução do produto terminado; 3) comparar os resultados obtidos com aqueles resultantes de um segundo método validado (BRASIL, 2017).

A exatidão deve ser expressa pela relação percentual de recuperação do analito de concentração conhecida adicionado à amostra ou pela relação entre a concentração média, determinada experimentalmente, e a concentração teórica correspondente. Deve ser calculado o desvio padrão relativo (DPR) para cada concentração (BRASIL, 2017).

A RDC 166 de 2017 não define os critérios de aceitação para a exatidão, e determina que os critérios de aceitação devem ser definidos e justificados de acordo com o objetivo do método; variabilidade intrínseca do método; concentração de trabalho; e concentração do analito na amostra (BRASIL, 2017).

Embora a RDC 166 de 2017 não aborde os limites aceitáveis para exatidão de métodos, existem percentagens de recuperação aceitáveis publicadas (GONZÁLEZ; HERRADOR, 2007). Os valores estão descritos na Tabela 2.

Tabela 2 – Percentagens de recuperação aceitáveis, dependendo da concentração do analito.

Concentração do analito na amostra	Limite (% recuperação)
100 %	98-102
10 %	98-102
1 %	97-103
0,1 %	95-105
0,01 (100 ppm)	90-107
0,001 (10 ppm)	80-110
0,0001 (1 ppm)	80-110
0,00001 (100 ppb)	80-110

Fonte: GONZÁLEZ, HERRADOR, 2007.

2.3.7 Limite de detecção

O limite de detecção é a menor quantidade de analito em uma amostra que pode ser detectada, mas não necessariamente quantificada (ICH, 2005). A determinação do limite de detecção pode ser realizada por meio de método visual, da razão sinal-ruído, baseado na determinação do branco ou em parâmetros da curva de calibração, considerando-se as particularidades do método analítico utilizado (BRASIL, 2017).

Para a determinação baseada em parâmetros da curva analítica, o limite de detecção pode ser calculado pela fórmula: $LD = (3,3 \times \sigma)/IC$, em que: IC é a inclinação da curva de calibração, σ é o desvio padrão e pode ser obtido de 3 formas: 1) a partir do desvio padrão do intercepto com o eixo Y de, no mínimo, 3 curvas de calibração construídas contendo concentrações do analito próximas ao suposto limite de detecção; 2) a partir do desvio padrão residual da linha de regressão; 3) a partir da estimativa de ruído proveniente da análise de um apropriado número de amostras do branco (BRASIL, 2017).

2.3.8 Limite de Quantificação

O limite de quantificação é a menor quantidade de analito que pode ser quantitativamente determinada com precisão e exatidão adequadas. O limite de quantificação é usado particularmente para a determinação de impurezas e/ou produtos de degradação (ICH, 2005).

Para a determinação baseada em parâmetros da curva analítica, o limite de quantificação pode ser calculado pela fórmula: $LQ = (10 \times \sigma)/IC$, em que: IC é a inclinação da curva de calibração, σ é o desvio padrão e pode ser obtido de 3 formas: 1) a partir do desvio padrão do intercepto com o eixo Y de, no mínimo, 3 curvas de calibração construídas contendo concentrações do analito próximas ao suposto limite de quantificação; 2) a partir do desvio padrão residual da linha de regressão; 3) a partir da estimativa de ruído proveniente da análise de um apropriado número de amostras do branco (BRASIL, 2017).

Devem ser testadas precisão e exatidão nas concentrações correspondentes ao limite de quantificação (BRASIL, 2017).

2.3.9 Robustez

A robustez é uma medida da capacidade de um procedimento analítico não ser afetado por pequenas e deliberadas variações nos parâmetros do método, e fornece uma indicação de sua confiabilidade durante o uso normal (ICH, 2005).

No caso de métodos quantitativos, o impacto das variações propostas nos resultados obtidos deverá ser avaliado com os mesmos critérios utilizados para a exatidão. Caso haja susceptibilidade do método a variações nas condições analíticas, essas deverão ser controladas por meio de precauções descritas no método (BRASIL, 2017).

A RDC 166/2017 estabelece os parâmetros que devem ser contemplados na avaliação da robustez. As condições para a avaliação da robustez do método são: para o preparo de amostras, através da avaliação da estabilidade das soluções analíticas, tempo de extração e compatibilidade de filtros; para o método por espectrofotometria, através da avaliação da variação do pH da solução e de diferentes lotes ou fabricantes de solventes; e avaliação do método por cromatografia líquida, através da variação do pH da fase móvel, variação na composição da fase móvel, diferentes lotes ou fabricantes de colunas, e diferentes lotes de solventes.

De acordo com a RDC 166/2017, os parâmetros que sejam considerados relevantes para o resultado, de acordo com as características do método, devem ser avaliados adicionalmente (BRASIL, 2017).

2.4 VARIAÇÃO NO ESTADO SÓLIDO DE IFAs

Embora as moléculas em um sólido possam ser distribuídas aleatoriamente no espaço (sólido amorfo), uma disposição ordenada e repetitiva (sólido cristalino) é mais provável, uma vez que é a situação de menor energia quando comparado a uma distribuição aleatória de átomos e moléculas interagindo fortemente (BRITAIN; 2009; NEWMAN, 2003). As moléculas de um cristal se agrupam com formação de interações fracas como interações de hidrogênio e interações de Van Der Waals. As moléculas agrupadas dão origem à célula unitária, a menor unidade que se repete dentro de um cristal. (NEWMAN, 2003).

Considerando as formas cristalinas, sólidos farmacêuticos são classificados em monocomponentes e multicomponentes. Formas cristalinas monocomponentes são aquelas que contêm apenas o fármaco em sua estrutura cristalina e abrangem as formas anidras (dentro desta classificação incluem-se os dessolvatos isomórficos, um caso particular de

anidros) e seus polimorfos. Formas cristalinas multicomponentes incluem solvatos (incluindo o hidrato, um tipo particular de solvato), sais, co-cristais e seus polimorfos (AITIPAMULA et al., 2012).

O termo polimorfismo é utilizado para denotar sistemas cristalinos no qual uma substância pode existir em estruturas caracterizadas por diferentes células unitárias, porém, cada estrutura deve possuir exatamente a mesma fórmula molecular (BRITTAIN, 2009).

A existência de variadas formas sólidas em substâncias farmacêuticas é muito comum. É raro encontrar uma substância ativa que exiba somente uma forma cristalina (MCCAULEY; VASOLONA; LEVORS, 1993). Considerando que variações no estado sólido podem resultar em diferentes propriedades físicas e químicas e que este fenômeno é muito comum em substâncias farmacêuticas, é muito provável que distintas formas sólidas de um Ingrediente Farmacêutico Ativo (IFA) exibam diferenças em suas propriedades farmacotécnicas e/ou na qualidade biofarmacêutica dos medicamentos, através de diferenças de higroscopicidade, forma de partículas, densidade, hábito cristalino, cor, índice de refração, taxa de dissolução, ponto de fusão, granulometria, ângulo de repouso e compactabilidade (FREITAS et al., 2017; PAYGHAN et al., 2010).

O processamento de um medicamento pode influenciar na forma sólida presente no produto, pode haver alterações que resulte em diferentes formas sólidas. Essas alterações ocorrem em várias etapas de um processo, como a granulação úmida, secagem, compressão, manuseio e armazenamento (NEWMAN, 2003).

A presença de uma contaminação de outra forma sólida em uma matéria-prima ou em produto acabado, sendo um polimorfo ou não, pode comprometer a biodisponibilidade e eficácia terapêutica de um IFA. Essa contaminação pode ser resultado de uma conversão incompleta da forma metaestável para a forma mais estável durante um processo de recristalização, trituração, granulação, aquecimento ou resfriamento (LI et al., 2011; CHIENG et al., 2011; LOHANI et al., 2014; FREITAS et al., 2017).

Considerando a qualidade biofarmacêutica, cada forma sólida de um IFA pode apresentar diferentes solubilidades e taxas de dissolução (YU, 2003). As diferenças de solubilidade e a taxa de dissolução são fatores limitantes para se obter adequada biodisponibilidade do fármaco, principalmente para fármacos de baixa solubilidade que, quando há diferença entre formas sólidas, podem afetar a absorção do fármaco. Consequentemente, isto pode dificultar a obtenção de bioequivalência entre formulações contendo diferentes formas sólidas (SAIFEE et al., 2009).

Devido à possível influência de variações no estado sólido de IFAs, se faz necessário conhecer qual forma está presente em cada etapa de um processo de fabricação, pois mudanças na forma sólida podem afetar o desempenho e estabilidade do medicamento (NEWMAN, 2003).

As técnicas de identificação servem tanto para diferenciar formas sólidas de um mesmo IFA, como possíveis mudanças no processo de fabricação (NEWMAN, 2003). A caracterização de sólidos farmacêuticos utiliza mais frequentemente as técnicas de difração de raio-X por policristais (DRXP); microscopia eletrônica de varredura (MEV); análises térmicas por calorimetria exploratória diferencial (DSC) e termogravimetria (TG); e técnicas espectroscópicas por infravermelho (IV), Raman e ressonância magnética nuclear (RMN) (BRITAIN, 2009).

A DRXP é uma poderosa e apropriada técnica para distinguir fases cristalinas com diferentes estruturas cristalinas. Diferente da difração de raios-X por monocristal, a amostra pode estar na forma de pó (na verdade policristais pulverizados). Em alguns casos é possível determinar parâmetros da unidade de cela e grupo espacial bem como a determinação da estrutura molecular (STEPHENSON; 2000; DATTA; GRANT, 2004). A DRXP também pode ser usada para determinação do grau de cristalinidade, análise quantitativa das fases nos sólidos polimórficos e cinética das reações do estado sólido (YU, 2003).

Os elétrons ao redor do átomo difratam o raio-X de acordo com a equação de Bragg. O ângulo de difração do raio-X, junto com a informação do comprimento de onda, é usado para o cálculo do espaçamento entre os planos das moléculas de um cristal. (NEWMAN, 2003). A DRXP é analisada a partir de um gráfico de intensidade versus ângulo difratado (2θ) (difratogramas). A análise de DRXP serve tanto para análise qualitativa através da determinação de amostras contendo o mesmo padrão de difração ou de uma amostra contendo uma mistura de padrões de difração, quanto para análise quantitativa, para quantificar as fases cristalinas presentes. (NEWMAN, 2003).

As técnicas de análises térmicas, como DSC e TGA, distinguem formas sólidas com base nas transições de fase que sofrem durante o aquecimento e podem ser usadas para se obter informações adicionais com respeito a estas transições de fase, como ponto de fusão, dessolvatação, cristalização e transição vítrea. A técnica de DSC mede a quantidade de energia absorvida ou liberada pela amostra quando esta é aquecida, resfriada ou mantida em temperatura constante (BRITAIN, 2009).

As espectroscopias de IV e Raman são técnicas que fornecem espectros, os quais têm sua estrutura fundamentada nos modos vibracionais das moléculas. Estes espectros em alguns

casos são impressões digitais dos polimorfos. Ambas as técnicas oferecem informações sobre a estrutura e conformação molecular do sólido (BRITTAIN, 2009). O IV tem sido utilizado como auxiliar na elucidação de estruturas, como também para observar interações intermoleculares em materiais sólidos (NEWMAN, 2003).

2.5 ESTUDOS DE ESTABILIDADE

Entende-se por estabilidade a capacidade de uma formulação de manter as especificações físicas, químicas, microbiológicas e biofarmacêuticas dentro dos limites especificados durante todo seu prazo de validade (O'DONNELL; BOKSER, 2005).

A relevância de estudos de estabilidade é verificada ao se considerar que a perda da estabilidade de um fármaco ou medicamento pode estar diretamente relacionada com a perda do efeito terapêutico ou com a formação de produtos de degradação (SILVA et al., 2009). A formação de produtos de degradação pode resultar em atividade reduzida ou tóxica (CARVALHO et al., 2005).

A estabilidade de produtos farmacêuticos depende de fatores ambientais como temperatura, umidade e luz, e de outros relacionados ao próprio produto como propriedades físicas e químicas de substâncias ativas e adjuvantes farmacêuticos, forma farmacêutica e sua composição, processo de fabricação, tipo e propriedades dos materiais de embalagem (BRASIL, 2005). O polimorfismo pode influenciar na estabilidade física e química de medicamentos, devido a diferenças entre estabilidade termodinâmicas dos polimorfos (SAIFEE et al., 2009). Possíveis transformações da forma cristalina podem ocorrer ao longo do tempo ou durante ensaios de estabilidade. A forma menos estável pode se transformar na forma estável, principalmente sob condições de influência do calor, umidade, estresse mecânico, e presença de sementes de nucleação. Estabelecer a estabilidade das formas de estado sólido em condições variadas pode contribuir para determinar o tempo de prateleira ou a mudança para uma forma mais estável se a forma metaestável não possuir estabilidade suficiente. (NEWMAN, 2003).

Condições de armazenagem, como umidade e temperatura, podem influenciar na transformação de espécies sólidas, principalmente entre formas sólidas anidras e hidratadas. A presença de semente nessas condições também favorece a transformação nas formas (NEWMAN, 2003).

No Brasil (2019), a resolução RDC n° 318, de 6 de novembro de 2019 dispõe sobre a realização de estudos de estabilidade de insumos farmacêuticos ativos. Esta resolução define três tipos de estudos de estabilidade:

- a) estabilidade acelerada: estudo que se acelera a degradação química ou mudanças físicas de um produto em condições forçadas de armazenamento;
- b) estabilidade de longa duração: estudo projetado para verificar as características físicas, químicas, biológicas e microbiológicas de um produto durante o prazo de validade esperado e, opcionalmente, após seu vencimento;
- c) estabilidade de acompanhamento: estudo realizado após início da comercialização do produto, para verificar a manutenção das características físicas, química e microbiológicas, previstas nos estudos de estabilidade de longa duração.

Com relação à frequência dos testes nos estudos de estabilidade acelerada, é estabelecido que para os estudos de estabilidade acelerada os testes devem ser realizados nos tempos zero, três e seis meses. As condições climáticas para a realização dos estudos de estabilidade acelerada para IFAs com condição de armazenamento de até 30 °C são: 40 °C ± 2 °C / 75% UR ± 5% UR. A RDC n° 318 de 2019, além de que os métodos analíticos utilizados no estudo de estabilidade devem estar validados e ser indicativos de estabilidade (BRASIL, 2019).

2.6 ESTUDOS DE SOLUBILIDADE

Solubilidade é a condição de equilíbrio do processo de dissolução, caracterizado pela máxima concentração do fármaco no meio de dissolução em uma dada temperatura (AULTON, 2005). Cada forma sólida de um IFA pode apresentar diferente solubilidade e taxas de dissolução (YU, 2003).

A solubilidade de um fármaco é medida em conceito de solubilidade intrínseca, em que corresponde a um equilíbrio termodinâmico entre o fármaco em solução e o fármaco no estado sólido, ou seja, as mesmas espécies que se dissolvem em solução, são as mesmas espécies que se encontram no estado sólido (LARSSON, 2009).

O método *shake flask* é um método usual para se determinar a solubilidade. De acordo com esse método, o componente sólido é adicionado em um meio e agitado por um período de tempo pre-determinado. E a saturação do composto em solução é observada com presença de material não dissolvido (LARSSON, 2009).

A nota técnica n. 003 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) (BRASIL, 2013) dispõe, entre outros, sobre a avaliação de solubilidade de fármacos. Neste documento, a

ANVISA não recomenda a avaliação de solubilidade de fármacos por diagrama de fases. A nota técnica diz que a solubilidade de um fármaco no equilíbrio deve ser determinada experimentalmente a 37 ± 1 °C em no mínimo três diferentes meios dentro da faixa de pH fisiológico (entre 1,2 a 6,8). Deve-se adicionar quantidades crescentes de fármaco ao meio selecionado para a obtenção de uma solução saturada que deve ser mantida sob agitação (geralmente por 24-48 horas) em velocidade e temperatura controladas, utilizando uma incubadora com plataforma de agitação orbital, até que a solubilidade de equilíbrio seja atingida. Deve-se utilizar nestes testes um método validado e indicativo de estabilidade (BRASIL, 2013).

2.7 DISSOLUÇÃO INTRÍNSECA

A dissolução é a transferência de moléculas ou íons do estado sólido para a solução (AULTON, 2005).

A dissolução intrínseca é definida como: quantidade de IFA que se dissolve em um meio de dissolução através da área de contato do sólido com este meio. É medida pela taxa de dissolução intrínseca (VDI, $\text{mg}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{cm}^{-2}$) considerando assumidas as condições *sink* (AULTON; 2005; USP, 2017). As condições *sink* são verificadas quando o volume do meio é três vezes maior do que o necessário para se obter uma solução saturada, de modo que o gradiente de concentração seja mantido, não interferindo na velocidade de dissolução (ROSA; VILHENA, 2012).

No entanto, a dissolução intrínseca também pode ser medida quando não existe interferência de fatores extrínsecos na taxa de dissolução, sendo que esses fatores extrínsecos, tais como o hábito cristalino, tamanho de partículas, agitação, área de superfície, temperatura, pH, força de tamponamento, viscosidade e força iônica devem ser mantidos constantes (LARSSON, 2009).

Pode-se considerar que uma das principais dificuldades de se desenvolver uma formulação é a baixa solubilidade de um IFA em água. Um fármaco que apresenta baixa solubilidade, provavelmente, apresenta também baixa taxa de dissolução. Algumas estratégias para melhorar a dissolução é através da redução do tamanho de partículas, variações nas formulações, complexação, mistura de solventes, técnicas de secagem por pulverização ou encontrando outra forma sólida que seja mais solúvel do que a comercializada (FREITAS et al., 2017). A formação de sal pode aumentar a absorção e a solubilidade através do controle de pH do microambiente onde o fármaco está inserido (AULTON, 2005).

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Realizar estudos de caracterização, estabilidade acelerada, solubilidade e dissolução intrínseca em formas cristalinas de alopurinol.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Os objetivos específicos são:

- a) Otimizar e validar método por CLAE indicativo de estabilidade para quantificação de alopurinol;
- b) Desenvolver e reproduzir métodos de obtenção de estruturas cristalinas de alopurinol (pelo menos uma estrutura diferente da forma comercializada);
- c) Realizar estudos de caracterização em formas cristalinas de alopurinol utilizando técnicas de DRXP, DSC, TGA e IV;
- d) Realizar estudos de estabilidade acelerada em formas cristalinas de alopurinol;
- e) Realizar estudos de solubilidade em formas cristalinas de alopurinol;
- f) Realizar estudos de dissolução intrínseca em formas cristalinas de alopurinol.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 AMOSTRAS E REAGENTES

Os reagentes, solventes e amostras utilizados foram disponibilizados pelo Laboratório Núcleo de Controle de Qualidade da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Alfenas-MG (NCQ/FCF/UNIFAL-MG).

Os solventes e reagentes utilizados estão descritos a seguir:

Ácido acético 5% P.A Dinâmica Química Contemporânea[®] LTDA (São Paulo, SP); ácido cítrico anidro P.A Neon Comercial[®] LTDA (Suzano, SP); ácido clorídrico 37% P.A Química moderna Industria e Comércio[®] LTDA (Barueri, SP); ácido nítrico Sciavicco Comércio e Indústria[®] LTDA (Sabará, MG); biftalato de potássio P.A Dinâmica Química Contemporânea[®] LTDA (São Paulo, SP); citrato de sódio P.A. Vetec Química Fina[®] LTDA (Rio de Janeiro, RJ); cloreto de potássio P.A. Dinâmica Química Contemporânea[®] LTDA

(São Paulo, SP); fosfato de potássio monobásico anidro P.A. Vetec Química Fina[®] LTDA (Rio de Janeiro, RJ); hidróxido de sódio P.A. Dinâmica Química Contemporânea[®] LTDA (São Paulo, SP); metanol P.A. Dinâmica Química Contemporânea[®] LTDA (São Paulo, SP). Amostras (matéria-prima, padrão e excipientes): amido Henrifarma[®] (São Paulo, SP); alopurinol matéria-prima, lote: 16402-3004+-009738 validade: 27/01/2020; alopurinol padrão secundário, Lote: 15062710B, fornecedor: Fagron[®] teor: 98,6%; Estearato Fragon SM empreendimentos farmacêuticos[®] (Anápolis, GO); Lactose Henrifarma[®] (Cambuci, São Paulo, SP).

4.2 EQUIPAMENTOS

Os equipamentos utilizados nos ensaios estão descritos a seguir:

Balança Sartorius[®] CP225D (Gotinga, Alemanha); balança Sartorius[®] ALC (Gotinga, Alemanha); balança analítica Marte[®] LTDA (Santa Rita do Sapucaí, MG); banho-maria Ethik Technology[®] (Vargem Grande Paulista, SP); calorímetro exploratório diferencial (DSC) Netzsch[®] Syrius 3500 (São Paulo, SP, Brasil); calorímetro exploratório diferencial (DSC) T.A. Instruments[®] Q20 (New Castle, Inglaterra); difratômetro de Raios-X de pó Rigaku[®] Ultima IV (tipo II) (Tóquio, Japão); dissolutor Eletrolab[®] EDT-08LX (Mumbai, Índia); estufa Marconi[®] (Piracicaba, SP); estufa de dessecação Ethik Technology[®] 400 2ND (Vargem Grande Paulista, SP); estufa de estabilidade Ethik Technology[®] (Vargem Grande Paulista, SP); mesa agitadora orbital com controle de temperatura Marconi[®] (Piracicaba, SP); espectrofotômetro Shimadzu[®] (Tamboré, SP); filtros PTFE Microlab Scientific[®] (Mongkok, Kowloon Hong Kong); filtro de papel quantitativo C40 faixa branca/filtro redondo/filtração média – lote: 195601214; cromatógrafo líquido Shimadzu[®] Class – VP (Tamboré, SP) com módulos desgaseificador modelo DGU14A, bomba LC-10AD vp, forno CTO-10A vp, detector SPD-10A e controlador SCL-10 A vp; cromatógrafo líquido LC-Solution Shimadzu[®] (Tamboré, SP) com módulos desgaseificador DGU20A, bomba LC-20AD vp, forno CTO-20A vp, detector SPD-M20 A, injetor automático SIL-20Acht e controlador CBM-20A vp ; espectrofotômetro de infravermelho Shimadzu[®] FTIR–ATR affinity (Tamboré, SP); mesa de agitação Solab[®] (Piracicaba, SP); moinhos de bolas Vibrator GDR[®]; equipamento de termogavimetria (TG) T.A. Instruments[®] SDT Q600 (New Castle, Inglaterra); peagâmetro Marconi[®] PA 200 – Sartorius[®] (Gotinga, Alemanha); sistema de filtração a vácuo Logen Scientific[®]; sistema de purificação de água Gehaka[®] OS20LXE (São Paulo, SP); ultrassom UNIQUE[®] USC 2800 A (Indaiatuba, SP).

4.3 OTIMIZAÇÃO DE MÉTODO ANALÍTICO POR CLAE

Inicialmente, as seguintes características do analito foram pesquisadas na literatura: pKa, log P, solubilidade, peso molecular, propriedades espectrais e métodos de análise descritos.

O estudo das metodologias descritas na literatura foi realizado a partir de consultas em farmacopeias e na base de dados *Scopus* (2019) pelas palavras-chave “*allopurinol, validation, determination* e API” e foram selecionados os principais artigos que descrevem métodos para determinação do fármaco alopurinol.

Após levantamento das informações, foram preparadas soluções na concentração de 20 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ em solventes nos quais o analito apresentou solubilidade adequada. Foram então realizadas varreduras espectrais em espectrofotômetro no intervalo de 200 a 400 nm para se analisar o comportamento de absorbância do alopurinol a partir deste intervalo e escolha de comprimento de onda adequado. Após definição de solvente e comprimento de onda adequados, as soluções foram então injetadas em cromatógrafo a líquido, utilizando condições de análise descritas na literatura. As condições foram então alteradas até que se observassem respostas satisfatórias: baixo tempo de retenção, fator de capacidade acima de 2,0, resolução acima de 2,0, pratos teóricos acima de 2000 e assimetria abaixo de 2,0 (FDA, 1994).

Amostras de degradação forçada foram produzidas para desenvolvimento de método indicativo de estabilidade. Os estudos de degradação forçada foram conduzidos de acordo com as diretrizes do ICH (ICH; 2003; ICH; 2006) e da resolução n° 318 de 2019 (BRASIL; 2019). Em consonância com as diretrizes, foram realizados estudos em apenas um lote do insumo farmacêutico ativo, estudando-se os efeitos da temperatura, da umidade, da oxidação, da luz e a susceptibilidade à hidrólise em ampla faixa de valores de pH.

As amostras foram submetidas às seguintes condições descritas a seguir:

- a) hidrólise ácida: uma solução de alopurinol na concentração de 1 mg.mL^{-1} em ácido clorídrico 1 mol.L^{-1} foi aquecida a 40°C em estufa durante 24 horas. A solução foi diluída até concentração de 20 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ e injetada no cromatógrafo;
- b) hidrólise básica: uma solução de alopurinol na concentração de 1 mg.mL^{-1} em hidróxido de sódio 1 mol.L^{-1} foi aquecida a 40°C em estufa durante 24 horas. A solução foi diluída até concentração de 20 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ e injetada no cromatógrafo;
- c) fotólise: 10 mg de alopurinol foi exposto a luz ultravioleta dentro de uma câmara de UV à temperatura ambiente. A amostra foi diluída para concentração de 20 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ e injetada no cromatógrafo;

- d) degradação térmica: 10 mg de alopurinol foram acondicionados em estufa a 80°C por 24 horas. A amostra foi diluída para concentração de 20 µg.mL⁻¹ e injetada no cromatógrafo;
- e) oxidação: uma solução de alopurinol na concentração de 1 mg.mL⁻¹ em solução de H₂O₂ 10 %, no qual foi aquecida a 40°C em estufa durante 24 horas. A solução foi diluída até concentração de 20 µg.mL⁻¹ e injetada no cromatógrafo.

As condições de estresse foram definidas para se obter degradação satisfatória. Em observância ao descrito por Blessy e colaboradores (2014), uma degradação entre 5% e 20% foi aceita como razoável para posterior desenvolvimento e validação do método indicativo de estabilidade.

Após desenvolvimento e otimização, o preparo de soluções de alopurinol foi realizado da seguinte forma: transferiu-se 10 mg de alopurinol para balão volumétrico de 50 mL, adicionou-se 3 mL de NaOH 1,0 mol.L⁻¹, levou-se ao ultrassom por 10 minutos, completou-se com solvente tampão fosfato pH 5,25 e diluiu-se com o mesmo solvente.

As seguintes condições cromatográficas foram utilizadas: fase móvel constituída de tampão fosfato (pH 5,25 e força iônica 0,1 mol.L⁻¹) e metanol (95:5 v/v), fluxo de 1 mL.min⁻¹, detecção em 230 nm e 250 nm, temperatura de 25 °C e coluna C18 com dimensões de 150 x 4,6 mm e partículas com tamanho de 5 µm.

O método descrito no parágrafo anterior foi otimizado a partir do método farmacopeico descrito na Farmacopeia Americana (USP, 2017), pois o método farmacopeico utiliza 100% de solução de fosfato de potássio como fase móvel, o que apresenta desvantagens, tais como: ausência de tamponamento efetivo da fase móvel e possibilidade de causar danos na coluna. Além disso, o método farmacopeico utiliza detecção em 230 nm. Como se trata da proposição de um novo método, uma validação completa foi realizada de acordo com as exigências da RDC 166 (BRASIL, 2017).

4.4 VALIDAÇÃO ANALÍTICA

4.4.1 Seletividade

A seletividade do método foi demonstrada pela ausência de interferência dos produtos de degradação do alopurinol no método analítico. Foram utilizadas as amostras de degradação forçadas descritas no item 4.3.

Adicionalmente, o método foi validado para doseamento de alopurinol em comprimidos. Sendo assim, a seletividade para os excipientes presentes em comprimidos também foi avaliada.

O medicamento referência para comprimidos de alopurinol (300 mg) é o Zyloric® 300 mg, o qual possui em sua composição os seguintes excipientes: lactose, amido, polivinilpirrolidona e estearato de magnésio. Considerando que o peso médio de formulações de comprimidos de alopurinol pode chegar até 542 mg (RIBEIRO; SILVA, 2018), cada comprimido pode conter até 242 mg de excipientes (44,65% do peso do comprimido). Sendo assim, foi preparada uma mistura contendo proporções usuais destes excipientes: 28,5 % de lactose, 10,25% de amido, 5 % de polivinilpirrolidona e 1 % de estearato de magnésio em relação ao peso médio do comprimido. Esta mistura foi denominada de placebo.

Para demonstrar a seletividade do método frente aos excipientes presentes em comprimidos, foram preparadas três soluções independentes do padrão (a 20 $\mu\text{g. mL}^{-1}$) e três soluções independentes do padrão adicionado de placebo (padrão a 20 $\mu\text{g. mL}^{-1}$ + placebo a 20 $\mu\text{g. mL}^{-1}$ no mesmo balão volumétrico). A possível interferência dos excipientes foi avaliada através de análise estatística (comparação das respostas das três soluções do padrão com as respostas das três soluções do padrão adicionado de placebo) através do teste *t de Student*.

4.4.2 Linearidade e Faixa de trabalho

Para avaliação da linearidade, foram preparadas cinco concentrações diferentes da SQR de alopurinol em triplicata (réplicas independentes). Inicialmente, pesou-se 10 mg de alopurinol SQR, transferiu-se para balão volumétrico de 250 mL e dissolveu-se em tampão fosfato pH 5,25. A solução foi então diluída para as concentrações de 8,0 (40%); 12,0 (60%); 16,0 (80%); 20,0 (100%) e 24,0 (120%) $\mu\text{g. mL}^{-1}$. O mesmo procedimento foi repetido em outros dois dias consecutivos.

Os seguintes dados foram apresentados: (1) representação gráfica das respostas em função da concentração do analito; (2) gráfico de dispersão dos resíduos, acompanhado de sua avaliação estatística; (3) equação da reta de regressão de y em x, estimada pelo método dos mínimos quadrados; (4) avaliação da associação linear entre as variáveis por meio dos coeficientes de correlação (r, o qual deve estar acima de 0,990) e de determinação (r^2); (5) investigação da homocedasticidade dos dados utilizando um nível de significância de 5%; (6) avaliação da significância do coeficiente angular (o coeficiente angular deve ser significativamente diferente de zero).

Todos os cálculos para a avaliação da linearidade foram realizados a partir dos dados de concentrações reais e respostas analíticas individuais.

A faixa de trabalho foi estabelecida a partir dos estudos de linearidade, juntamente com os resultados de precisão e exatidão.

4.4.3 Efeito Matriz

Para avaliação do efeito matriz em relação aos produtos de degradação, foi preparada uma curva da matéria-prima degradada fortificada com a SQR do analito (5 concentrações em triplicata, de 40% a 120% da concentração do teste). A matéria-prima degradada foi obtida por uma mistura de amostras obtidas nas condições de degradação forçada descritas na seção 4.3 na proporção de 1:1:1:1:1 v/v. O mesmo procedimento foi repetido em outros dois dias consecutivos.

Para avaliação do efeito matriz em relação aos excipientes foi preparada uma curva do placebo fortificado com a SQR do analito (5 concentrações em triplicata, de 40% a 120% da concentração do teste de linearidade). O mesmo procedimento foi repetido em outros dois dias consecutivos.

O efeito de matriz foi determinado por meio da comparação estatística (teste *t de Student*) entre os coeficientes angulares das curvas construídas com a SQR do analito e das curvas construídas com as amostras fortificadas.

4.4.4 Precisão

A precisão foi avaliada aos níveis de repetibilidade e precisão intermediária.

A repetibilidade foi avaliada sob as mesmas condições de operação, mesmo analista e mesma instrumentação, em uma única corrida analítica, utilizando nove determinações (concentrações baixa, média e alta, com três réplicas em cada nível). As amostras para avaliação da precisão foram preparadas de maneira independente desde o início do procedimento descrito no método.

A precisão intermediária foi avaliada repetindo o procedimento de repetibilidade no mesmo laboratório em um dia diferente por um analista diferente.

Para determinação de precisão, adicionou-se a SQR de alopurinol nas concentrações de 8,0; 20,0 e 24,0 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ nas amostras de: 1) matéria-prima degradada e 2) placebo. Em cada nível de concentração, as amostras foram preparadas em triplicata de maneira independente.

A repetibilidade foi demonstrada pelo cálculo do desvio padrão relativo (DPR) das recuperações das três determinações de cada concentração.

A precisão intermediária foi demonstrada pelo cálculo do desvio padrão relativo (DPR) das recuperações das seis determinações de cada concentração (considerando os resultados obtidos em dois dias diferentes por analistas diferentes).

Considerando a proporção de princípio ativo nos comprimidos de alopurinol (aproximadamente 45%), o limite aceitável adotado foi de DPR inferior a 2,8% em cada nível de concentração. Para matérias-primas na presença de produtos de degradação, o limite aceitável adotado foi de DPR inferior a 2,0% em cada nível de concentração.

4.4.5 Exatidão

A exatidão foi verificada a partir de nove determinações: baixa, média e alta, com três réplicas em cada nível. As amostras para avaliação da exatidão foram preparadas de maneira independente.

Para avaliação da exatidão, adicionou-se a SQR de alopurinol nas concentrações de 8,0; 20,0 e 24,0 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ nas amostras de: 1) matéria-prima degradada e 2) placebo.

A porcentagem de recuperação, no caso de adição de SQR em matéria-prima degradada, foi calculada através da seguinte fórmula:

$$\% \text{ recuperação} = \frac{Ca - Cna}{CT} \times 100$$

Em que: Ca é a concentração experimental da amostra adicionada de SQR em cada nível de concentração, Cna é a concentração da amostra não adicionada de SQR e CT é a concentração teórica de SQR adicionada em cada nível de concentração.

A porcentagem de recuperação, no caso de adição de SQR ao placebo, foi calculada através da seguinte fórmula:

$$\% \text{ recuperação} = \frac{\text{Concentração experimental}}{\text{Concentração teórica}} \times 100$$

Considerando a proporção de princípio ativo nos comprimidos de alopurinol (aproximadamente 45%), o limite aceitável para recuperação foi entre 98-102% em cada nível de concentração para os dois tipos de ensaios de exatidão.

4.4.6 Limite de detecção

O limite de detecção foi determinado com base nos parâmetros da curva analítica, calculado pela fórmula: $LD = (3,3 \times \sigma)/IC$, em que: σ é o desvio padrão residual da linha de regressão e IC é a inclinação da curva do estudo de linearidade.

4.4.7 Limite de quantificação

O limite de quantificação foi determinado com base nos parâmetros da curva analítica, calculado pela fórmula: $LQ = (10 \times \sigma)/IC$, em que: σ é o desvio padrão residual da linha de regressão e IC é a inclinação da curva do estudo de linearidade.

4.4.8 Robustez

A robustez foi avaliada através de pequenas e deliberadas variações nos parâmetros do método, calculando a recuperação das amostras após cada alteração. O limite de recuperação aceitável está entre 98-102%, os mesmos parâmetros de avaliação de exatidão. Porém, foi determinado também um estudo estatístico por teste *t de student* para avaliação dos dados.

Os parâmetros que foram alterados estão descritas no Quadro 1.

Quadro 1 – Condições que foram alteradas para avaliação da robustez do método.

		Condições ótimas	Condições testadas
Preparo das Amostras	Tempo de extração	10 minutos	8 minutos
	pH da fase móvel	5,25	5,15 e 5,35
Parâmetros cromatográficos	Temperatura	25 °C	30 °C
	Diferentes lotes ou fabricantes de colunas	Symmetry®	Macherey-Nagel®

Fonte: do autor.

Nota: as amostras e padrões em cada condição foram preparadas em triplicata de maneira independente.

4.5 OBTENÇÃO DE FORMAS SÓLIDAS

As tentativas de obtenção de diferentes formas sólidas de alopurinol foram realizadas objetivando a formação de sais de cloridrato, acetato, sódico e fosfato.

As condições testadas a partir dos códigos citados foram:

- a) ALOCL 1: solubilizou-se 29,8 mg de alopurinol (lote: 162616) em 200 mL de ácido clorídrico 1,0 mol.L-1. A solução foi transferida para secar em estufa a 40 °C durante uma semana até restar um volume entre 5 a 10 mL. Depois transferiu-se para geladeira a 3,9 % UR e 3,7 °C. Após duas semanas, a solução foi filtrada, o pó coletado foi lavado com acetona, secado em dessecador à vácuo e analisado por DXRP;
- b) ALOCL 2: pesou-se aproximadamente 30,0 mg de alopurinol (Lote: 181514) e solubilizou-se em 20 mL de ácido clorídrico 1,0 mol.L-1 a 40 °C. Depois transferiu-se para geladeira a 3,9 % UR e 3,7 °C. Após duas semanas, a solução foi filtrada, o pó coletado foi secado em dessecador à vácuo e analisado por DRPX;
- c) ALOACE 1: solubilizou-se 31,0 mg de alopurinol (lote: 162616) em 250 mL de ácido acético 1,0 mol.L-1. Deixou-se secar em estufa a 40 °C (dia: 17/07/18). O pó coletado em 31/07/2018 foi lavado com acetona, secado em dessecador à vácuo e analisado por DRXP;
- d) ALOACE 2: transferiu-se 30 mg de alopurinol para bécker de 25 mL, adicionou-se ácido acético 1,0 mol.L-1 e aqueceu em estufa a 40 °C até solubilização. Transferiu-se a solução para a geladeira, cobriu-se com plástico filme, o qual foi perfurado. Depois de um dia observou-se recristalização na forma de pó. Após duas semanas, a solução foi filtrada, o pó coletado foi secado em dessecador à vácuo e analisado por DRXP;
- e) ALONa 1: Adicionou-se quantidade suficiente de hidróxido de sódio 1,0 mol.L-1 capaz de solubilizar 27,5 mg de alopurinol (lote: 181514). Em seguida, adicionou-se 10 mL de acetona e agitou-se, onde se observou formação de cristais. Transferiu-se para a geladeira para melhor rendimento. Após 2 semanas, coletou-se o pó formado (65 mg) filtrando em papel de filtro, lavou-se o pó remanescente com acetona e deixou-se secando em estufa. O rendimento foi bem maior do que o esperado. O pó foi analisado por DRXP;
- e) ALOFOS 1: Transferiu-se 30 mg de alopurinol para bécker de 25 mL e adicionou-se 20 mL de ácido fosfórico 1,0 mol.L-1. A solução foi levada para estufa a 40 °C até completa solubilização. Transferiu-se o bécker para a geladeira tampado com plástico filme perfurado. Depois de um dia, observou-se recristalização na forma de pó. Para

melhor rendimento, deixou-se na geladeira por 2 semanas. Filtrou-se e o pó foi analisado por DRXP.

4.6 CARACTERIZAÇÃO DE FORMAS SÓLIDAS

4.6.1 Difração de Raios-X por pó (DRXP)

As análises foram realizadas em difratômetro com detector de cintilação e radiação de Cu monocromatizada, proveniente de um tubo selado de grafite ($\text{CuK}\alpha$, $\lambda = 1,54187 \text{ \AA}$). Inicialmente, as amostras foram colocadas individualmente sobre lâmina de vidro e inseridas no suporte de amostra do difratômetro. As varreduras foram realizadas entre o intervalo de 5 a $35^\circ 2\theta$ utilizando fenda de 10 mm , à temperatura ambiente, com passo óptico de $0,02^\circ$ em 2θ , corrente de 30 MA , tensão de 40 KV e velocidade de varredura de $1^\circ 2\theta/\text{min}$.

4.6.2 Espectroscopia de infravermelho (IV)

As análises foram realizadas em espectrofotômetro de infravermelho por transformada de Fourier com a utilização de módulo de refletância total atenuada (ATR). Os dados foram coletados a temperatura ambiente, na região do infravermelho entre $4000\text{-}600\text{-cm}^{-1}$, no modo transmitância, com resolução de $4,0 \text{ cm}^{-1}$ e 32 scans.

4.6.3 Análises Térmicas

Análises por DSC foram realizadas pesando-se cerca de 6 mg de amostra em painéis de alumínio, as quais foram posteriormente fechadas e analisadas. As medidas foram realizadas na faixa de 30 a 400°C , sob atmosfera de nitrogênio ($50 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$) e taxa de aquecimento de $10^\circ\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$.

Análises por TG foram realizadas pesando-se cerca de 11 mg de amostra em painéis de alumina (óxido de alumínio) abertas. As medidas foram realizadas no intervalo de 30 a 500°C , sob atmosfera de nitrogênio gasoso ($50 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$) e taxa de aquecimento de $10^\circ\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$.

4.7 HOMOGENEIZAÇÃO DO TAMANHO DE PARTÍCULAS

A partir dos resultados dos estudos de caracterização, as amostras de alopurinol selecionadas para estudos posteriores foram tamisadas a fim de homogeneizar o tamanho das partículas, para evitar possíveis influências nos estudos de estabilidade acelerada, solubilidade e dissolução intrínseca. Foram selecionadas as frações de tamanho de poros entre 150 μm (100 mesh) e 106 μm (150 mesh) para os estudos de estabilidade, solubilidade e dissolução intrínseca.

4.8 ESTUDOS DE ESTABILIDADE ACELERADA

As formas sólidas foram acondicionadas em câmara climática a $40\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C} / 75\% \text{ UR} \pm 5\% \text{ UR}$. Os seguintes testes foram realizados nos tempos 0 (zero), 3 (três) e 6 (seis) meses após acondicionamento das amostras: doseamento do IFA e DRXP de acordo com as condições descritas.

4.9 ESTUDOS DE SOLUBILIDADE

Os ensaios foram realizados em triplicata, adicionando-se excesso de cada forma sólida (até que fosse observado corpo de fundo) em frascos contendo 10 mL de solventes com pH controlado: tampão fosfato pH 6,8 ($322,4 \text{ mmol.L}^{-1}$), tampão acetato pH 4,5 ($24,7 \text{ mmol.L}^{-1}$), tampão citrato pH 3,4 (438 mmol.L^{-1}), tampão HCl pH = 1,2 (135 mmol.L^{-1}) e água obtida por sistema de osmose reversa (pH entre 5 e 7). Posteriormente, as soluções foram agitadas sob temperatura controlada (25°C e $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$) por até 72 horas. Nos intervalos de tempo de 24, 48 e 72 horas, alíquotas de 1 mL de amostra foram coletadas, diluídas em tampão fosfato pH 5,25 (100 mmol.L^{-1}), e quantificadas por cromatografia líquida de alta eficiência, utilizando método validado (seção 4.4). Em cada amostragem a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$, também foram observados o padrão de difração de pó do sólido remanescente, para verificar se não houve aparecimento de outra fase sólida.

4.10 DISSOLUÇÃO INTRÍNSECA

As condições dos ensaios de dissolução intrínseca foram baseadas nas recomendações da *United States Pharmacopeia* (USP, 2017) para teste de dissolução intrínseca pelo método de disco rotatório. Também considerou-se o trabalho de Dezani et al. (2013).

Inicialmente, foram realizados alguns estudos de dissolução intrínseca com objetivo de otimizar as condições de ensaio. Foram testados três diferentes meios aquosos: tampão HCl pH 1,2 (135 mmol.L⁻¹), tampão acetato pH 4,5 (24,7 mmol.L⁻¹) e tampão fosfato pH 6,8 (322,4 mmol.L⁻¹). Uma quantidade de alopurinol suficiente para formar as pastilhas (70 mg) foi pesada e prensada, utilizando força de compressão na qual não se observou formação de sulcos nas pastilhas durante os ensaios (4 e 6 KN). Utilizou-se aparato denominado *holder* com uma área de superfície de 0,5 cm². O aparato contendo o disco do fármaco foi levado para o dissolutor com cubas contendo 900 mL de cada meio a temperatura de 37 °C ± 2 °C, e foi submetido à agitação de 75 ou 100 rpm. Os ensaios de otimização foram realizados em duplicata em cada condição testada. As amostras foram coletadas nos tempos de 60, 75, 90, 105 e 120 minutos, e foram quantificadas por cromatografia líquida de alta eficiência, utilizando o método validado (seção 4.4).

Após otimização de condições, foram realizados ensaios de dissolução intrínseca em triplicata para comparação entre as formas sólidas de alopurinol: ALOBL e ALOCL. As seguintes condições foram utilizadas: três diferentes meios aquosos (tampão HCl pH 1,2, 135 mmol.L⁻¹; tampão acetato pH 4,5, 24,7 mmol.L⁻¹ e tampão fosfato pH 6,8, 322,4 mmol.L⁻¹) a temperatura de 37 °C ± 2 °C, força de compressão de 6 KN e velocidade de agitação de 100 rpm. As amostras foram coletadas nos tempos de 60, 75, 90, 105 e 120 minutos, e foram quantificadas por cromatografia líquida de alta eficiência, utilizando o método validado (seção 4.4). O pó remanescente foi coletado e analisado por DRXP.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 VALIDAÇÃO ANALÍTICA

5.1.1 Otimização

Realizou-se um levantamento bibliográfico das condições cromatográficas descritas na literatura para análise de alopurinol.

As condições descritas nas farmacopeias pesquisadas são:

- a) Farmacopeia Brasileira (2017): através do teste de dissolução, que é realizado pela quantificação por espectrofotometria na região do UV utilizando ácido clorídrico 0,01 M como solvente e leitura em 250 nm; 900 mL de ácido clorídrico 0,01 M como meio de dissolução; aparato pá a 75 rpm; Impurezas: CLAE com detecção em 230 nm, coluna C18, 250 mm x 4,6 mm x 5 µm; fluxo de 1 mL/minuto. Eluição por gradiente (30 minutos) utilizando metanol e fosfato de potássio monobásico 0,125% p/v;
- b) USP (2017): método por CLAE; fase móvel: fosfato de potássio monobásico 1,4 g.L⁻¹ em água; solvente: NaOH 1 mol.L⁻¹ e depois completar com fase móvel; sistema cromatográfico: coluna 4,6 mm x 25 cm x 5 µm, detecção em 230 nm, empacotamento C-18, fluxo de 1,8 mL.min⁻¹ e volume de injeção de 20 µL;
- c) European Pharmacopoeia (2008): espectrofotometria com detecção máxima em 250 nm e mínima em 230 nm; solvente: solubilizar com hidróxido de sódio 4 g.L⁻¹, completar com ácido clorídrico 10,3 g. L⁻¹;
- d) British Pharmacopoeia (2017): método por CLAE; fase móvel: fosfato de potássio monobásico 1,4 g.L⁻¹; solvente: diluir alopurinol em 5 mL de NaOH 1 mol.L⁻¹, depois completar com fase móvel; sistema cromatográfico: coluna 4,6 mm x 25 cm x 5 µm, detecção em 230 nm, empacotamento C18, fluxo de 1,4 mL.min⁻¹ e volume de injeção de 20 µL.

Além das condições descritas nos métodos farmacopeicos, outras condições para determinação do alopurinol foram consultadas na base de dados *Scopus* (2019). Foram realizadas buscas a partir das palavras-chaves: “*allopurinol, validation, determination*”, na qual foram encontrados 130 artigos quando se combinam as palavras-chaves “*allopurinol and validation*” e 562 artigos quando se combinam as palavras-chaves “*allopurinol and determination*”, sendo um artigo encontrado quando se associam as três palavras-chaves descritas. Das buscas, foram selecionados 182 artigos com descrição no título e no resumo

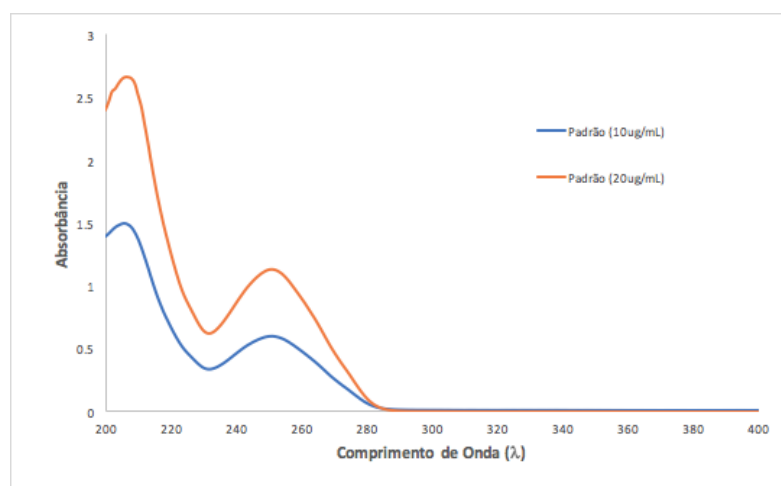
pelas palavras-chaves acima, e com uma leitura dinâmica foram separados 36 artigos, dos quais 14 artigos descrevem a determinação de alopurinol entre 1999 a 2019.

A partir de uma análise das condições descritas nas principais farmacopeias e nos principais métodos da literatura, observou-se que diversos tampões são utilizados nos métodos cromatográficos. As principais monografias (USP, 2017; BRITISH Pharmacopoeia, 2017) utilizam como fase móvel o tampão fosfato de potássio monobásico e comprimento de onda de detecção em 230 nm. Fuchs et al. (1999) e Stamp et al. (2011) também utilizam sistema de fase móvel constituído de sais de fosfato, porém trabalham em comprimentos de onda de detecção em 252 e 254 nm, respectivamente, e em pHs de fase móvel mais ácidos (3,0 e 3,5, respectivamente).

A partir dessas informações, inicialmente foi utilizado como solvente tampão fosfato pH 5,4 (250 mmol.L^{-1}), o qual foi preparado como descrito na USP (2017). Entretanto, foi observado que o alopurinol não solubiliza diretamente no tampão escolhido. Sendo assim, foi necessário solubilizar o alopurinol inicialmente com adição 3 mL de NaOH $1,0 \text{ mol.L}^{-1}$ e depois completar com o solvente adequado (tampão de pH entre 4,0 e 7,0), utilizando o mesmo solvente nas diluições.

Devido à utilização de diferentes comprimentos de onda para detecção de alopurinol descritos na literatura, foram realizadas varreduras espectrais em espectrofotômetro para se verificar os possíveis comprimentos de onda que poderiam ser utilizados na validação do método. Foram testadas duas concentrações (10 e $20 \text{ } \mu\text{g.mL}^{-1}$) de alopurinol SQR. Os resultados estão demonstrados na figura 5.

Figura 5 – Espectros de absorção de soluções padrões de alopurinol SQR a $10 \text{ } \mu\text{g.mL}^{-1}$ e $20 \text{ } \mu\text{g.mL}^{-1}$ no intervalo de 200 a 400 nm.



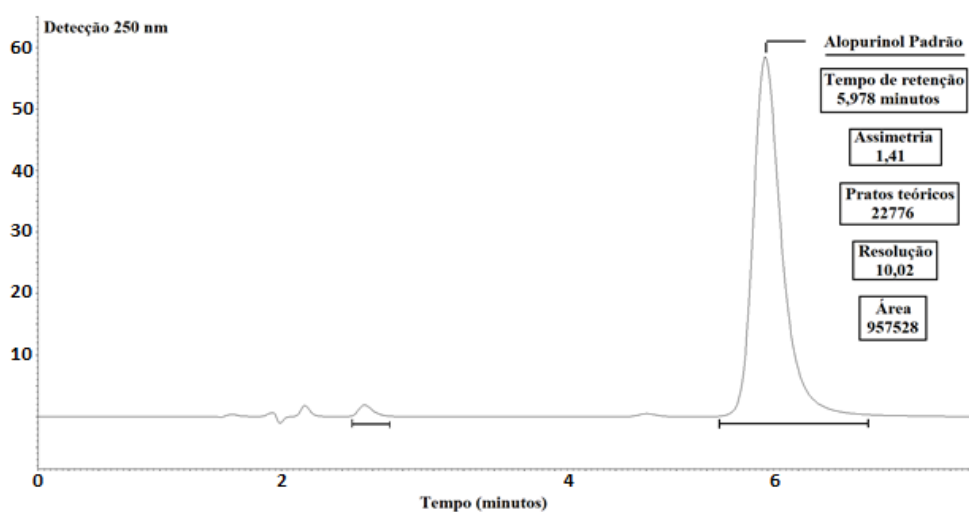
Fonte: do autor.

Conforme apresentado na Figura 5, as soluções de alopurinol demonstraram máximos de absorção em torno de 210 nm e 250 nm. Considerando que pode ocorrer interferência de alguns solventes no comprimento de onda de 210 nm, provavelmente o comprimento de onda adequado para quantificação do analito é 250 nm. Entretanto, vários trabalhos utilizam o comprimento de onda de 230 nm para quantificação de alopurinol. Portanto, neste trabalho os estudos de validação analítica foram realizados em ambos comprimentos de onda (230 e 250 nm), comparando-se os resultados obtidos. A partir do levantamento das condições descritas na literatura, foram selecionadas colunas da marca Waters Symmetry® (lote: 0206360031; aquisição: 5/2005) do tipo octadecilsilano (C18), com partículas de 5 µm, comprimento de 150 mm e diâmetro interno de 3,9 mm para estudos posteriores.

Foram testadas condições iniciais de fase móvel utilizando mistura de tampão fosfato pH 5,4 e metanol. Observou-se que, com uma proporção de 5% de metanol e 95 % de tampão fosfato pH 5,4, o pico do alopurinol apresentou-se com tempo de retenção adequado para análise. Porém, os valores de assimetria não se demonstraram aceitáveis de acordo com a literatura (assimetria < 2,0). Com isso, se fez um ajuste no pH do tampão a fim de resolver esse problema, chegando a um pH de 5,25.

As condições utilizadas nos estudos de validação foram: tampão fosfato (pH 5,25 e força iônica 100 mmol.L⁻¹) - metanol (95:5 v/v) como fase móvel, fluxo de 1 mL.min⁻¹ e temperatura de 25 °C. Os comprimentos de onda de 250 nm e 230 nm foram estudados durante a validação. O cromatograma a partir das condições descritas está representado na figura 6 a seguir.

Figura 6 – Cromatograma de alopurinol SQR com detecção em 250 nm.



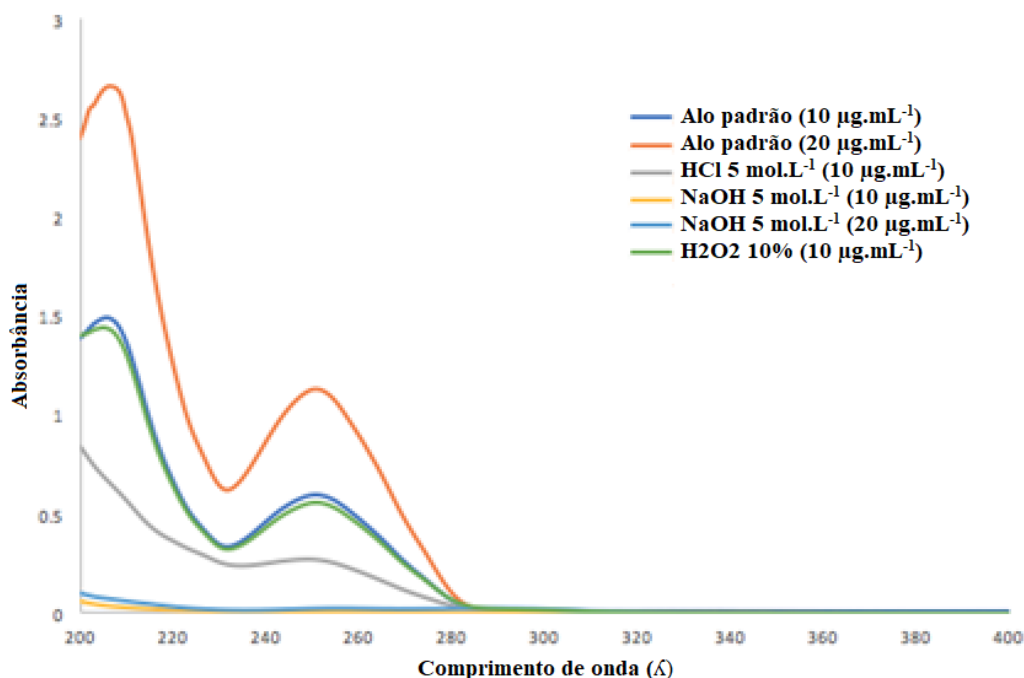
Fonte: do autor.

5.1.2 Seletividade

Para a avaliação da seletividade, foram realizadas análises de soluções de alopurinol SQR e todos os possíveis interferentes, tais como produtos de degradação e excipientes (amido, lactose, estearato de magnésio e polivinilpirrolidona) nos dois comprimentos de onda estudados.

Inicialmente, foram realizadas varreduras espectrais no intervalo de 200 a 400 nm em soluções de alopurinol SQR nas concentrações de 10 e 20 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, e em soluções de alopurinol na presença de produtos de degradação, a partir de ensaios de degradação em meio ácido (utilizando solução de HCl 5 mol.L^{-1}), em meio básico (utilizando NaOH 5 mol.L^{-1}) e em solução oxidativa (utilizando solução de H_2O_2 a 10 %). Os resultados estão demonstrados na Figura 7.

Figura 7 – Espectros de varredura das soluções padrões de Alopurinol a 10 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ e 20 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ e de soluções de degradação do fármaco em HCl 5 mol.L^{-1} (10 $\mu\text{g.mL}^{-1}$), NaOH 5 mol.L^{-1} (10 $\mu\text{g.mL}^{-1}$), NaOH 5 mol.L^{-1} (20 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) e H_2O_2 10 % (10 $\mu\text{g.mL}^{-1}$).



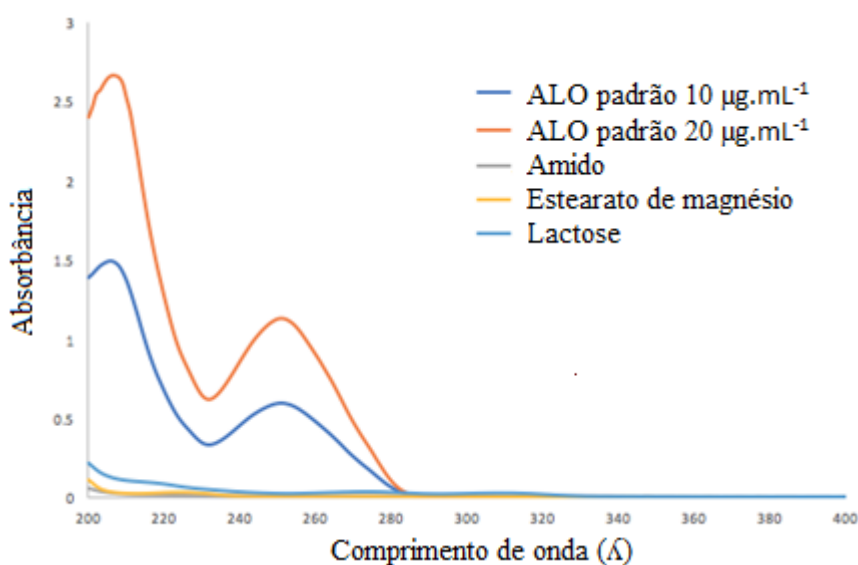
Fonte: do autor (2019)

De acordo com a figura 7, pode-se observar que o espectro de absorção do alopurinol submetido à degradação em solução oxidativa (H_2O_2 10%) permaneceu praticamente inalterado quando comparado com o espectro de soluções de alopurinol puro. Porém, nos meios ácidos e básicos a curva de absorção foi alterada, provavelmente devido a uma

degradação do fármaco nesses meios. Como o método de análise é cromatográfico, a pureza do pico é necessária para se comprovar a separação do alopurinol em relação aos possíveis produtos de degradação.

Os excipientes utilizados em formulações de comprimidos de alopurinol 300 mg (dosagem mais alta) foram adequadamente diluídos em tampão fosfato pH 5,25 (100 mmol.L⁻¹). Foram então realizadas varreduras espectrais das soluções de excipientes, em comparação com soluções de alopurinol SQR nas concentrações de 10 e 20 µg.mL⁻¹. Os resultados estão demonstrados na Figura 8.

Figura 8 – Espectros de absorção das soluções padrões de alopurinol a 10 µg.mL⁻¹ e 20 µg.mL⁻¹, em relação às soluções de amido (10 µg.mL⁻¹), estearato de magnésio (20 µg.mL⁻¹) e lactose (20 µg.mL⁻¹).



Fonte: do autor (2019).

A partir dos resultados demonstrados na figura 8, observou-se que a absorbância dos componentes em 250 nm produziu interferência menor que 1% em relação ao pico do alopurinol, o que não foi observado em 230 nm, onde a interferência dos excipientes foi maior que 1% nas duas concentrações estudadas. Como o método de análise é cromatográfico, a pureza do pico é necessária para se comprovar a separação do alopurinol em relação aos possíveis interferentes, principalmente no comprimento de onda de 230 nm.

A partir dos resultados de varreduras espectrais, foram realizadas análises de soluções de alopurinol SQR; soluções de alopurinol SQR contendo produtos de degradação e soluções de alopurinol SQR contendo excipientes por cromatografia líquida de alta eficiência, utilizando o método otimizado. Foram calculados parâmetros necessários para uma análise eficiente: fator

de assimetria, pratos teóricos, fator de capacidade e resolução. Os resultados estão descritos na Tabela 3.

Tabela 3 – Parâmetros cromatográficos do método desenvolvido para análise de alopurinol na presença de produtos de degradação e excipientes.

Amostra	Pratos Teóricos	Assimetria	Fator de Capacidade	Resolução
PD 230 nm	3339,92	1,36	6,76	2,73
PD 250 nm	3209,84	1,34	6,70	2,71
DG 230 nm	3335,37	1,37	6,60	2,73
DG 250 nm	3225,60	1,40	6,98	2,76
EXC 230 nm	3321,78	1,37	6,91	2,76
EXC 250 nm	3336,12	1,36	6,66	2,72

Fonte: do autor.

Legenda: PD 230 nm = solução de alopurinol padrão (SQR) ($20 \mu\text{g.mL}^{-1}$) analisada em 230 nm; PD 250 nm = solução de alopurinol padrão (SQR) ($20 \mu\text{g.mL}^{-1}$) analisada em 250 nm; DG 230 nm = solução de alopurinol padrão (SQR) ($20 \mu\text{g.mL}^{-1}$) com adição de solução amostra de degradação analisada em 230 nm; DG 250 nm solução de alopurinol padrão (SQR) ($20 \mu\text{g.mL}^{-1}$) com adição de solução amostra de degradação analisada em 250nm; EXC 230 nm = solução de alopurinol padrão (SQR) ($20 \mu\text{g.mL}^{-1}$) adicionada de excipientes e analisada em 230 nm; EXC 250 nm = solução de alopurinol padrão (SQR) ($20 \mu\text{g.mL}^{-1}$) adicionada de excipientes e analisada em 250 nm.

De acordo com os resultados da tabela 3, pode-se constatar que todos os parâmetros obedeceram aos limites de fator de assimetria, resolução, pratos teóricos e fator de capacidade preconizados pela literatura (FDA, 1994).

A seletividade pode ser avaliada quantitativamente através de valores de recuperação a partir de um valor teórico, utilizando abordagem estatística por dois métodos: pelo método segundo Gustavo Gonzalez (2007) ou pelo método de limites de especificação (PORTAL ACTION, 2018). O método de Gonzalez utiliza do valor *T de Student* ao nível de significância de 5% e o método de limites de especificação avalia a recuperação em função do limite especificado a partir do intervalo de confiança. A avaliação quantitativa da seletividade em relação aos produtos de degradação e em relação aos excipientes foi realizada em triplicata na concentração teórica de $20 \mu\text{g. mL}^{-1}$, e os resultados de recuperação estão demonstrados na Tabela 4.

Tabela 4 – Estudo de seletividade pela recuperação do alopurinol em presença de produtos de degradação (A) e matriz de excipientes (B).

Recuperação			
230 nm		250 nm	
A	B	A	B
99,01	96,56	98,63	97,37
99,39	98,02	98,21	98,95
101,65	100,16	100,39	99,27

Fonte: do autor (2019).

A partir dos resultados da Tabela 4 e de acordo com o método adotado por Gonzalez (2007) pelo teste *t de Student*, adotando-se uma média do padrão secundário de recuperação de 98,6 % (teor declarado no certificado de análise), e ao nível de significância de 0,05, verificou-se que não houve interferência de produtos de degradação na recuperação do alopurinol nos comprimentos de onda de 230 nm ($p = 0,9840$) e 250 nm ($p = 0,3013$), e também não houve interferência de matriz na recuperação do alopurinol nos comprimentos de onda de 230 nm ($p = 0,2359$) e 250 nm ($p = 0,1293$).

Para a farmacopeia USP (2017), o limite de especificação no ensaio de doseamento do alopurinol é de 98 a 102 % de recuperação para matéria-prima, e de 93 a 107 % de recuperação para produto acabado na forma comprimido. Pela análise de especificidade através do intervalo de confiança, as amostras de padrão em presença de produtos de degradação estão dentro do limite especificado para matéria-prima em 230 nm ($99,140 < \mu < 100,144$) e 250 nm ($98,215 < \mu < 99,804$), e as amostras com padrão adicionado na matriz de excipientes estão dentro do limite especificado para produto acabado em 230 nm ($95,561 < \mu < 99,448$) e em 250 nm ($97,373 < \mu < 99,164$).

Para confirmação da seletividade, utilizou-se o detector de arranjo de diodos (DAD) que mede a pureza do pico frente aos produtos de degradação. Os resultados estão demonstrados na Tabela 5.

Tabela 5 – Pureza do pico do alopurinol frente aos produtos de degradação.

Condição	230 nm			250 nm		
	Área	Coeluição com Impureza	Tempo Ret.** (minutos)	Área	Coeluição com Impureza	Tempo Ret.** (minutos)
Padrão 1	848585	ND	-	1371251	ND	-
Padrão 2	871512	ND	-	1404730	ND	-
Hidrólise ácida	722226	ND	2,38; 3,47	1165566	ND	2,38
Hidrólise alcalina	962010	ND	2,16	1425410	ND	3,10
Oxidação	842160	ND	1,91; 2,38; 3,50	1312818	ND	2,38; 3,10
Temperatura	793037	ND	-	1251337	ND	-
Fotolítica (254 nm)	821414	ND	-	1296114	ND	-

Fonte: do autor.

Legendas: ND, impureza não detectada; **Tempo ret, tempo de retenção de impurezas observadas nos cromatogramas.

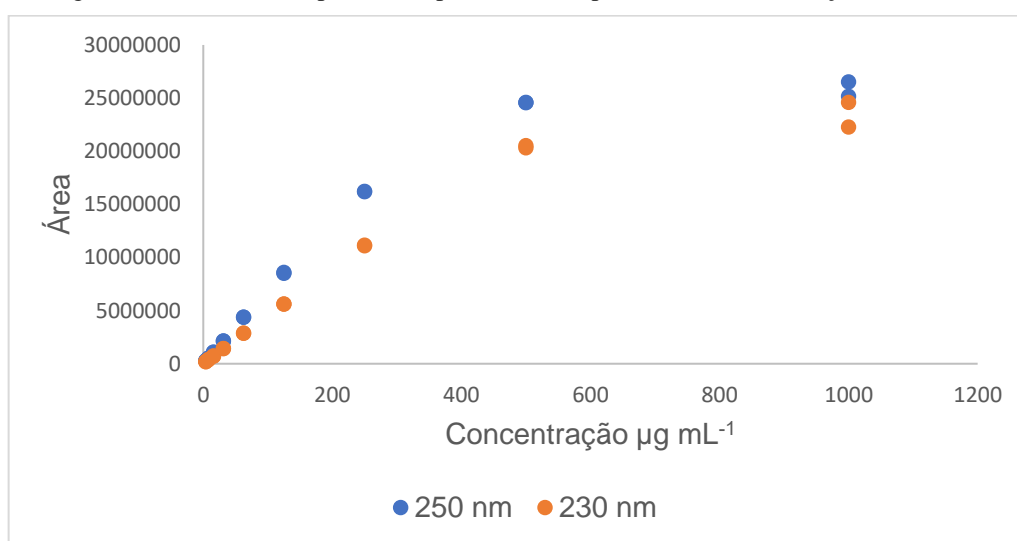
A partir dos resultados da Tabela 5, observou-se que o pico cromatográfico referente ao alopurinol se demonstrou puro na presença de produtos de degradação. As condições de degradação térmica e fotolítica não produziram picos de produtos de degradação, porém a área em relação ao alopurinol reduziu aproximadamente 10 % para degradação térmica e 7 % para a degradação fotolítica, provavelmente devido ao ensaio que foi realizado colocando o pó no vidro de relógio. Portanto, pode ter ocorrido perda de massa no processo de diluição.

Pelos resultados demonstrados, houve uma coerência entre os cálculos estatísticos utilizados por *t de Student* e limite de especificação para determinação quantitativa do alopurinol por esse método, além da pureza de pico demonstrada pelo CLAE acoplado a um detector DAD. O método, portanto, foi seletivo.

5.1.3 Linearidade

Para a determinação do parâmetro de linearidade do alopurinol, verificou-se primeiro o comportamento desse fármaco em ampla faixa de concentração teórica (3,90625 a 1000 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$), com o intuito de se estabelecer uma faixa de concentração adequada de trabalho. O ensaio foi realizado em duplicata em cada concentração e os resultados estão demonstrados na Figura 9.

Figura 9 – Gráfico de resposta do alopurinol em ampla faixa de concentração.



Fonte: do autor.

Visualmente, foi observado um comportamento linear da área do cromatograma em relação às concentrações até 500 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, em ambos os comprimentos de onda. Um melhor estudo foi realizado determinando o coeficiente de correlação linear para diferentes faixas de concentração do alopurinol. Os resultados estão demonstrados na Tabela 6.

Tabela 6 – Diferentes intervalos de linearidade do alopurinol.

230 nm			250 nm	
Intervalo de concentração	Equação da reta de regressão linear	r*	Equação da reta de regressão linear	r*
3,90625 – 1000	$y = 25469x + 542778$	0,9451	$y = 28041x + 1230042$	0,9063
3,90625 – 500	$y = 41124x + 240301$	0,9990	$y = 50557x + 927158$	0,9878
3,90625 – 250	$y = 44412x + 60010$	0,9999	$y = 65013x + 134473$	0,9996
3,90625 – 125	$y = 44819x + 46772$	0,9999	$y = 68483x + 21850$	0,9999
3,90625 – 62,5	$y = 45508x + 33205$	0,9999	$y = 69669x - 1532,5$	0,9999
3,90625 – 31,25	$y = 44704x + 43133$	0,9996	$y = 68000x + 19096$	0,9997

Fonte: do autor.

Nota: *r, coeficiente de correlação linear.

Observou-se a partir da Tabela 6 que o coeficiente de correlação linear se demonstrou acima do valor mínimo preconizado de 0,99 no intervalo de 3,90625 a 500 $\mu\text{g. mL}^{-1}$ para o comprimento de onda de 230 nm e no intervalo de 3,90625 a 250 $\mu\text{g. mL}^{-1}$ para o comprimento de onda de 250 nm.

Foi sugerida a utilização do intervalo de 8 a 24 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ para a determinação do parâmetro de linearidade do método, pois o método será utilizado em ensaios futuros de solubilidade e dissolução, sendo necessária quantificação das amostras em baixa concentração. Os resultados do ensaio de linearidade estão descritos na Tabela 7.

Tabela 7 – Áreas obtidas em função das concentrações no estudo de linearidade.

(continua)

Concentração ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Área (230 nm)	Área (250 nm)
8	388534	579444
8	373177	584635
8	377605	594938
12	548165	881139
12	556388	839813
12	557036	861900
16	724790	1142166
16	750937	1086328
16	744504	1166804

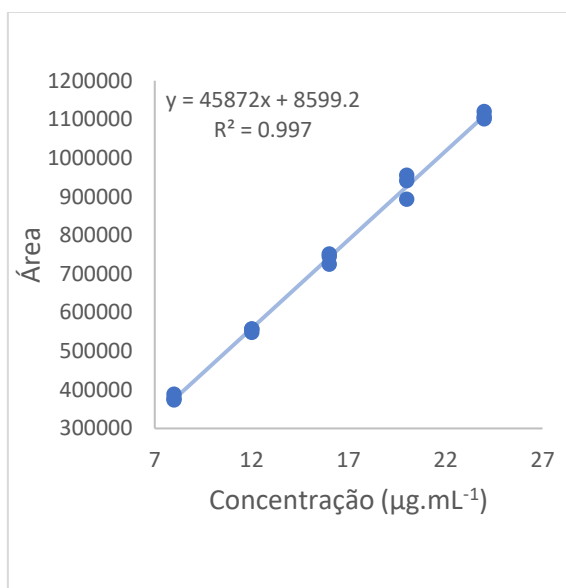
Tabela 7 – Áreas obtidas em função das concentrações no estudo de linearidade.

(conclusão)		
20	892807	1436603
20	941208	1397515
20	955322	1423793
24	1100910	1695967
24	1107063	1692319
24	1119778	1739761

Fonte: do autor.

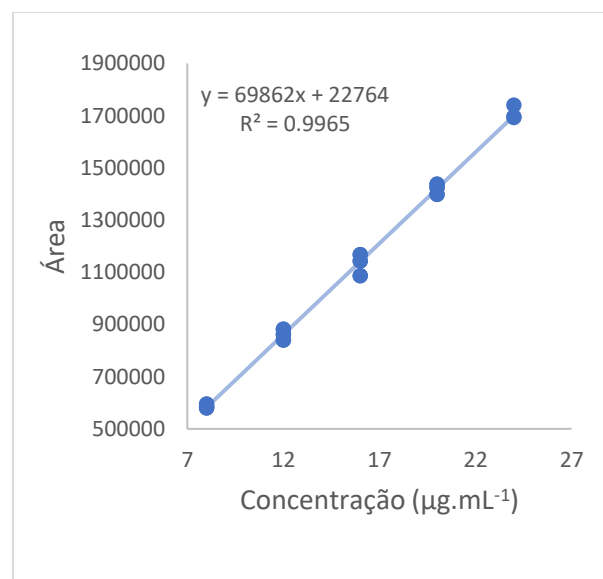
A partir dos resultados da Tabela 7, construiu-se a representação gráfica da curva de linearidade nos comprimentos de onda de 230 nm (Figura 10) e 250 nm (Figura 11).

Figura 10 – Gráfico de linearidade em 230 nm na faixa de 8 a 24 $\mu\text{g.mL}^{-1}$.



Fonte: do autor.

Figura 11 – Gráfico de linearidade em 250 nm na faixa de 8 a 24 $\mu\text{g.mL}^{-1}$.



Fonte: do autor.

A partir dos resultados de linearidade, foram realizadas análises estatísticas de regressão, demonstradas na Tabela 8 para análise em 230 nm e Tabela 9 para análise em 250 nm.

Tabela 8 – Resultados da estatística de regressão da curva de linearidade em 230 nm

Estatística de regressão	
R múltiplo	0,998481
R-Quadrado	0,996965
R-quadrado ajustado	0,996732
Erro padrão	15379,3
Observações	15

Fonte: do autor.

Tabela 9 – Resultados da estatística de regressão da curva de linearidade em 250 nm

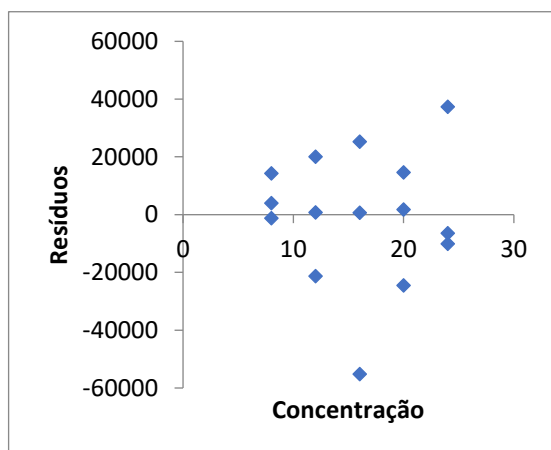
Estatística de regressão	
R múltiplo	0,998495
R-Quadrado	0,996992
R-quadrado ajustado	0,996761
Erro padrão	23398,19
Observações	15

Fonte: do autor.

As análises estatísticas de regressão das Tabelas 8 e 9 demonstraram a linearidade do método nos dois comprimentos de onda. Os coeficientes de correlação linear, descritos como “R múltiplo” nas tabelas, se demonstraram acima do valor permitido de 0,990 pela RDC 166 (BRASIL, 2017).

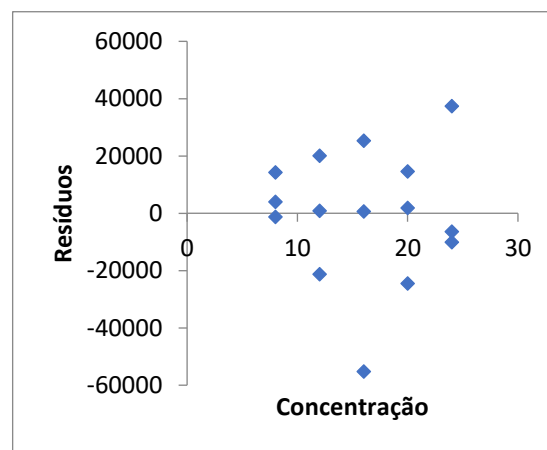
Foram realizadas análises do gráfico de dispersão dos resíduos que estão demonstrados nas Figuras 12 para análise em 230 nm e 13 para análise em 250 nm.

Figura 12 – Gráfico de dispersão dos resíduos a partir dos resultados em 230 nm.



Fonte: do autor.

Figura 13 – Gráfico de dispersão dos resíduos a partir dos resultados em 250 nm.



Fonte: do autor.

A partir dos resultados de dispersão de resíduos apresentados nas Figuras 12 e 13, pode-se observar visualmente que os valores estão distribuídos aleatoriamente. Foi realizada uma análise estatística por *Shapiro Wilk*, em que foi confirmada a distribuição normal dos dados em ambos os comprimentos de onda ($p > 0,05$).

Em seguida, foram realizadas análises de variância (ANOVA) para determinar o nível de significância do coeficiente angular, em que o coeficiente angular deve ser significativamente diferente de 0. Os resultados estão demonstrados nas Tabelas 10.

Tabela 10 – Análise de variância da curva de linearidade para análise em 230 nm e 250 nm.

230 nm		<i>Gl</i>	<i>SQ</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>F de significação</i>
Regressão		1	1,01E+12	1,01E+12	4270,318	9,36E-18
Resíduo		13	3,07E+09	2,37E+08		
Total		14	1,01E+12			
<i>Coefficientes</i>		<i>Erro padrão</i>	<i>Stat t</i>	<i>valor-P</i>	<i>95% inferiores</i>	<i>95% superiores</i>
Interseção	8599	11912	0,72	0,48	-17136,7	34335,13
Variável X1	45871	702	65,35	>0,05	44355,31	47388,32
250 nm		<i>Gl</i>	<i>SQ</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>F de significação</i>
Regressão		1	2,36E+12	2,36E+12	4309,512	8,82E-18
Resíduo		13	7,12E+09	5,47E+08		
Total		14	2,37E+12			
<i>Coefficientes</i>		<i>Erro padrão</i>	<i>Stat t</i>	<i>valor-P</i>	<i>95% inferiores</i>	<i>95% superiores</i>
Interseção	19792	18124	1,09	0,29	-19362,4	58947,34
Variável X1	70109	1068	65,65	>0,05	67802,1	72416,55

Fonte: do autor.

Notas: *Gl, graus de liberdade; SQ, soma quadrática; MQ, média quadrática; F, F calculado (MQregressão/MQresíduo).

Como foi observado na Tabela 10, o valor de F calculado é maior do que o F tabelado para 13 graus de liberdade (F tabelado = 4,67) nos dois comprimentos de onda estudados: F calculado = 4270 em 230 nm e F calculado = 4309 em 250 nm. Portanto, pode-se concluir que os coeficientes angulares das curvas de linearidade são significativamente diferentes de zero em ambos os comprimentos de onda estudados. Em relação à interseção, a análise estatística da ANOVA demonstrou que a interseção foi estatisticamente igual a zero nos comprimentos de onda de 230 nm ($p = 0,48$) e em 250 nm ($p = 0,29$).

A análise estatística da homocedasticidade dos resultados foi realizada pelo teste de Cochran, o qual testa a homogeneidade das variâncias. Se o valor de C calculado (obtido através do quociente da maior variância pela soma de todas as variâncias) for menor que o C crítico (tabelado), assume-se que os erros nos valores de y são constantes (homocedasticidade). O C calculado para análise em 250 nm (0,518) foi menor que o C crítico (0,684). Portanto, conclui-se que os dados são homocedásticos neste comprimento de onda. Já na análise em 230 nm, o C calculado (0,746) foi maior que o C crítico (0,684). Portanto, conclui-se que os dados são heterocedásticos neste comprimento de onda.

Em relação aos coeficientes angulares, observou-se a partir das equações de reta que há uma diferença significativa entre os coeficientes angulares de 230 nm ($a = 45.872$) e 250 nm ($a = 69862$). Considerando que quanto maior o coeficiente angular de um método, maior será sua sensibilidade perante a variação de concentração, o método pode ser considerado mais sensível em 250 nm.

5.1.4 Faixa de Trabalho

A faixa de trabalho foi definida a partir dos resultados de linearidade e para utilização do método em ensaios de solubilidade, estabilidade e dissolução intrínseca. A faixa de trabalho escolhida foi entre $8 \mu\text{g.mL}^{-1}$ (40%), e $24 \mu\text{g.mL}^{-1}$ (120%), sendo que a concentração de $20 \mu\text{g.mL}^{-1}$ foi definida como a concentração de 100%.

5.1.5 Efeito Matriz

Foi realizado o ensaio de efeito matriz para verificar a possível interferência de componentes presentes nas amostras de matérias-primas (como produtos de degradação) e de comprimidos (como excipientes). O efeito matriz é avaliado a partir do paralelismo apresentado entre as curvas realizadas em triplicatas na presença de possíveis interferentes e as curvas de calibração do ensaio de linearidade. O paralelismo é confirmado quando os coeficientes angulares das curvas são estatisticamente iguais. Os resultados estão descritos na Tabela 11 para o comprimento de onda em 230 nm e na Tabela 12 para o comprimento de onda em 250 nm.

Tabela 11 – Estudo de efeito matriz em 230nm.

	Equação	r*	Valor-p**
Excipiente 1	$y = 43050x + 356477$	0,9995	
Excipiente 2	$y = 46040x + 327545$	0,9980	0,0997
Excipiente 3	$y = 45956x + 541588$	0,9975	
Degradação 1	$y = 45985x + 270232$	0,9980	
Degradação 2	$y = 43676x + 259818$	0,9980	0,1030
Degradação 3	$y = 43559x + 295525$	0,9991	

Fonte: do autor.

Legendas: r*, coeficiente de correlação; valor-p**, comparação estatística pelo teste *t-student* entre o coeficiente angular médio das curvas na presença de possíveis interferentes e o coeficiente angular médio da curva de calibração.

Tabela 12 – Estudo de efeito matriz em 250 nm.

	Equação	R	Valor-p
Excipiente 1	$y = 64989x + 541588$	0,9995	
Excipiente 2	$y = 70133x + 500721$	0,9980	0,2337
Excipiente 3	$y = 66569x + 603790$	0,9975	
Degradação 1	$y = 69289x + 402075$	0,9975	
Degradação 2	$y = 66500x + 403363$	0,9985	0,1989
Degradação 3	$y = 66916x + 455807$	0,9991	

Fonte: do autor.

Legendas: r*, coeficiente de correlação; valor-p**, comparação estatística pelo teste *t-student* entre o coeficiente angular médio das curvas na presença de possíveis interferentes e o coeficiente angular médio da curva de calibração.

A partir dos resultados das análises estatísticas pelo método *t de Student* demonstrados nas Tabelas 11 e 12, foi observado que não houve diferenças estatisticamente significativas entre o coeficiente angular apresentado pela curva de calibração e o coeficiente angular das curvas preparadas fortificando amostras degradadas com o padrão de alopurinol. O mesmo comportamento foi observado quando se comparou o coeficiente angular da curva de calibração com o coeficiente angular das curvas preparadas fortificando excipientes com o padrão de alopurinol. Isso significa que houve a confirmação de ausência de efeito matriz em relação aos produtos de degradação e em relação aos excipientes em ambos os comprimentos de onda.

5.1.6 Precisão e Exatidão

Os resultados dos estudos de precisão por repetibilidade, precisão intermediária e exatidão estão demonstrados na Tabela 13.

Tabela 13 – Resultados de precisão e exatidão.

Concentração ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	Produto acabado: Padrão de Alopurinol adicionado ao placebo (%)		
	Recuperação em 230 nm (%)	Repetibilidade 230 nm DPR (%)	Precisão intermediária 230 nm DPR (%)
8 (40%)	101,06	1,18	1,66
20 (100%)	98,25	1,85	1,35
24 (120%)	100,31	1,20	1,95
	Recuperação em 250 nm (%)		
	Repetibilidade 250 nm DPR (%)	Precisão intermediária 250 nm DPR (%)	
8 (40%)	99,41	1,46	2,14
20 (100%)	98,53	1,03	1,59
24 (120%)	98,56	1,08	0,87
Concentração ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	Matéria-prima: Padrão de alopurinol adicionado em amostras degradadas (%)		
	Recuperação em 230 nm (%)	Repetibilidade 230 nm DPR (%)	Precisão intermediária 230 nm DPR (%)
8 (40%)	100,55	1,50	1,37
20 (100%)	100,02	1,16	1,58
24 (120%)	99,10	1,77	1,62
	Recuperação em 250 nm (%)		
	Repetibilidade 250 nm DPR (%)	Precisão intermediária 250 nm DPR (%)	
8 (40%)	98,82	0,90	1,37
20 (100%)	99,08	0,95	1,18
24 (120%)	99,57	1,06	1,35

Fonte: do autor (2019).

Legenda: DPR, desvio padrão relativo.

A partir dos resultados da Tabela 13, pode-se observar que os valores obtidos nos ensaios de exatidão e precisão estão dentro dos limites especificados de recuperação entre 98 a 102% para exatidão e desvio padrão relativo de no máximo 2,8% para os ensaios de precisão de produtos acabados e 2,0% para os ensaios de precisão de matérias-primas (HORWITZ, 1982; GONZÁLEZ, HERRADOR, 2007).

A partir das análises estatísticas pelo teste *t de student*, comparando-se os resultados de recuperação das amostras de padrão adicionado no placebo, obtidos em diferentes dias por diferentes analistas, observou-se que em 230 nm houve diferença estatística entre os resultados no nível baixo de concentração (conc. 8 $\mu\text{g. mL}^{-1}$, p-valor < 0,05), enquanto os níveis médio e alto analisados nesse mesmo comprimento de onda se demonstraram estatisticamente iguais (conc. 20 $\mu\text{g. mL}^{-1}$, p-valor = 0,7676; conc. 24 $\mu\text{g. mL}^{-1}$, p-valor = 0,6475). Já no comprimento de onda de 250 nm, a análise demonstrou que todas as amostras são estatisticamente iguais em suas respectivas concentrações (conc. 8 $\mu\text{g. mL}^{-1}$, p-valor = 0,3037; conc. 20 $\mu\text{g. mL}^{-1}$, p-valor = 0,0740; conc. 24 $\mu\text{g. mL}^{-1}$, p-valor = 0,7660).

As análises estatísticas pelo teste *t de student*, comparando-se os resultados de recuperação das amostras de padrão adicionado em matérias-primas degradadas, obtidos em diferentes dias por diferentes analistas, mostraram que não houve diferenças entre os valores comparados (em 230 nm: conc. 8 $\mu\text{g. mL}^{-1}$, p-valor = 0,4211; conc. 20 $\mu\text{g. mL}^{-1}$, p-valor = 0,1635; conc. 24 $\mu\text{g. mL}^{-1}$, p-valor = 0,5721; em 250 nm: conc. 8 $\mu\text{g. mL}^{-1}$, p-valor = 0,4491; conc. 20 $\mu\text{g. mL}^{-1}$, p-valor = 0,5026; conc. 24 $\mu\text{g. mL}^{-1}$, p-valor = 0,1846).

Portanto, pode-se concluir que a precisão intermediária foi demonstrada estatisticamente somente em 250 nm.

5.1.7 Limite de detecção e limite de quantificação

A determinação do limite de detecção e de quantificação foi realizada baseando-se em parâmetros da curva de calibração, onde o desvio padrão foi calculado a partir do desvio padrão residual da linha de regressão. O cálculo estimado do limite de detecção para análise em 230 nm foi de 1,62 $\mu\text{g. mL}^{-1}$, enquanto na análise no comprimento de onda de 250 nm foi de 0,70 $\mu\text{g. mL}^{-1}$. O limite de quantificação na análise em 230 nm foi de 4,91 $\mu\text{g. mL}^{-1}$ e 2,12 $\mu\text{g. mL}^{-1}$ para análise em 250 nm. Os resultados estimados de LD e LQ demonstraram que o método é mais sensível quando analisado em 250 nm, pois apresentou menor concentração de detecção e quantificação em relação a 230 nm. As estimativas dos parâmetros de LD e LQ foram apresentadas neste trabalho, mas, de acordo com a resolução, não há necessidade da

comprovação, pois o método será utilizado em ensaios de doseamento, solubilidade, e dissolução intrínseca.

5.1.8 Robustez

A robustez do método foi avaliada seguindo parâmetros do anexo III da RDC 166 de 2017: tempo de extração, diferente lote ou fabricante de colunas, variação na temperatura da coluna e variação no pH da fase móvel. Os resultados estão demonstrados na tabela 14.

Tabela 14 – Condições e resultados dos ensaios de robustez em porcentagem de recuperação.

	Adição de padrão em amostras degradadas (%)				Padrão adicionado ao placebo (%)			
	230 nm		250 nm		230 nm		250 nm	
	Média	DPR**	Média	DPR	Média	DPR	Média	DPR
CN*	98,22	0,51	100,78	0,18	98,07	0,86	100,75	1,00
EX12*	98,07	0,92	98,49	0,41	98,01	0,28	99,52	0,79
COL2*	98,64	1,17	99,31	0,24	98,40	0,38	100,35	0,30
T30*	98,58	0,47	99,09	0,67	100,27	0,66	98,94	0,96
pH 5,15	99,32	0,59	99,29	0,70	98,21	0,13	98,10	0,87
pH 5,35	99,15	1,09	97,63	1,24	98,19	0,43	98,17	0,73

Fonte: do autor.

Legendas: *CN, condições normais de ensaio; EX12, extração 12 minutos; COL2, coluna 2; T30, temperatura de 30 °C; **DPR, desvio padrão relativo.

Uma análise estatística foi realizada para a determinação da robustez do método através do teste ANOVA seguido do teste de Dunnet.

Para as análises do padrão adicionado em amostras degradadas, verificou-se diferença estatisticamente significativa de recuperação somente em 250 nm quando se alterou o pH para 5,35 ($p < 0,05$). Nas análises para o padrão adicionado ao placebo, verificou-se diferença estatística de recuperação em 230 nm quando se variou a temperatura para 30 °C e quando se variou os pHs para 5,15 e 5,35 ($p < 0,05$). As análises demonstraram haver necessidade de um controle adequado do pH da fase móvel para os dois comprimentos de onda.

Entretanto, se observarmos os resultados de recuperação média em cada condição, esses resultados se demonstram dentro do limite permitido de exatidão entre 98 a 102 % e dentro

dos limites permitidos de precisão para matriz de degradação de 2,0 % e para matriz de placebo de 2,8%.

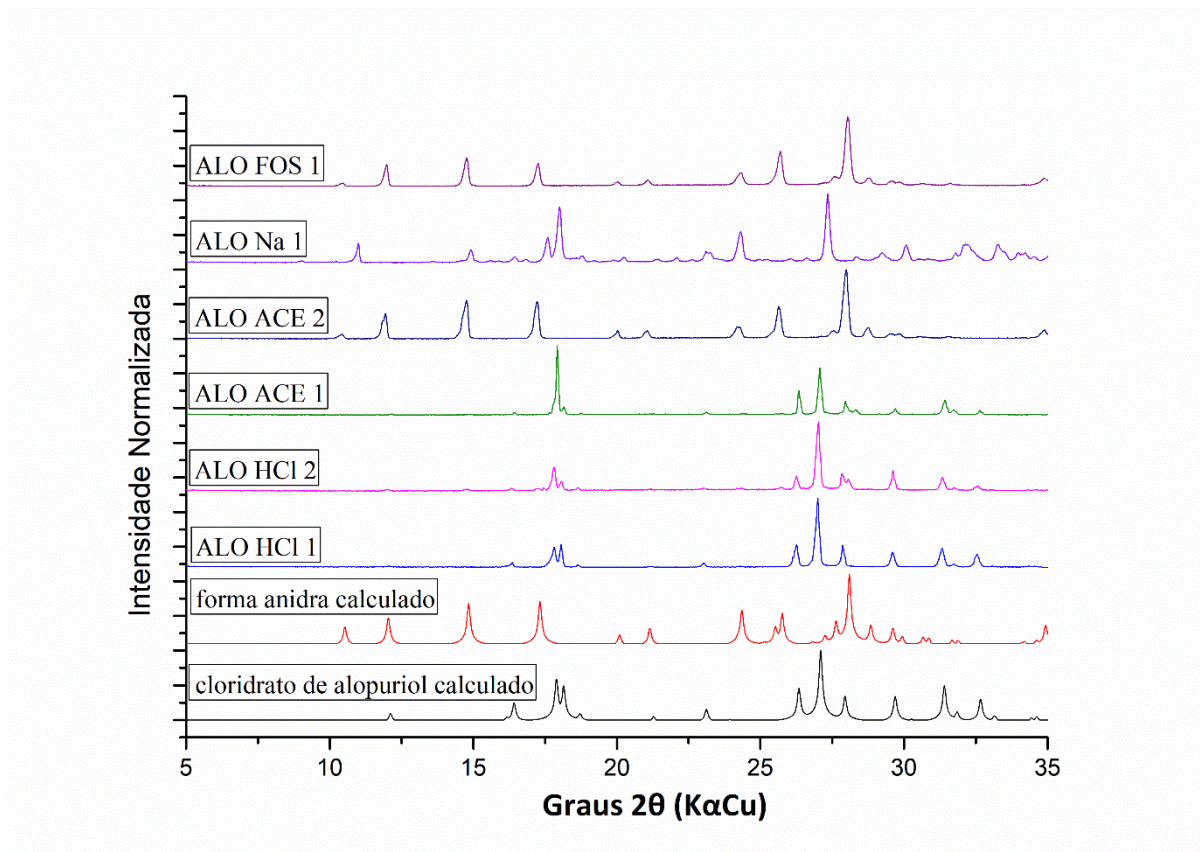
5.2 OBTENÇÃO DE FORMAS SÓLIDAS DE ALOPURINOL

Foram realizadas diversas tentativas de recristalização de formas sólidas de alopurinol, cujos resultados estão demonstrados a seguir:

- a) ALOCL 1: DRXP experimental coincidente com o DRXP calculado utilizando o software Mercury (2015) a partir da estrutura de ALOCL depositada na Cambridge Structural Database. Porém, o pó teve uma mudança de coloração, indicando possível degradação;
- b) ALOCL 2: DRXP experimental coincidente com o DRXP calculado utilizando o software Mercury (2015) a partir da estrutura de ALOCL depositada na Cambridge Structural Database. Observou-se formação de policristais um dia após colocar na geladeira. O método foi adotado para reprodução do cloridrato de alopurinol;
- c) ALOACE 1: DRXP experimental diferente dos DRXP calculados utilizando o software Mercury (2015) a partir das estruturas do alopurinol depositadas na Cambridge Structural Database. Porém, quando o pó foi coletado, observou-se coloração diferente, indicando possível degradação. Até o momento não se conseguiu obter reprodução deste tipo de padrão de difração;
- d) ALOACE 2: DRXP experimental coincidente com o DRXP calculado utilizando o software Mercury (2015) a partir da estrutura do alopurinol base livre depositada na Cambridge Structural Database.
- e) ALONa 1: DRXP experimental diferente dos DRXP calculados utilizando o software Mercury (2015) a partir das estruturas do alopurinol depositadas na Cambridge Structural Database. Entretanto, o rendimento foi muito acima do esperado, evidenciando que a matéria-prima poderia estar contaminada com hidróxido de sódio.
- f) ALOFOS 1: DRXP experimental coincidente com o DRXP calculado utilizando o software Mercury (2015) a partir da estrutura do alopurinol base livre depositada na Cambridge Structural Database.

Os difratogramas estão demonstrados na figura 14.

Figura 14 – Difratomogramas experimentais das tentativas de obtenção de formas sólidas de alopurinol em comparação com padrões de difração calculados para alopurinol forma anidra (PRUSINER, SUNDARALINGAM; 1972) e cloridrato de alopurinol (SHELDRICK; BELL; 1987a; SHELDRICK; BELL; 1987b).



Fonte: do autor.

A partir das análises dos difratogramas demonstrados na Figura 14, pode-se observar que, dentre as tentativas, a forma cloridrato de alopurinol (ALOCL) foi obtida com sucesso e em quantidade suficiente para as análises posteriores. Outros variados processos de recristalização foram adotados, mas não formaram cristais, ou não produziram sólidos com padrões de difração diferentes da forma comercializada, de forma reprodutível e em quantidade suficiente para prosseguir com estudos. Para fins de comparação, todas as análises foram realizadas concomitantemente em um único lote de matéria-prima de alopurinol.

5.3 CARACTERIZAÇÃO DE FORMAS SÓLIDAS DE ALOPURINOL

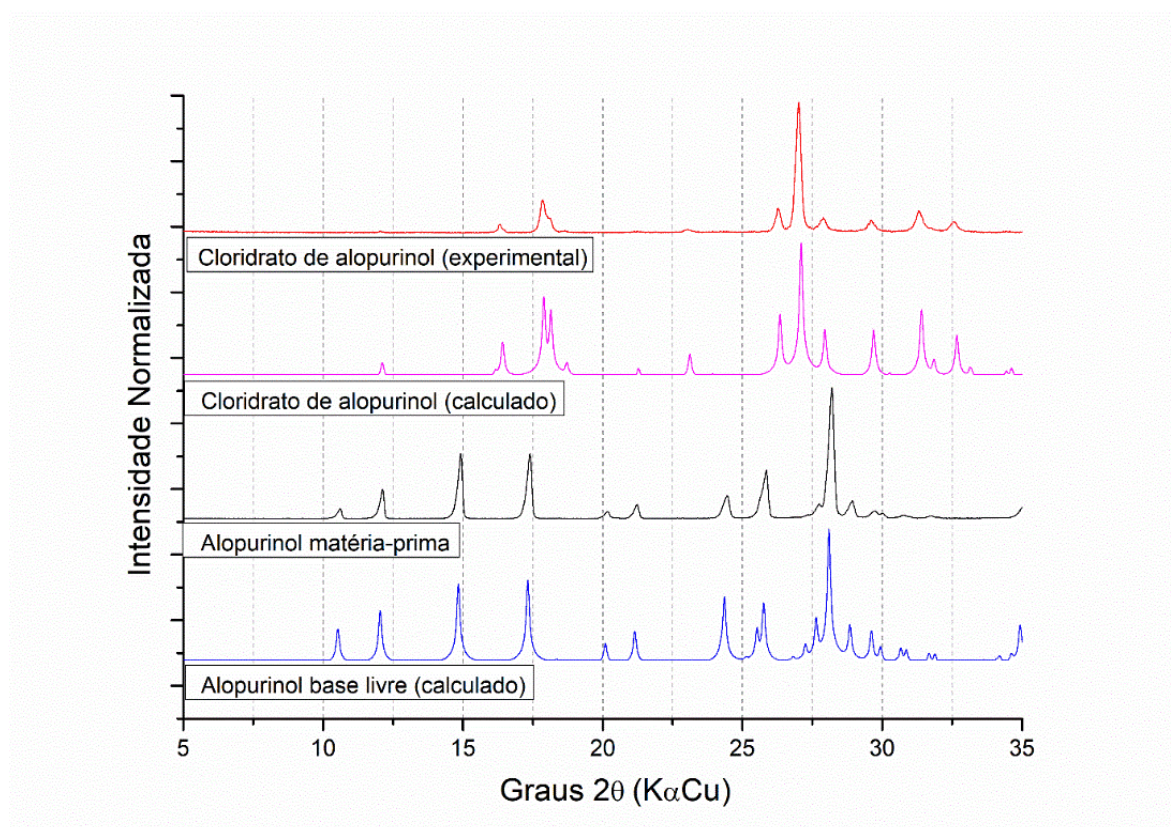
A caracterização das formas sólidas de alopurinol foi realizada a partir das técnicas de difração de Raios-X por policristais (DRXP), espectroscopia no infravermelho (IV) e análises térmicas, incluindo calorimetria exploratória diferencial (DSC) e termogravimetria (TG). Os

resultados obtidos para as duas formas estudadas (ALOBL E ALOCL) serão discutidos nas sessões a seguir.

5.3.1 Difração de Raios-X por policristais (DRXP)

Como discutido no item 5.2, o cloridrato de alopurinol (ALOCL) foi obtido com sucesso através do processo de recristalização descrito. As amostras de pó, obtidas em várias recristalizações, foram coletadas e misturadas para uma melhor análise por DRXP. Além disso, a matéria-prima utilizada nas recristalizações também foi caracterizada por DRXP. Os resultados estão demonstrados na Figura 15.

Figura 15 – Difratomogramas experimentais de alopurinol matéria-prima e cloridrato de alopurinol obtido por processo de recristalização, em comparação com padrões de difração calculados para alopurinol base livre (PRUSINER; SUNDARALINGAM; 1972) e cloridrato de alopurinol (SHELDRIK; BELL; 1987b).



Fonte: do autor (2019).

De acordo com os difratogramas da Figura 15, pode-se observar que a matéria-prima de alopurinol contém a estrutura do alopurinol base livre descrita na literatura. A amostra não apresentou picos de Bragg que possam ser atribuídos a contaminações por outra forma sólida.

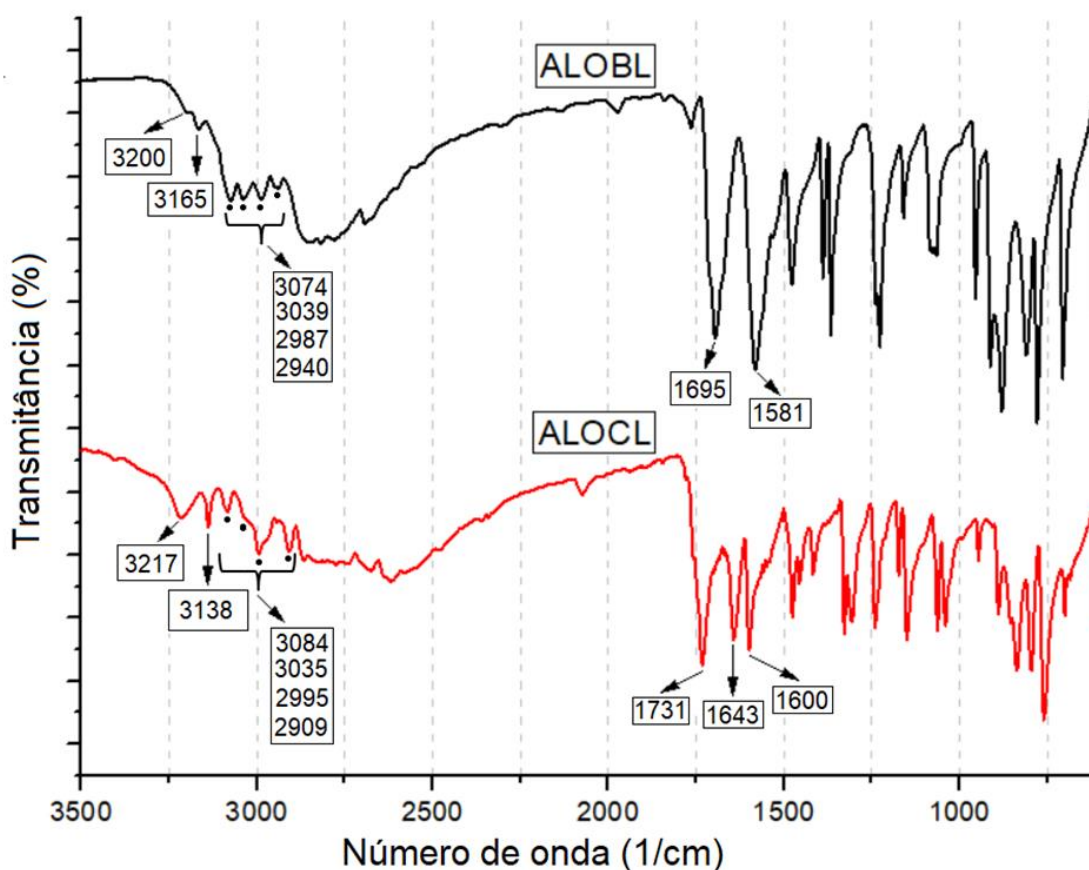
A mistura de amostras de várias recristalizações apresentou, como esperado, picos de Bragg coincidentes com os picos calculados a partir da estrutura descrita na literatura para o cloridrato de alopurinol (SHELDRICK, BELL, 1987b). Não foram observados picos de Bragg que possam ser atribuídos a alguma contaminação.

Para estudos posteriores, a matéria prima caracterizada como alopurinol base livre e o cloridrato de alopurinol experimental serão denominados como ALOBL e ALOCL, respectivamente.

5.3.2 Espectroscopia de Infravermelho (IV)

Os resultados obtidos pelos estudos de IV das duas formas sólidas estão descritos na Figura 16 e Tabela 15 a seguir.

Figura 16 – Espectros de IV de ALOBL (preto) e do ALOCL (vermelho).



Fonte: do autor (2019).

Tabela 15 – Principais bandas de absorção na região do infravermelho de ALOBL e ALOCL.

Vibração (cm ⁻¹)	ALOB� (cm ⁻¹)	ALOCCL (cm ⁻¹)
Estiramento N-H de amina (≈3400-3200)	3200	3217
Estiramento N-H de lactama (≈3200-3000)	3165	3138
Estiramento CH (≈3100-2800)	3074, 3039, 2987, 2940	3084, 3035, 2995, 2909
Estiramento C=O (≈1800-1650)	1695	1731
Dobramento NH no plano (≈1640-1550)	1581	1643, 1600

Fonte: do autor (2019).

A partir dos resultados demonstrados na Figura 16 e Tabela 15 acima, pode-se observar que ALOCL apresentou diferenças espectrais na região do infravermelho em relação à ALOBL. A fim de discutir as possíveis causas das diferenças observadas, as estruturas químicas de cada forma, bem como as suas interações intermoleculares no estado sólido devem ser consideradas (Figuras 3 e 4, seção 2.1).

Considerando as estruturas químicas de ALOBL e ALOCL, seria esperado que ALOCL apresentasse uma banda adicional de estiramento N-H entre aproximadamente 3400-3200 cm⁻¹, devido à protonação do nitrogênio 2 em ALOCL. Entretanto, o espectro de infravermelho de ALOCL apresenta apenas uma banda em 3217 cm⁻¹, o que pode ter ocorrido devido a uma sobreposição de duas bandas de estiramento N-H das aminas (N2-H e N3-H em ALOCL). Além disso, ALOCL apresentou uma banda adicional em 1643 cm⁻¹, devido a uma nova vibração de dobramento N-H, em consequência da protonação de N2, como esperado.

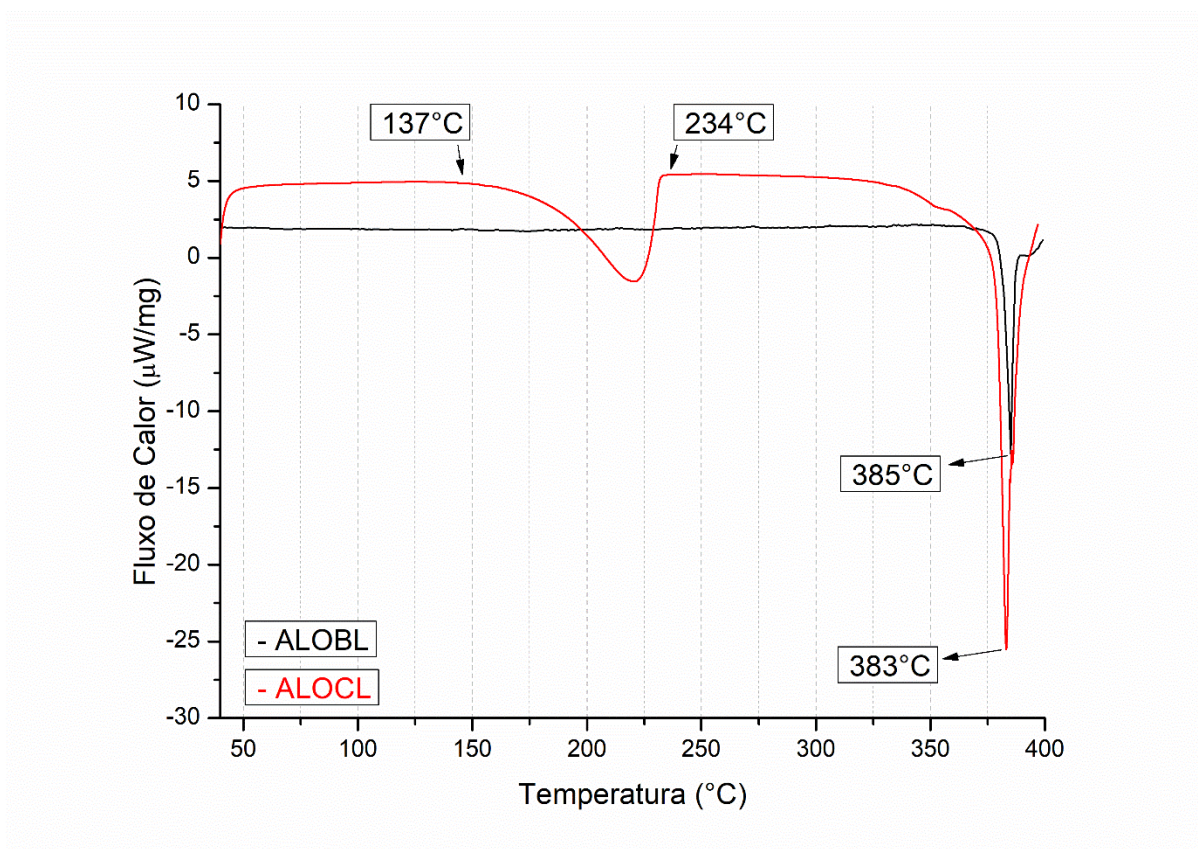
Quando se considera as interações intermoleculares entre as formas sólidas (Figura 4, seção 2.1), verifica-se que em ALOBL os quatro nitrogênios da estrutura estão envolvidos em interações intermoleculares do tipo ligação de hidrogênio. Entretanto, em ALOCL, três nitrogênios da estrutura apresentam interações com o íon cloreto, motivo pelo qual se observa deslocamento de várias bandas de absorção na região do infravermelho quando se compara os espectros de ALOCL com ALOBL. Em ALOCL, o estiramento N-H de amina aparece deslocado de 3200 para 3217 cm⁻¹, o estiramento N-H de lactama aparece deslocado de 3165 para 3138 cm⁻¹ e o estiramento da carbonila da amida desloca-se de 1695 para 1731 cm⁻¹.

Além disso, os espectros apresentam ligeiras diferenças entre si na região de impressão digital (1400 a 900 cm^{-1}). Todas estas diferenças espectrais são úteis para diferenciar as formas sólidas.

5.3.3 Análises térmicas

As análises por DSC e TG foram realizadas com o objetivo de confirmar as estruturas cristalinas, além de verificar a estabilidade térmica e decomposição das amostras. Os resultados de DSC de ALOBL e ALOCL estão demonstrados na Figura 17.

Figura 17 – Curvas de DSC de ALOBL (preto) e de ALOCL (vermelho).



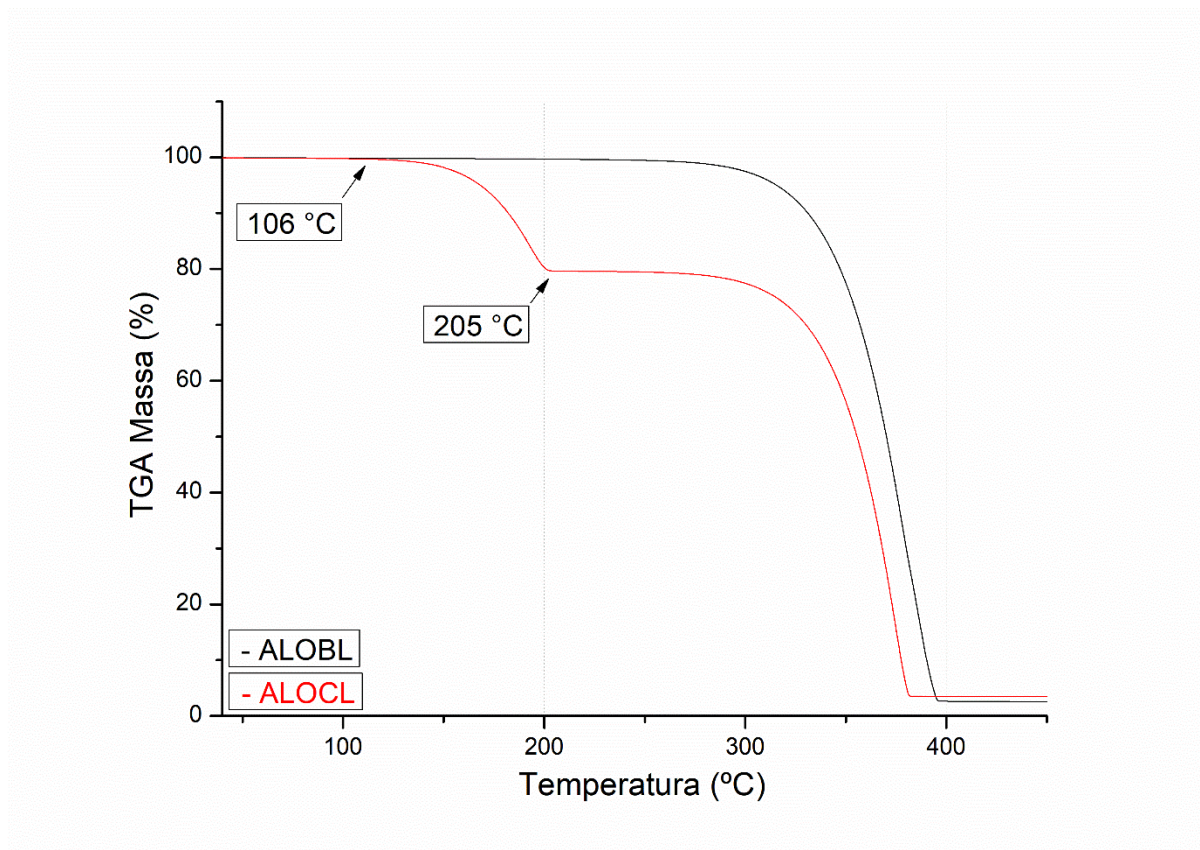
Fonte: do autor.

De acordo com a Figura 17, foi observado um evento endotérmico na curva de DSC de ALOBL em 385 $^{\circ}\text{C}$ ($T_{\text{onset}} = 381,04^{\circ}\text{C}$). A amostra ALOCL apresentou evento semelhante em 383 $^{\circ}\text{C}$ ($T_{\text{onset}} = 379,32^{\circ}\text{C}$). Além disso, ALOCL apresentou um evento endotérmico entre 137 e 234 $^{\circ}\text{C}$ ($T_{\text{onset}} = 177,76^{\circ}\text{C}$) que não aparece na forma anidra. Com base nesses

resultados, pode-se dizer que é possível diferenciar as formas ALOBL e ALOCL utilizando a técnica de DSC.

As curvas de TG de ALOBL e ALOCL estão demonstradas na Figura 18.

Figura 18 – Curvas de TG de ALOBL (preto) e ALOCL (vermelho).



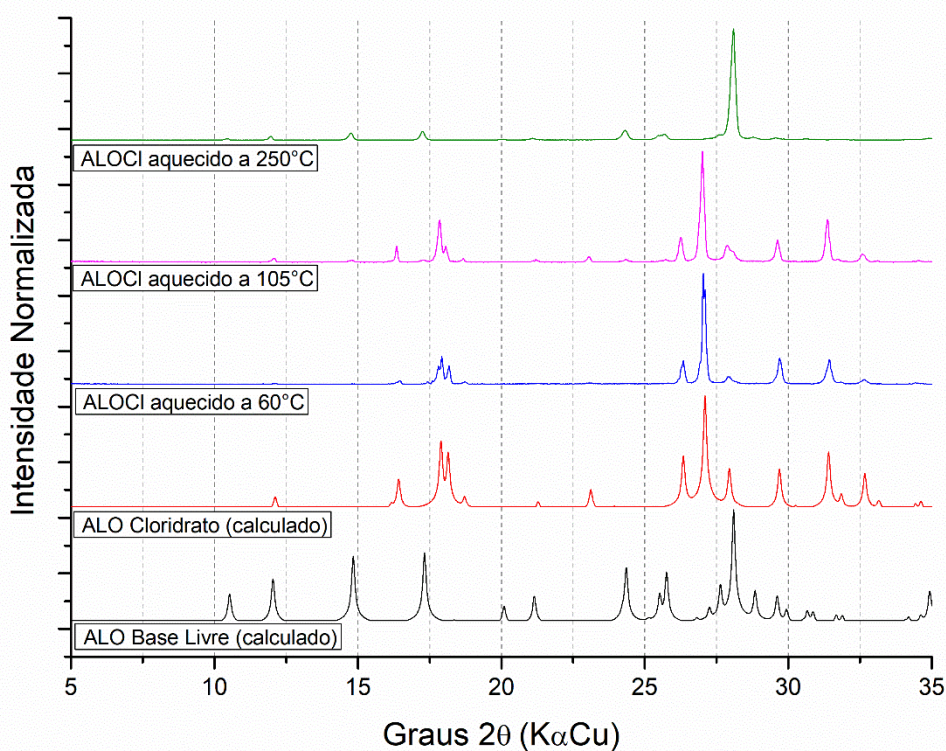
Fonte: do autor.

Em relação à Figura 18, pode-se observar que as decomposições de ALOBL e ALOCL se iniciam em aproximadamente 300 °C. Portanto, os eventos endotérmicos observados nas curvas de DSC de ALOBL e ALOCL com T onsets em 381,04 °C e 379,32°C respectivamente correspondem à decomposição da molécula de alopurinol.

Além disso, ALOCL apresenta uma perda de massa diferenciada de 20,15% entre 106°C e 205°C e outra perda de 75,86% até 382°C. Pode-se deduzir que a primeira perda de massa ocorreu devido a saída de HCl da molécula, uma vez que a porcentagem de massa perdida nesse primeiro evento é próxima à porcentagem de massa de HCl teórica na molécula de cloridrato de alopurinol (21,14%). Sendo assim, é possível verificar a diferença entre as duas formas por TG, devido ao primeiro evento de perda de massa que ocorre somente na curva de TG do cloridrato de alopurinol.

A fim de entender melhor o comportamento de ALOCl em função da temperatura, amostras foram submetidas à aquecimento em estufa com circulação de ar até as temperaturas de 60°C por uma hora, 105°C por uma hora e a 250°C por 15 minutos. Após os experimentos de aquecimento, as amostras foram resfriadas até a temperatura ambiente e analisadas por DRXP. Os resultados estão descritos na Figura 19.

Figura 19 – Difratomogramas experimentais de amostras de ALOCl após aquecimento a 60, 105 e 250 °C, comparados aos padrões de difração calculados para ALOBl (PRUSINER; SUNDARALINGAM; 1972) e ALOCl (SHELDRICK; BELL; 1987b).



Fonte: do autor.

A partir da análise dos difratogramas representados na Figura 19, verificou-se que ALOCl manteve sua estrutura cristalina após aquecimento a 60°C, não sendo observados picos de contaminação de ALOBl.

Entretanto, após aquecimento de ALOCl a 105 °C durante 1 hora, verificou-se o aparecimento de picos de Bragg em 14,78° e 24,36° 2θ, os quais são característicos da forma sólida ALOBl. O aparecimento desses picos indica uma conversão parcial de ALOCl em ALOBl nessa temperatura.

Com base nestes resultados, faz-se uma ressalva em relação ao ensaio de identificação do alopurinol em comprimidos por espectroscopia no infravermelho, descrito na Farmacopeia Brasileira (2019), as amostras, após serem submetidas a um processo de extração, devem ser dessecadas em estufa a 105°C por três horas. Com base nos experimentos deste trabalho, pode-se deduzir que, caso haja contaminação de ALOCL em comprimidos, o aquecimento a 105°C por 3 horas pode promover conversão para ALOBL. Portanto, recomenda-se que a dessecação seja realizada em temperaturas inferiores para posterior identificação, para que o método seja capaz de discriminar ALOCL e ALOBL em comprimidos.

Após aquecimento a 250°C pôde-se observar que ALOCL se converteu totalmente em ALOBL. Este resultado comprova que há formação de ALOBL após o evento endotérmico entre 137 e 234 °C, observado na curva de DSC de ALOCL, o qual foi atribuído à perda de HCL.

5.3.4 Doseamento

Foram realizados ensaios de doseamento das amostras de alopurinol utilizando o método cromatográfico validado. Os resultados estão demonstrados na tabela 16.

Tabela 16 – Valores médios de teor de ALOMP e ALOCL.

Amostras	Média de teor %	DPR* %
ALOBL	101,75	0,14
ALOCL	99,49	0,38

Fonte: do autor.

Legenda: *DPR, desvio padrão relativo.

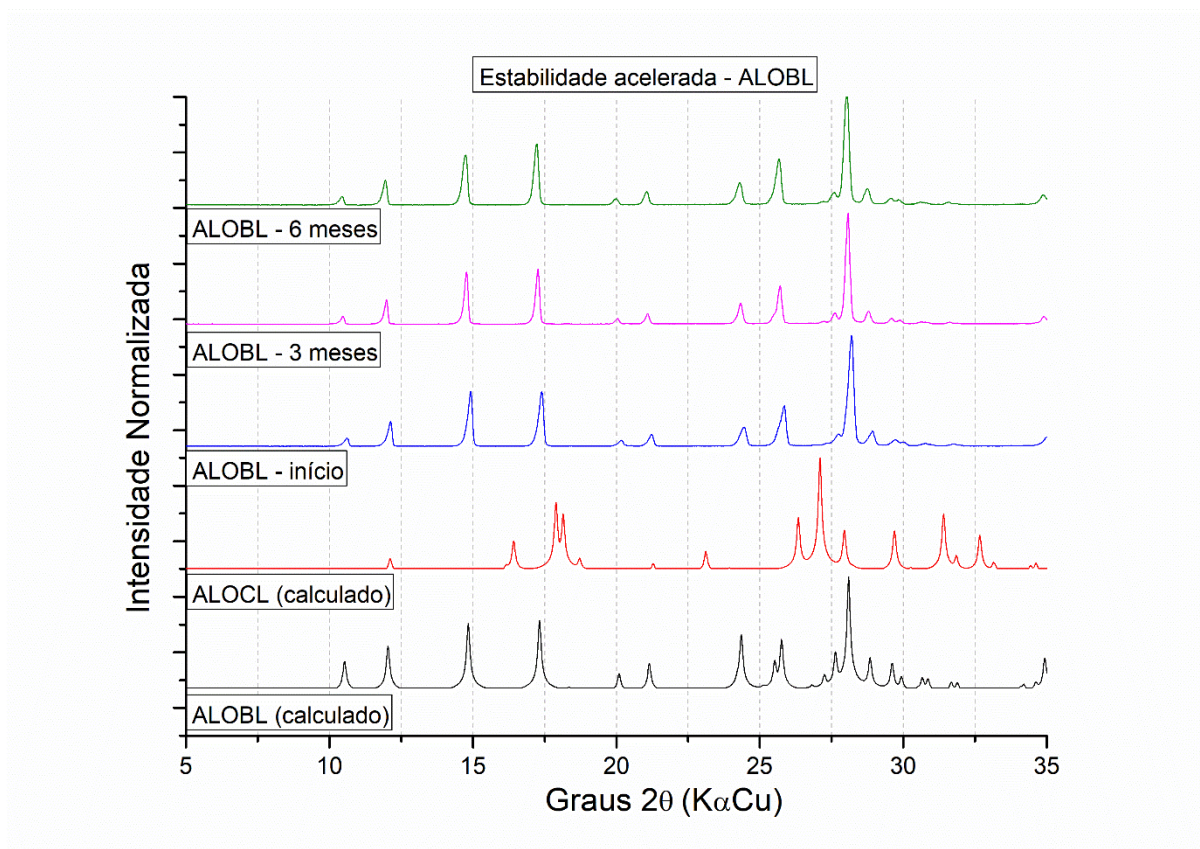
A partir dos resultados demonstrados na tabela 16, pode-se observar que os teores de alopurinol em cada forma sólida estão dentro do limite de 98 a 102 %, o que comprova pureza adequada de ALOBL e ALOCL.

5.4 ESTUDO DE ESTABILIDADE ACELERADA

Um estudo de estabilidade acelerada foi realizado, acondicionando amostras de ALOBL e ALOCL em estufa a 40 °C e 75 % UR, as quais foram coletadas nos tempos de 0, 3

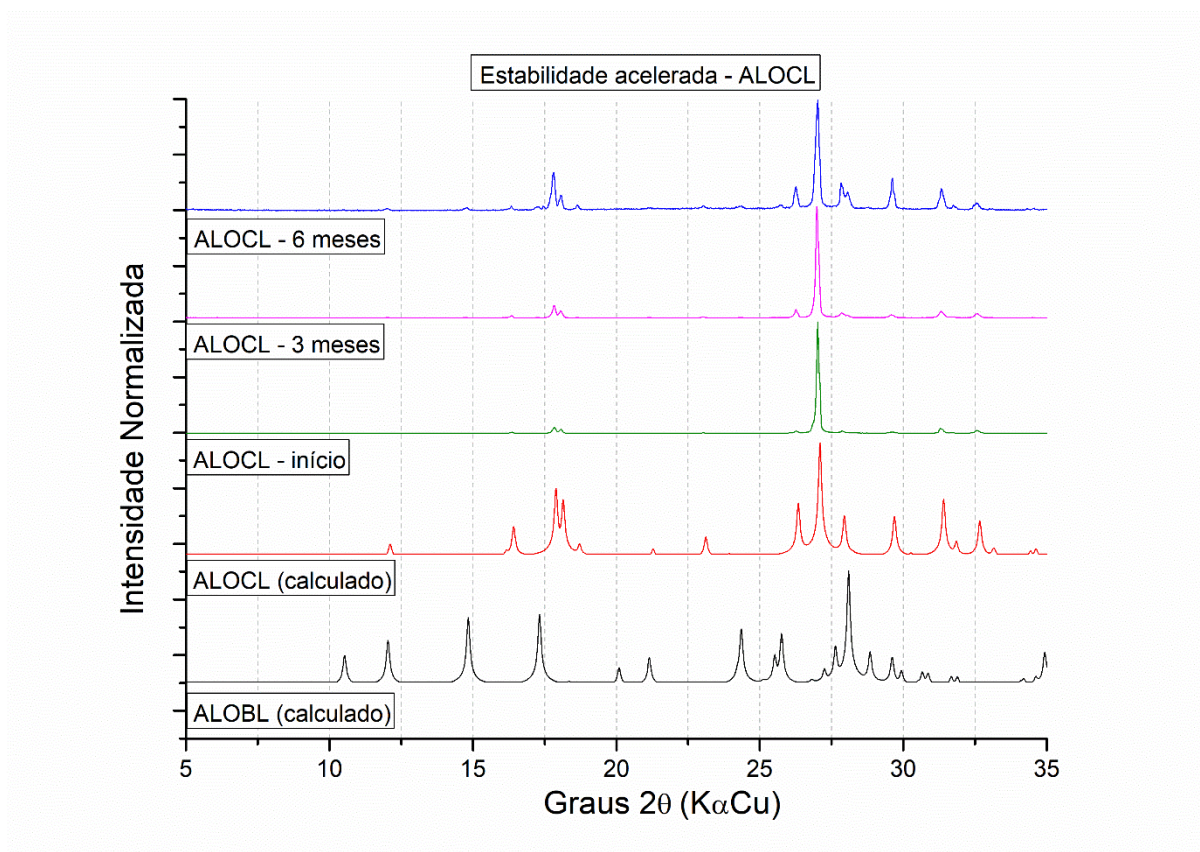
e 6 meses e analisadas por DRXP e CLAE. Os resultados de DRXP estão demonstrados nas Figuras 20 e 21.

Figura 20 – Difratomogramas do ensaio de estabilidade acelerada. ALOBL (calculado): padrão de difração calculado para a forma anidra de alopurinol; ALOCL (calculado): padrão de difração calculado para cloridrato de alopurinol; ALOBL - início: ALOBL experimental analisado no tempo 0; ALOBL - 3 meses: ALOBL experimental analisado no tempo 3 meses; ALOBL - 6 meses: ALOBL experimental analisado no tempo 3 meses.



Fonte: do autor.

Figura 21 - Difratogramas do ensaio de estabilidade acelerada. ALOBL (calculado): padrão de difração calculado para a forma anidra de alopurinol; ALOCL (calculado): padrão de difração calculado para cloridrato de alopurinol; ALOCL - início: ALOCL experimental analisado no tempo 0; ALOCL - 3 meses: ALOCL experimental analisado no tempo 3 meses; ALOCL - 6 meses: ALOBL experimental analisado no tempo 3 meses.



Fonte: do autor.

De acordo com os resultados demonstrados nas Figuras 20 e 21, foi possível observar que a amostra de ALOBL se manteve fisicamente estável até o tempo de 6 meses, pois não apresentou picos de contaminação nas análises realizadas. Já na análise após 6 meses em ALOCL, verificou-se aparecimento de picos de Bragg nas regiões $14,74^\circ$, $24,28^\circ$ e $28,06^\circ$ 2θ , exclusivos da forma ALOBL. Portanto, pode-se dizer que houve conversão parcial do ALOCL para ALOBL após 6 meses de acondicionamento em estufa.

Foi realizado um estudo por doseamento de ALOBL e ALOCL nos tempos 0, 3 e 6 meses. Os resultados estão demonstrados na Tabela 17.

Tabela 17 – Resultados de doseamento de ALOBL E ALOCL nos tempos 0, 3 e 6 meses.

	ALOBL		ALOCL	
	Teor de C ₅ H ₄ N ₄ O %	DPR %	Teor de C ₅ H ₄ N ₄ O %	DPR %
Tempo 0	101.75	0.14	99.49	0.38
3 meses	99.59	0.24	98.08	0.72
6 meses	98.20	0.38	98.35	0.13

Fonte: do autor.

De acordo com os resultados da Tabela 17, pode-se observar que os resultados de doseamento de ALOBL e ALOCL se mantiveram dentro da faixa de concentração de 98 a 102 %. Portanto, pode-se dizer que os cristais estudados são quimicamente estáveis nas condições testadas até o tempo de 6 meses.

5.5 ESTUDO DE SOLUBILIDADE A 25 °C

Foi realizado um estudo de solubilidade a 25°C pelo método *shake flask*. Após 24, 48 e 72 horas de ensaio, retirou-se uma alíquota de 1 mL de cada amostra, filtrou-se imediatamente, diluiu-se e quantificou-se utilizando o método validado anteriormente. Os resultados estão descritos na Tabela 18.

Tabela 18 – Resultados de solubilidade no equilíbrio de ALOBL e ALOCL a 25°C nos tempos 24, 48 e 72 horas.

Tempos	24 horas				48 horas				72 horas			
	ALOBL		ALOCL		ALOBL		ALOCL		ALOBL		ALOCL	
Meios	X	DP	X	DP	X	DP	X	DP	X	DP	X	DP
pH 1,2	0,29	0,02	0,56	0,01	0,59	0,05	0,58	0,01	0,52	0,02	0,59	0,02
pH 3,4	0,50	0,00	0,58	0,02	0,53	0,00	0,58	0,03	0,50	0,01	0,57	0,01
pH 4,5	0,50	0,02	0,53	0,00	0,51	0,01	0,51	0,02	0,49	0,01	0,51	0,02
pH 6,8	0,50	0,06	0,56	0,02	0,51	0,02	0,55	0,02	0,55	0,02	0,48	0,01
H ₂ O	0,50	0,01	0,52	0,04	0,52	0,02	0,53	0,03	0,52	0,01	0,50	0,01

Fonte: do autor.

Legendas: X = solubilidade média em mg.mL⁻¹ (n = 3); DP = desvio padrão amostral em mg.mL⁻¹ (n = 3); pH 1,2 = tampão HCl pH 1,2 (135 mmol.L⁻¹); pH 3,4 = tampão citrato pH 3,4 (438 mmol.L⁻¹); pH 4,5 = tampão acetato pH 4,5 (24,7 mmol.L⁻¹); pH 6,8 = tampão fosfato pH 6,8 (322,4 mmol.L⁻¹).

A partir dos resultados da Tabela 18, foi realizado um estudo estatístico através do teste de análise de variância (ANOVA) seguida do teste TUKEY ao nível de significância de 0,05 para comparação entre as médias de solubilidade nos tempos de 24, 48 e 72 horas para cada forma estudada em cada meio. Os resultados estão descritos na Tabela 19.

Tabela 19 – Comparação estatística (ANOVA seguida de TUKEY) entre as médias de solubilidade nos tempos de 24, 48 e 72 horas para cada forma estudada em cada meio.

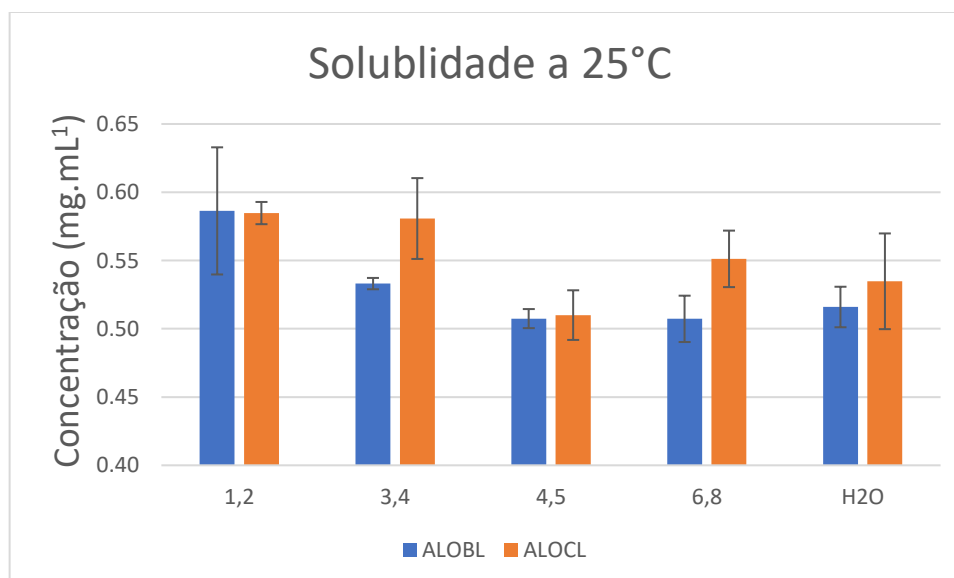
Meios*	ALOBL		ALOCL	
	Valor p (ANOVA)	Resultado do teste de TUKEY	Valor p (ANOVA)	Resultado do teste de TUKEY
pH 1,2	<0,05	24<48=72	<0,05	24=48,48=72,24<72
pH 3,4	<0,05	48>24=72	0,79	-
pH 4,5	0,20	-	0,17	-
pH 6,8	0,30	-	<0,05	24=48>72
H ₂ O	0,24	-	0,34	-

Fonte: do autor.

Legendas: *pH 1,2 = tampão HCl pH 1,2 (135 mmol.L⁻¹); pH 3,4 = tampão citrato pH 3,4 (3,4 mmol.L⁻¹); pH 4,5 = tampão acetato pH 4,5 (24,7 mmol.L⁻¹); pH 6,8 = tampão fosfato pH 6,8 (322,4 mmol.L⁻¹).

A partir dos resultados das Tabelas 18 e 19, pode-se concluir que o máximo de solubilidade de alopurinol a 25°C foi observado após 48 horas de ensaio para ambas as formas em todos os meios. Portanto, comparou-se as solubilidades entre ALOBL e ALOCL a 25°C após 48 horas de ensaio. Os resultados estão demonstrados na Figura 22.

Figura 22 – Solubilidade de ALOBL e ALOCL a 25 °C e 48 horas (n=3).



Fonte: do autor (2019).

Quando se considera as solubilidades de cada forma em função do pH, espera-se maiores valores de solubilidades em pHs ácidos, devido à protonação da molécula de alopurinol ($pK_{a1} = 1,384$; figura 3, seção 2.1). ALOBL apresentou, como esperado, maior solubilidade em tampão HCl pH 1,2 ($0,59 \text{ mg.mL}^{-1}$) em relação aos outros meios, o que foi confirmado estatisticamente ao nível de significância de 0,05. Em pH 3,4, ALOBL também apresentou, estatisticamente, maior valor de solubilidade ($0,53 \text{ mg.mL}^{-1}$) em relação aos outros meios. Considerando que pK_a é o pH onde o fármaco encontra-se 50% ionizado e 50% não ionizado, pode ter ocorrido protonação parcial da molécula de alopurinol em pH 3,4, justificando um ligeiro aumento de solubilidade neste pH em relação aos pHs 4,5 e 6,8. Quando se mediu o pH final das soluções de ALOBL após os estudos de solubilidade, os mesmos de mantiveram constantes, inclusive em água (pH entre 6,0 e 7,0).

ALOCL apresentou o mesmo valor de solubilidade nos meios de pHs 1,2 e 3,4 ($0,58 \text{ mg.mL}^{-1}$). Considerando-se somente o pK_{a1} do alopurinol (1,384), seria de se esperar que a solubilidade de ALOCL fosse maior em pH 1,2. Entretanto, deve-se considerar o efeito do íon comum, o que provavelmente ocasionou diminuição da solubilidade de ALOCL em tampão HCl pH 1,2. A solubilidade de ALOCL foi estatisticamente menor em pH 4,5 em relação aos demais pHs, o que era esperado, pois neste valor de pH a molécula provavelmente encontra-se 100% na sua forma não ionizada. Quando se mediu o pH final das soluções de ALOCL após os estudos de solubilidade, os mesmos de mantiveram constantes, com exceção em água, que apresentou pH final entre 1,0 e 2,0. Esta alteração de pH ocorreu provavelmente porque o cloridrato de alopurinol libera prótons na água, que não possui capacidade tamponante.

A partir dos resultados demonstrados na Figura 22, comparou-se os valores de solubilidade de ALOBL com ALOCL a 25°C após 48 horas utilizando um teste *t de Student* ao nível de significância de 0,05. Os resultados demonstraram que não houve diferença estatisticamente significativa entre as solubilidades das formas nos meios estudados a 25°C e no tempo de 48 horas.

5.6 ESTUDO DE SOLUBILIDADE A 37°C

Foi realizado um estudo de solubilidade a 37°C pelo método *shake flask*. Após 24, 48 e 72 horas de ensaio, retirou-se uma alíquota de 1 mL de cada amostra, filtrou-se imediatamente, diluiu-se e quantificou-se utilizando o método previamente validado. Os resultados estão descritos na Tabela 20.

Tabela 20 – Resultados de solubilidade no equilíbrio de ALOBL e ALOCL a 37 °C nos tempos de 24, 48 e 72 horas.

Tempos	24 horas				48 horas				72 horas			
	ALOBL		ALOCL		ALOBL		ALOCL		ALOBL		ALOCL	
Meios	X	DP	X	DP	X	DP	X	DP	X	DP	X	DP
pH 1,2	0,77	0,03	0,81	0,05	0,80	0,03	0,85	0,03	0,90	0,02	0,86	0,02
pH 3,4	0,68	0,01	0,68	0,11	0,69	0,06	0,75	0,02	0,74	0,01	0,77	0,01
pH 4,5	0,51	0,01	0,73	0,01	0,70	0,01	0,76	0,01	0,72	0,01	0,70	0,01
pH 5,4	0,62	0,01	0,67	0,02	0,71	0,01	0,72	0,00	0,72	0,03	0,72	0,00
pH 6,8	0,67	0,01	0,58	0,00	0,69	0,01	0,71	0,01	0,73	0,01	0,73	0,01
H ₂ O	0,64	0,01	0,72	0,01	0,74	0,00	0,76	0,01	0,76	0,02	0,74	0,02

Fonte: do autor.

Legendas: X = solubilidade média (n = 3); DP = desvio padrão amostral (n = 3); pH 1,2 = tampão HCl pH 1,2 (135 mmol.L⁻¹M); pH 3,4 = tampão citrato pH 3,4 (438 mmol.L⁻¹); pH 4,5 = tampão acetato pH 4,5 (24,7 mmol.L⁻¹); pH 5,4 = tampão acetato pH 5,4 (42,3 mmol.L⁻¹); pH 6,8 = tampão fosfato pH 6,8 (322,4 mmol.L⁻¹).

A partir dos resultados da Tabela 20, foi realizado um estudo estatísticos através do teste de ANOVA seguida do teste TUKEY ao nível de significância de 0,05 para comparação entre as médias de solubilidade nos tempos de 24, 48 e 72 horas para cada forma estudada em cada meio. Os resultados da análise estatística estão descritos na Tabela 21.

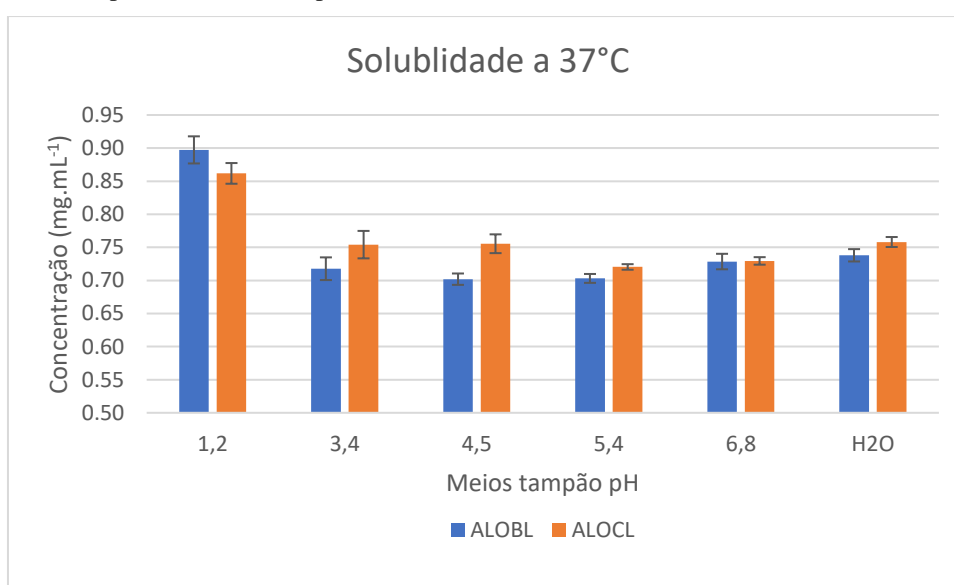
Tabela 21 – Comparação estatística (ANOVA seguida de Tukey) entre as médias de solubilidade nos tempos de 24, 48 e 72 horas a 37 °C para cada forma estudada em cada meio.

Meio	ALOBL		ALOCL	
	Valor p (ANOVA)	Resultado do teste de Tukey	Valor p (ANOVA)	Resultado do teste de Tukey
pH 1,2	<0,05	24=48<72	0,20	-
pH 3,4	0,13	-	0,31	-
pH 4,5	<0,05	24<48=72	<0,05	24=48>72
pH 5,4	<0,05	24<48=72	<0,05	24<48=72
pH 6,8	<0,05	24=48<72	<0,05	24<48=72
H ₂ O	<0,05	24<48=72	<0,05	24<48, 24=72 e 48=72

Fonte: do autor.

A partir dos resultados das Tabelas 20 e 21, pode-se concluir que o máximo de solubilidade de alopurinol a 37°C foi observado estatisticamente após 48 horas de ensaio para ambas as formas nos tampões de pH 3,4; 4,5; 5,4 e em água. Entretanto, ALOBL atingiu o máximo de solubilidade nos tampões de pH 1,2 e 6,8 somente após 72 horas de ensaio. Portanto, comparou-se inicialmente as solubilidades entre ALOBL e ALOCL a 37°C após 48 horas de ensaio nos tampões de pH 3,4; 4,5; 5,4 e em água e após 72 horas nos tampões de pH 1,2 e 6,8. Os resultados estão demonstrados na Figura 23.

Figura 23 – Solubilidade do alopurinol a 37 °C e 48 horas para os meios com pH em 3,4, 4,5, 5,4 e H₂O (n=3), e 72 horas para os meios com pH 1,2 e 6,8 (n=3).



Fonte: do autor.

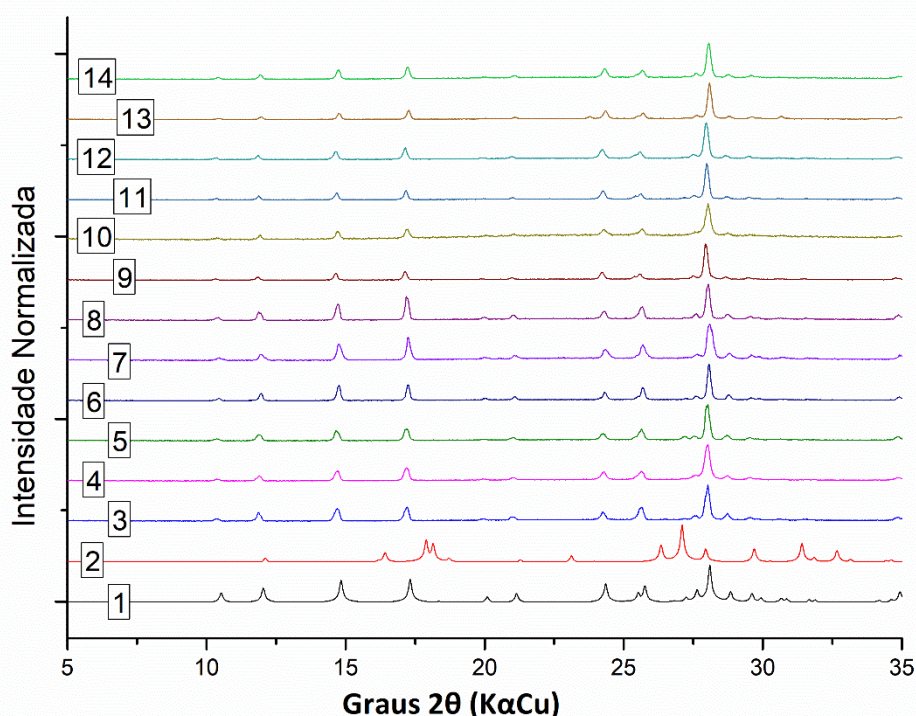
A partir dos resultados da Figura 23, observou-se que ambas as formas apresentaram maiores valores de solubilidade em pH 1,2 do que nos demais valores de pHs na temperatura de 37°C. Como discutido anteriormente, este fato ocorre devido à protonação da molécula de alopurinol em pHs ácidos ($pK_{a1} = 1,384$; figura 3, seção 2.1). Os pHs finais dos meios tamponados se mantiveram na sua respectiva faixa estudada. Entretanto, o pH final da solução de ALOCL em água estava entre 1 e 2. Este fato também ocorreu a 25°C e já foi discutido anteriormente.

Quando se compara as solubilidades de ALOBL e ALOCL a 37°C, verifica-se que ALOCL se demonstrou estatisticamente mais solúvel que ALOBL nos meios de pHs 4,5 e 5,4 (aproximadamente 8,6 % maior). Nos meios de pHs 1,2; 3,5; 6,8 e água, não houve diferença estatisticamente significativa de solubilidade entre as formas.

Considerando que sais normalmente são mais solúveis do que suas formas livres correspondentes, seria de se esperar que a solubilidade de ALOCL fosse maior do que a solubilidade de ALOBL em praticamente todos os meios, com exceção em tampão HCl 1,2, devido ao efeito do íon comum em ALOCL, como já discutido.

Portanto, a fim de verificar se houve conversão de formas, foram realizados ensaios de pós remanescentes dos estudos de solubilidade a 37 °C, em que o pó coletado foi filtrado, seco em dessecador e analisado por DRXP. Os resultados estão demonstrados na Figura 24 a seguir.

Figura 24 – Difratomogramas experimentais de pós remanescentes após ensaios de solubilidade a 37 °C das amostras ALOBL em pH 1,2 (3), 3,4 (4), 4,5 (5), 5,4 (6), 6,8 (7) e em água (8), e ALOCL em pH 1,2 (9), 3,4 (10), 4,5 (11), 5,4 (12), 6,8 (13) e em água (14), em comparação com padrões de difração calculados para a forma anidra de alopurinol (1) (PRUSINER; SUNDARALINGAM, 1972) e cloridrato de alopurinol (2) (SHELDRIK; BELL, 1987a; SHELDRIK; BELL, 1987b).

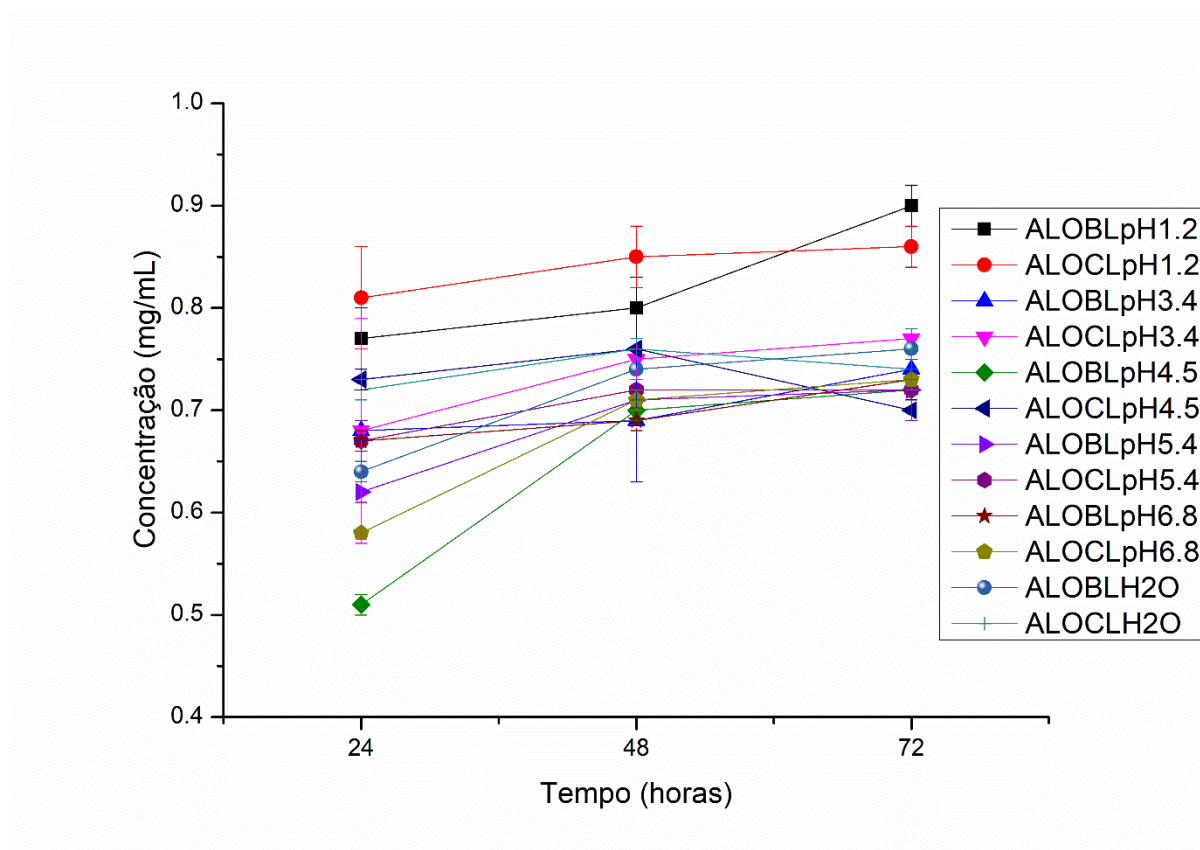


Fonte: do autor.

A partir dos resultados demonstrados na Figura 24, pode-se observar que houve conversão completa de ALOCL em ALOBL em todos meios testados. Para uma melhor compreensão do comportamento de solubilidade das formas, construiu-se um gráfico de

solubilidade de ALOBL E ALOCL nos tempos 24, 48 e 72 horas. Os resultados estão demonstrados na Figura 25.

Figura 25. Comparação da solubilidade das formas sólidas coletadas nos tempos de 24, 48 e 72 horas a 37 °C (n=3).



Fonte: do autor.

De acordo com o observado na Figura 25, pode-se deduzir que quanto maior o tempo, mais próximos são os valores de solubilidade de ALOBL e ALOCL. Estudos estatísticos a partir da ANOVA demonstraram que a solubilidade das formas estudadas é igual após 72 horas ($p > 0,05$), excluindo em pH 1,2, no qual a solubilidade de ambas as formas foi maior do que as demais, devido ao pK_{a1} da molécula de alopurinol (1,348, figura 3, seção 2.1). Portanto, a convergência de solubilidades entre as formas em função do tempo ocorreu devido à conversão de ALOCL para ALOBL.

5.7 DISSOLUÇÃO INTRÍNSECA

Antes da comparação entre os perfis de dissolução intrínseca de ALOBL e ALOCL, realizou-se uma otimização de condições. A otimização foi realizada utilizando amostras de ALOBL, nos seguintes meios: tampão HCl pH 1,2, tampão acetato pH 4,5 e tampão fosfato pH 6,8. Os seguintes parâmetros foram estudados: velocidade de rotação do *holder* contendo as pastilhas e força de compressão na produção das pastilhas.

Para construção dos perfis de dissolução intrínseca, foram retiradas alíquotas do meio nos tempos 60, 75, 90, 105 e 120 minutos, as quais foram quantificadas por CLAE utilizando o método previamente validado. Inicialmente, foram realizadas tentativas de quantificação de alíquotas nos tempos 5, 10, 15, 20, 30 e 45 minutos. Porém, foram observados valores abaixo do limite de quantificação do método ($2,12 \mu\text{g. mL}^{-1}$). Portanto, os valores abaixo do limite de quantificação do método foram excluídos.

As condições utilizadas na otimização de ensaio de dissolução intrínseca, através de um planejamento fatorial completo 2^2 , estão descritas nas Tabelas 22 e 23.

Tabela 22 – Fatores e níveis estudados para otimização de condições para ensaio de dissolução intrínseca.

Força de compressão		Velocidade de rotação	
4 KN	(-)	75 rpm	(-)
6 KN	(+)	100 rpm	(+)

Fonte: do autor.

Tabela 23 – Otimização de condições para ensaio de dissolução intrínseca.

Ensaio	Condição	
	Força de compressão (KN)	Velocidade de rotação (rpm)
1	-	-
2	-	-
3	-	+
4	-	+
5	+	-
6	+	-
7	+	+
8	+	+

Fonte: do autor.

Os resultados dos ensaios realizados em duplicata para cada condição descrita na Tabela 23 e para cada meio estão demonstrados nas Tabelas 24, 25 e 26, e são expressos em termos de quantidade dissolvida de fármaco em miligramas (mg) por tempo (minutos).

Tabela 24 – Resultados de dissolução intrínseca de ALOBL em meio pH 1,2.

Ensaio	Tempo (min)					Coef ang*	r*	IDR** (mg. min ⁻¹ . cm ⁻²)
	60	75	90	105	120			
	Quantidade liberada (mg)							
1	3,33	4,28	4,81	5,62	6,50	0,051	0,997	0,102
2	3,10	3,93	4,53	5,91	6,45	0,058	0,991	0,116
3	4,06	5,10	6,29	6,88	7,88	0,063	0,995	0,126
4	3,52	4,48	5,38	6,42	7,35	0,064	1,000	0,128
5	3,59	5,05	5,51	7,03	7,32	0,063	0,979	0,126
6	3,07	3,80	4,57	5,34	6,37	0,054	0,997	0,108
7	3,44	4,62	5,62	6,34	7,36	0,064	0,997	0,127
8	3,19	4,19	5,07	6,13	6,87	0,062	0,999	0,124

Fonte: do autor.

Legendas: *Coef ang: coeficiente angular; r: coeficiente de correlação; **IDR: taxa de dissolução intrínseca.

Tabela 25 – Resultados de dissolução intrínseca de ALOBL em meio pH 4,5.

Ensaio	Tempo (minutos)					Coef ang*	r*	IDR** (mg. min ⁻¹ . cm ⁻²)
	60	75	90	105	120			
	Quantidade liberada (mg)							
1	2,48	3,13	3,74	4,37	4,88	0,040	0,999	0,080
2	2,73	3,38	3,99	4,73	5,54	0,046	0,998	0,093
3	2,20	3,18	3,72	4,40	5,05	0,046	0,995	0,092
4	3,37	4,79	5,91	7,10	8,20	0,080	0,999	0,159
5	2,38	3,15	4,05	4,92	5,55	0,054	0,998	0,108
6	2,32	2,83	3,36	3,87	4,39	0,035	1,000	0,069
7	3,24	4,07	4,87	5,59	6,43	0,053	1,000	0,106
8	2,86	3,60	4,37	5,11	5,80	0,049	1,000	0,099

Fonte: do autor.

Legendas: *Coef ang: coeficiente angular; r: coeficiente de correlação; **IDR: taxa de dissolução intrínseca.

Tabela 26 – Resultados de dissolução intrínseca de ALOBL em meio pH 6,8.

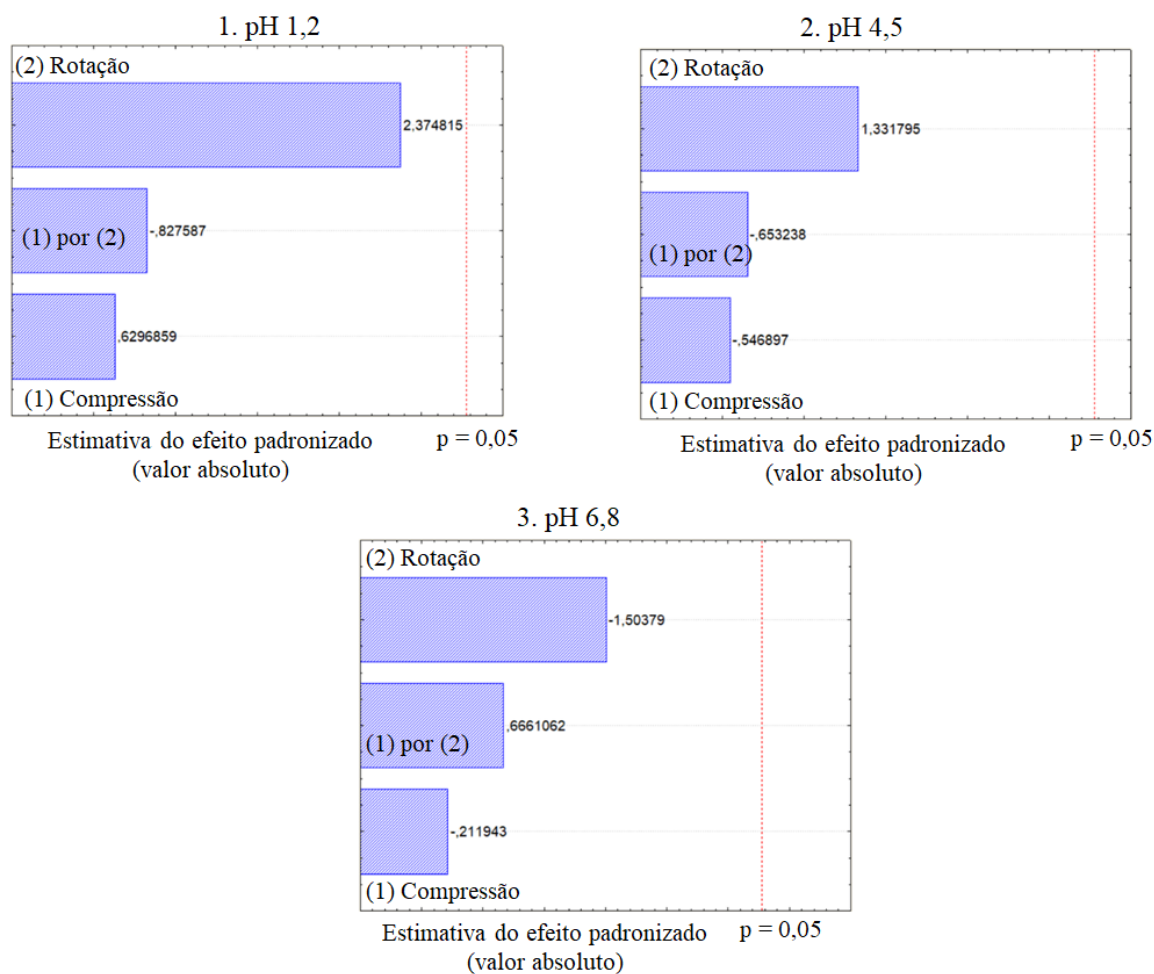
Ensaio	Tempo (minutos)					Coef ang*	r*	IDR** (mg. min ⁻¹ . cm ⁻²)
	60	75	90	105	120			
	Quantidade liberada (mg)							
1	2,17	2,58	3,16	3,97	4,59	0,042	0,994	0,083
2	2,31	2,88	3,33	4,22	4,76	0,042	0,995	0,083
3	3,02	3,97	4,70	5,62	6,12	0,052	0,996	0,105
4	3,18	3,65	4,65	5,63	6,11	0,052	0,991	0,104
5	2,09	2,96	3,52	4,32	5,70	0,057	0,987	0,114
6	2,56	3,15	3,73	4,44	4,82	0,039	0,997	0,078
7	2,47	3,18	3,92	4,76	5,24	0,048	0,997	0,095
8	2,53	3,41	3,82	4,41	5,03	0,040	0,994	0,080

Fonte: do autor.

Legendas: *Coef ang: coeficiente angular; r: coeficiente de correlação; **IDR: taxa de dissolução intrínseca.

A VDI é calculado a partir da liberação de fármaco por minuto (expressa pelo coeficiente angular de cada curva de linearidade), dividido pela área de disco do comprimido (0,5 cm²). Neste trabalho, o valor de VDI foi utilizado para otimização de condições para ensaio de dissolução intrínseca. A partir dos resultados de VDI sob cada condição, construíram-se diagramas de Pareto utilizando o software Statistica versão 7.0 (StatSoft Inc.®, Tulsa, Oklahoma, EUA). Os resultados estão demonstrados na Figura 26.

Figura 26 – Diagramas de Pareto ($n = 2^2$) para otimização de condições de ensaios de dissolução intrínseca



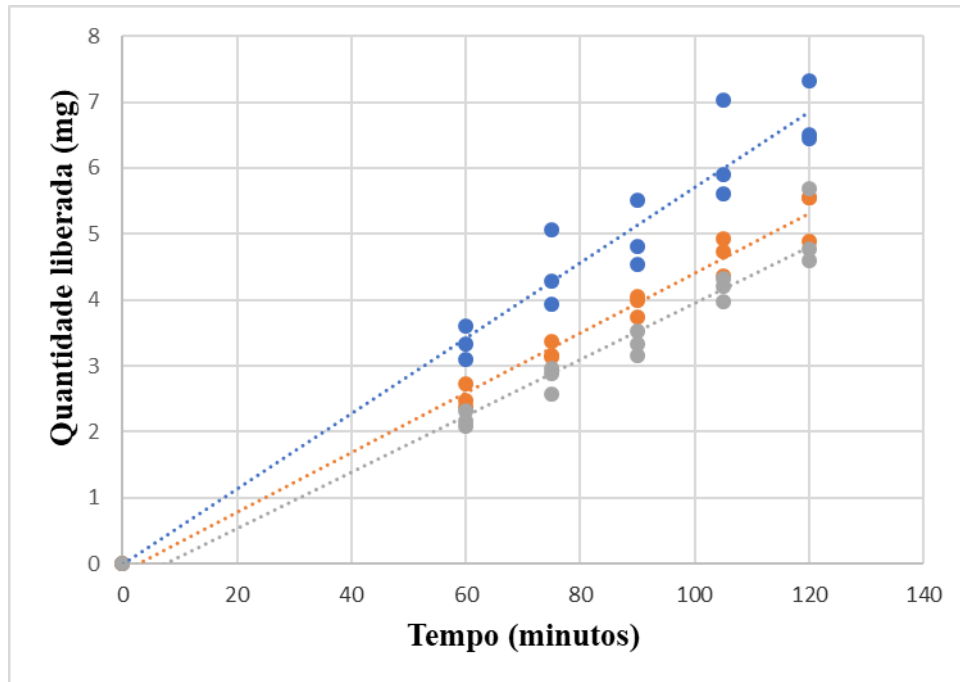
Fonte: Calculada e modificada a partir do software STATISTICA (2019).

O Diagrama de Pareto é um gráfico que define o quanto um ou mais fatores influenciam, ao nível de significância de 0,05, na resposta analítica, através do cálculo de efeitos. Efeitos acima da linha vermelha tracejada influenciam na resposta analítica.

A partir dos resultados demonstrados na Figura 26, é possível observar que não houve efeito estatístico significativo dos parâmetros testados. Aulton (2003) diz que se deve utilizar a maior força de compressão para formação das pastilhas, sem que haja desintegração das mesmas. A Farmacopeia USP (2017) especifica que uma maior velocidade de agitação é considerada ideal para se realizar o teste de dissolução intrínseca. Portanto, definiu-se como condições ideais para realização de estudos de dissolução intrínseca: força de compressão na produção das pastilhas de 6 KN e rotação do aparato de dissolução intrínseca a 100 rpm.

Posteriormente, foram realizados estudos de comparação de dissolução intrínseca de ALOBL em três diferentes pHs. Os estudos foram realizados em triplicata. Os resultados estão demonstrados na Figura 27.

Figura 27 – Estudo de comparação de dissolução intrínseca de ALOBL (n=3) entre os pHs 1,2 (azul), 4,5 (laranja) e 6,8 (cinza).

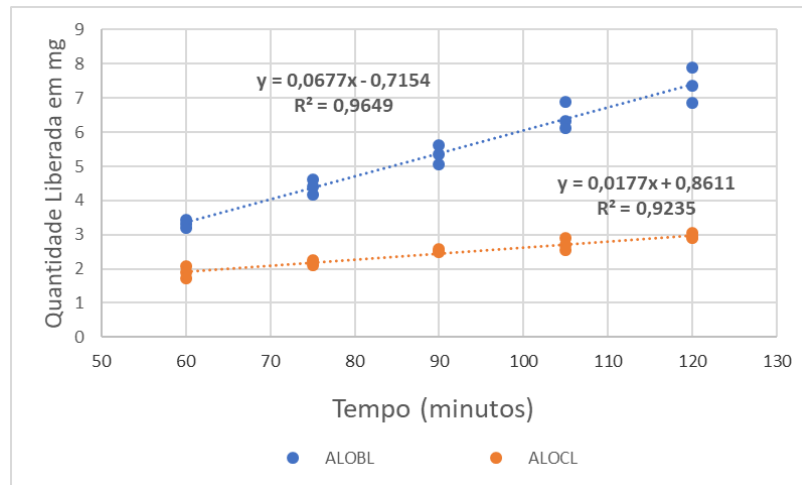


Fonte: do autor.

De acordo com a Figura 27, e um estudo estatístico de ANOVA seguido pelo teste de Tukey ao nível de significância de 0,05, realizado em cada tempo de 60, 75, 90, 105 e 120 minutos, foi possível observar que as taxas de dissolução de ALOBL nos pHs 4,5 e 6,8 são estatisticamente iguais entre si, e estatisticamente menores do que em pH 1,2. Se considerarmos o valor de pK_{a1} da molécula de alopurinol (1,34), espera-se que o alopurinol se dissolva mais facilmente em pHs ácidos, o que explica o comportamento observado neste trabalho.

Posteriormente, foram realizados estudos de comparação de dissolução intrínseca entre ALOBL e ALOCL em pH 1,2. Os resultados estão demonstrados na Figura 28.

Figura 28 – Estudos de dissolução intrínseca (n=3) de ALOBL (azul) e ALOCL laranja em meio pH 1,2.

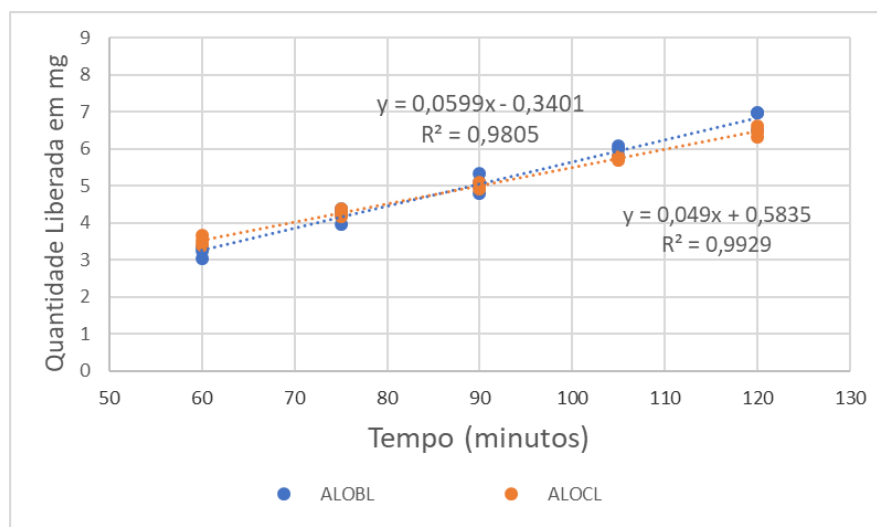


Fonte: do autor.

A partir dos resultados demonstrados na Figura 28, e um estudo estatístico de teste t de *Student* ao nível de significância de 0,05 realizado em cada tempo amostrado, podemos concluir que a taxa de dissolução entre ALOBL e ALOCL são estatisticamente diferentes, sendo que ALOBL apresentou VDI de $0,1354 \text{ mg}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{cm}^{-2}$, um valor 3,82 vezes maior que o VDI de $0,0354 \text{ mg}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{cm}^{-2}$ apresentado pelo ALOCL. Esses valores encontrados são justificados pelo “efeito de íon comum” no tampão HCL pH 1,2. O pH do meio de dissolução iniciou-se com um valor de 1,24, e no final de 120 minutos de ensaio o pH registrado foi de 1,38.

Foram realizados estudos de dissolução intrínseca para comparação entre ALOBL e ALOCL em meio de pH 4,5. Os resultados estão demonstrados na Figura 29.

Figura 29 – Estudos de dissolução intrínseca (n=3) de ALOBL (azul) e ALOCL (vermelho) em meio pH 4,5.

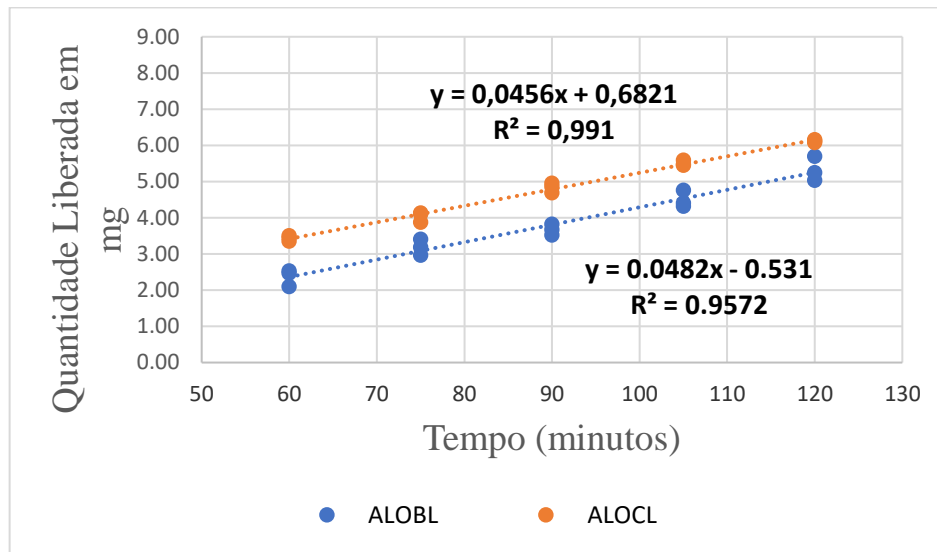


Fonte: do autor.

De acordo com os resultados demonstrados na Figura 29, foi realizada uma análise estatística de comparação pelo teste t de *Student*, ao nível de significância de 0,05 em cada tempo amostrado. Verificou-se que a quantidade média liberada de alopurinol nas duas formas sólidas foram estatisticamente iguais em cada um dos tempos amostrados.

Foram realizados estudos de dissolução intrínseca para comparação entre ALOBL e ALOCL em meio de pH 6,8. Os resultados estão demonstrados na Figura 30.

Figura 30 – Estudos de dissolução intrínseca (n=3) de ALOBL (azul) e ALOCL (vermelho) em pH 6,8.



Fonte: do autor.

Os resultados da Figura 30 foram utilizados para estudo estatístico de teste t de *Student* ao nível de significância de 0,05, comparando as formas estudadas em cada tempo amostrado. Observou-se que os valores de quantidade liberada são estatisticamente diferentes em todos os tempos, sendo que ALOCL apresentou maior quantidade liberada de fármaco do que ALOBL, exceto no tempo de 120 minutos, em que se demonstraram estatisticamente iguais.

Quando se compara o VDI das duas formas em pH 6,8, pode-se perceber que a taxa de dissolução de ALOBL (VDI = 0,0964) é semelhante à taxa de dissolução de ALOCL (VDI = 0,0912). Para comprovar essa teoria, fez-se um estudo estatístico por teste t de *Student* ao nível de significância de 0,05. Os resultados estão demonstrados na Tabela 27.

Tabela 27 – Comparação de VDIs de ALOBL e ALOCL em pH 6,8.

Replicata	VDI		Análise estatística
	ALOBL	ALOCL	
1	0,089	0,114	p = 0,64
2	0,091	0,095	
3	0,093	0,080	

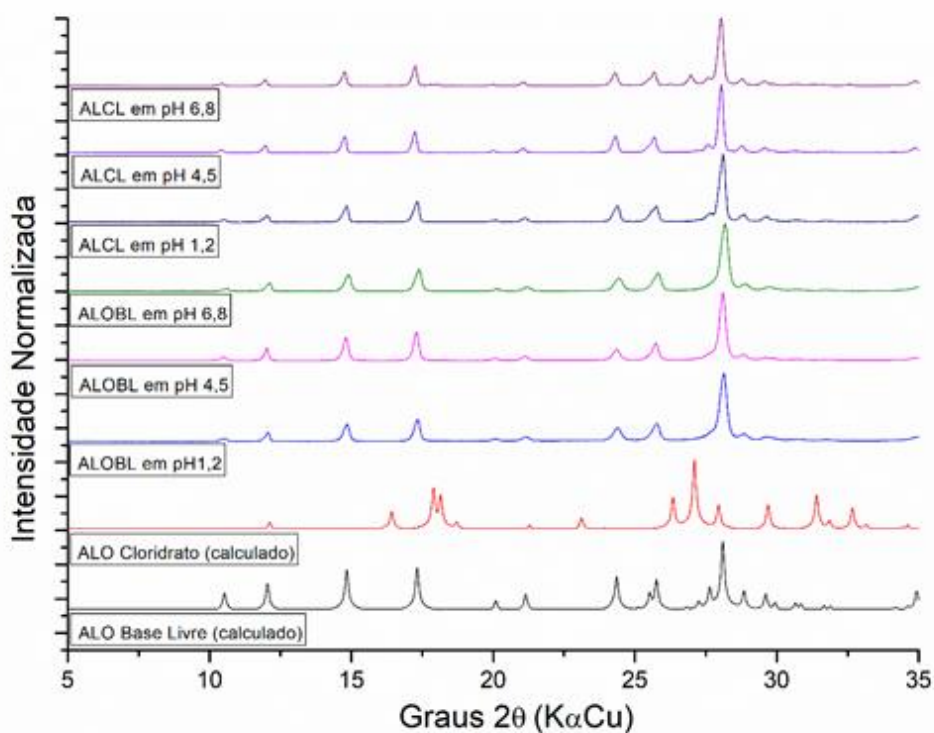
Fonte: do autor.

De acordo com os resultados demonstrados na Tabela 27, pode-se dizer que as taxas de dissolução intrínseca são estatisticamente iguais entre ALOBL e ALOCL em pH 6,8. Porém, ALOCL, por demonstrar menor coeficiente de variação entre suas réplicas, demonstra liberação do fármaco de forma mais constante.

O pH do meio de dissolução iniciou-se com um valor de 6,8, e no final de 120 minutos de ensaio o pH registrado foi de 6,76.

Foi realizado um estudo de pó remanescente para se verificar a estabilidade física dos dois sólidos durante os experimentos de dissolução intrínseca. Os resultados estão descritos na Figura 31.

Figura 31. Difratogramas experimentais de pó remanescente de ALOBL e ALOCL após experimentos de dissolução intrínseca.



Fonte: do autor.

Os resultados da Figura 31 demonstram que o ALOCL se converte totalmente na forma de ALOBL nos ensaios de dissolução. Portanto, nos experimentos de dissolução intrínseca em pH 4,5, os valores de liberação de alopurinol iguais para ALOBL e ALOCL em todos os tempos são explicados pela conversão de ALOCL em ALOBL. Em pH 6,8, essa conversão provavelmente ocorreu de forma mais lenta, devido aos valores de liberação se igualarem apenas após 120 minutos de experimento. Em pH 1,2, o efeito de íon comum mostrou-se predominante em relação à conversão de ALOCL em ALOBL.

Quando se comparam os resultados dos estudos de solubilidade com os estudos de dissolução intrínseca, observa-se claramente que os estudos de dissolução intrínseca são mais adequados para avaliação da qualidade de formas sólidas, principalmente quando há conversão entre essas formas, pois, neste trabalho, os estudos de dissolução intrínseca mostraram mais claramente as diferenças de comportamento entre ALOCL e ALOBL.

6 CONCLUSÃO

Neste trabalho, demonstrou-se que é possível a obtenção de alopurinol na sua forma de cloridrato (ALOCL) a partir da matéria-prima contendo a forma farmacêutica preferencialmente comercializada (ALOBL).

A caracterização se demonstrou eficaz na diferenciação dessas duas formas sólidas. Os ensaios de difração de Raios-X, junto com os ensaios de infravermelho e análises térmicas são válidos para identificação e diferenciação de ALOCL em relação ao ALOBL.

Os estudos por análises térmicas mostraram que ALOCL apresenta um evento endotérmico entre 137 e 234 °C que, associado à perda de massa de 20,15 % na análise termogravimétrica, provavelmente se deve à perda do HCl da estrutura cristalina.

As análises por espectroscopia na região do infravermelho permitiram diferenciação das duas formas. A observação das estruturas cristalinas de ALOBL e ALOCL (figura 4, seção 2.1), propiciou melhor compreensão em relação às diferenças de bandas de estiramento e dobramento das duas formas sólidas.

A validação do método cromatográfico é importante para assegurar confiabilidade dos dados. Na literatura se comprovou existir diferentes métodos para quantificação do alopurinol, os quais, porém, apresentam divergências nas condições de análise. O método validado neste trabalho se mostrou em condições mais adequadas de pH e comprimento de onda para utilização em ensaios de doseamento, solubilidade ou dissolução intrínseca.

Após os estudos de validação e caracterização de ALOBL e ALOCL, foram realizados estudos de solubilidade a 25 e 37 °C nas duas formas nos meios de pHs 1,2; 3,4; 4,5; 5,3; 6,8 e água destilada, a fim de se estabelecer se seria viável a comercialização de cloridrato de alopurinol, ou se a presença deste prejudicaria a qualidade de matérias-primas e medicamentos. A partir destes estudos, verificou-se que não há diferenças de solubilidade entre as formas a 25 °C. Porém, a 37 °C, pode-se observar que o ALOCL é estatisticamente mais solúvel em meios de pHs 4,5 e 5,4 após 48 horas de ensaio. Entretanto, há uma completa conversão do cloridrato de alopurinol em alopurinol base livre nos meios testados, sendo que as solubilidades das formas se igualam após 72 horas de ensaio.

Nos ensaios de dissolução intrínseca, verificou-se que a taxa de dissolução de ALOCL foi menor do que a observada para ALOBL em pH 1,2, devido ao efeito do íon comum. Em pH 6,8, foi observado que ALOCL apresentou maior quantidade de alopurinol liberado nos primeiros tempos, exceto após 120 minutos de teste, onde a quantidade liberada foi igual para as duas formas estudadas. Em pH 4,5, as quantidades de fármaco liberadas foram estatisticamente iguais em todos os tempos amostrados. Era de se esperar que ALOCL apresentasse maiores taxas de dissolução por ser um sal, devido ao controle do microambiente de dissolução, pelo menos nos pHs 4,5 e 6,8, onde não se observa o efeito do íon comum. Porém, isso não foi observado devido à conversão de ALOCL em ALOBL. Portanto, nos tempos onde a quantidade dissolvida de alopurinol é igual para as duas formas, a taxa de conversão de ALOCL para ALOBL é mais rápida do que a taxa de liberação do alopurinol de ALOCL para o meio.

Já no estudo de estabilidade acelerada, houve aparecimento de picos de contaminação de ALOBL em ALOCL após 6 meses de acondicionamento. Entretanto, os teores de alopurinol se encontraram dentro da faixa de 98 a 102 % no ensaio de doseamento.

Com base nos resultados observados neste trabalho conclui-se que o cloridrato de alopurinol não apresenta vantagens em relação à forma atualmente comercializada (base livre). Embora os sais apresentem frequentemente vantagens em relação às suas formas livres correspondentes em termos de solubilidade, o efeito do íon comum observado em ALOCL foi preponderante na diminuição das quantidades de alopurinol liberadas nos ensaios de dissolução intrínseca. Considerando que medicamentos por via oral entram em contato rapidamente com o suco gástrico, a presença de ALOCL pode prejudicar a farmacocinética de formulações contendo alopurinol. Este fator é relevante quando se considera que o alopurinol apresenta baixa solubilidade em solventes aquosos (classe IV no SCB).

Outro fator que merece atenção é a conversão de ALOCL em ALOBL, o que torna o sal menos viável do ponto de vista da estabilidade. A maior estabilidade física de ALOBL provavelmente se deve às várias ligações de hidrogênio intermoleculares observadas na sua estrutura cristalina. Esta característica apresentada por ALOBL pode ser o fator responsável pela sua baixa solubilidade aquosa ($0,8 \text{ mg.mL}^{-1}$), mesmo a molécula apresentando alta polaridade ($\text{Log P} = 0,28$).

Desta forma, conclui-se que a realização de estudos comparativos entre formas sólidas é de grande importância, pois contribuem para entendimento de aspectos relacionados à estabilidade, solubilidade e/ou dissolução intrínseca, contribuindo dessa forma para a garantia da qualidade de fármacos e medicamentos comercializados.

REFERÊNCIAS

- ABDEL-HAYA, M. H.; BARARYA, M. H.; ELSAYED, M. A. Use of derivative spectro photometry for the in vitro determination of allopurinol and uric acid mixtures. **Anal Lett**, v. 24, p. 517-1530, 1991.
- AITIPAMULA, S. et al. Polymorphs, Salts, and Cocrystals: What's in a Name? **Cryst Growth Des**, v. 12, n. 5, p. 2147-2152, 2012.
- ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. **Appendix D: Guidelines for collaborative study procedures to validate characteristics of a method of analysis**. Rockville: AOAC International, 2002.
- AULTON, M. E. **Delineamento de formas farmacêuticas**. 2. ed. Porto Alegre: Artmed, 2005.
- BAKSHI, M.; SINGH, S. Development of validated stability-indicating assay methods—critical review. **J Pharmaceut Biomed**, v. 28, n. 6, p. 1011–1040, 2002.
- BARR, J., T. et al. Why do most human liver cytosol preparations lack xanthine oxidase activity? **Drug Metab Dispos**, v. 42, p. 695-699, 2014.
- BCS Database Search**. Ann Arbor: The Drug Delivery Foundation, 2000. Disponível em: <<http://www.ddfint.net/search.cfm>>. Acesso em: 4 out. 2019.
- BEDAIRA, M. M.; KORANYA, M. A; ELSAYEDA, M. A. Spectrofluorimetric determination of three pharmaceutical thiocompounds and allopurinol using mercurochrome. **Spec Lett**, v. 23, p. 161-173, 1990.
- BERGE, S.M., BIGHLEY, L.D., MONKHOUSE, D.C. Pharmaceutical salts. **J Pharm Sci**, v. 66, p. 1-19, 1977.
- BERNSTEIN, J. **Polymorphism in molecular crystals**. New York: Oxford University Press, 2002.
- BELOUAFI, S. et al. Statistical tools and approaches to validate analytical methods: methodology and practical examples. **Internat J Metrol Qual Engineer**, v. 8, n. 9, p. 1-10, 2017.
- BLESSY, M. Development of forced degradation and stability indicating studies of drugs – A review. **J Pharm Anal**, v. 4, n. 3, p. 159-165, 2014.
- BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RE nº 1, de 29 de julho de 2005. **Guia Para Realização de Estudos de Estabilidade**. Brasília, DF: Diário Oficial da União, 01 ago. 2005. Disponível em: <https://www.diariodasleis.com.br/busca/exibelink.php?numlink=213898>. Acesso em 19 fev. 2018.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Nota técnica n° 003/2013/CEFAR/GTFAR/GGMED/ANVISA. **Dispõe sobre a avaliação da solubilidade de fármacos e o desenvolvimento de métodos de dissolução para estudos de equivalência farmacêutica e perfil de dissolução comparativo, e dá outras providências.** 2013.

Disponível em:

<<http://portal.anvisa.gov.br/documents/33836/349757/Nota+t%C3%A9cnica+n%C2%BA+03+de+2013+-+CEFAR-GTFAR-GGMED-Anvisa/2c769030-a303-4c8f-adc8-5fd781695725>>.

Acesso em 19 fev. 2018.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC n°166, de 24 de julho de 2017. **Dispõe sobre a validação de métodos analíticos e dá outras providências.** 2017.

Brasília, DF: Diário Oficial da União, 25 jul. 2017. Disponível em:

<<http://portal.anvisa.gov.br>>. Acesso em: 19 fev. 2018.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC n°318, de 6 de novembro de 2019. **Dispõe sobre a realização de estudos de estabilidade de insumos farmacêuticos ativos e medicamentos.** Brasília, DF: Diário Oficial da União, 7 nov. 2019.

Disponível em: <<https://www.editoraroncarati.com.br/v2/Diario-Oficial/Diario-Oficial/RESOLUCAO-RDC-N%C2%BA-318-DE-06-11-2019.html>>.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Lista de medicamentos referência.**

Disponível em:

<<http://portal.anvisa.gov.br/registros-e-autorizacoes/medicamentos/produtos/medicamentos-de-referencia/lista>>. Acesso em 21 fev. 2018.

BRITISH PHARMACOPOEIA. London: The British Pharmacopoeia Convention, 2017.

BRITAIN, H. G. Polymorphism in pharmaceutical solids. **J Pharm Sci**, v. 98, n. 5, p. 1617-1642, 2009.

CARVALHO, J. P. et al. Estabilidade de Medicamentos no Âmbito da Farmacovigilância. **Farms & Med**, São Paulo, v. 6, n. 34, p.22-27, 2005.

CHATTEN, L. G. et al. Determination of allopurinol in tablets by differential-pulse polarography. **Analyst**, v. 106, p. 365-368, 1981.

CHAUHAN, A.; MITTU, B.; CHAUHAN, P. Analytical Method Development and Validation: A Concise Review. **J Anal Bioanal Tech**, v. 6, n. 1, p. 1-5, 2015.

CHIENG, N.; RADES, T.; AALTONEN, J. An overview of recent studies on the analysis of pharmaceutical polymorphs. **J Pharm Biomed Anal**, v. 55, p. 618-644, 2011.

DATTA, S.; GRANT, D. J. W. Crystal structures of drugs: advances in determination, prediction and engineering. **Nat Rev Drug Discov**, v. 3, n. 1, p. 42-57, 2004.

DRUGBANK. **Drugbank**: allopurinol, 2019a. Disponível em:

<https://www.drugbank.ca/drug/DB00437>. Acesso em: 12 de julho de 2019.

DRUGBANK. **Drugbank**: lisenurad, 2019b. Disponível em:

<https://www.drugbank.ca/drug/DB11500>. Acesso em: 12 de julho de 2019.

DRYHURST, G.; DE, P. K. A direct electrochemical method for the determination of allopurinol and uric acid mixtures: Adsorption of uric acid at the pyrolytic graphite electrode. **Anal Chim Acta**, v. 58, p. 183-191, 1972.

EDDLESTON, M. D. et al. Determination of the Crystal Structure of a New Polymorph of Theophylline. **Chem Eur J**, v. 19, p. 7883-7888, 2013.

EUROPEAN PHARMACOPOEIA. 6. ed. Strasbourg: EDQM Council of Europe, 2008.

FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. Reviewer Guidance. **Validation of chromatographic methods**. Washington DC: Center for Drug Evaluation and Research, 1994.

FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. **NDA 209203 Multi-disciplinary Review and Evaluation**. Washington DC: Center for drug evaluation and research, 2017. Disponível em: <https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/nda/2017/209203Orig1s000MultidisciplineR.pdf>. Acesso em: 19 de julho de 2019.

FREITAS, J. T. J. et al. Analysis of polymorphic contamination in meloxicam raw material and its effects on the physicochemical quality of drug product. **Eur J Pharm Sci**, v. 109, p. 347-358, 2018.

FUCHS, P. et al. Xanthine oxidase inhibition by allopurinol affects the reliability of urinary caffeine metabolic ratios as markers for N-acetyltransferase 2 and CYP1A2 activities. **Eur J Clin Pharmacol**, v. 54, p. 869-876, 1999.

GILLON, A. L. et al. Hydration in molecular crystals - a Cambridge structural database analysis. **Crystal Growth & Design**, v.3, n. 5, p. 663-673, 2003.

GONZÁLEZ, A. G.; HERRADOR, M. A. A practical guide to analytical method validation, including measurement uncertainty and accuracy profiles. **Trends Anal Chem**, v. 26, n. 3, p. 227-238, 2007.

GUPTA, V.; JAIN, A. D. K.; GILL, N. S.; GUPTA, K. Development and validation of HPLC method - a review. **Interl Res J Pharm App Sci**, v. 2, n. 4, p. 17-25, 2012.

HANGZHOU LINGYE PHARMACEUTICAL TECHNOLOGY. Haifeng, S.; Jianfeng, M.; Xiaoxia, S. **Preparation of allopurinol crystal**. Depósito: 15 abr. 2013. Concessão: 6 ago. 2014. CN103965197A.

HASON, S. et al. Simultaneous electrochemical monitoring of metabolites related to the xanthine oxidase pathway using a grinded carbon electrode. **Anal Chem**, v. 81, p. 4302-4307, 2009.

HUANG, L. F.; TONG, W. Q. Impact of solid state properties on developability assessment of drug candidates. **Adv Drug Deliv Rev**, v. 56, n. 3, p. 321-334, 2004.

PHARMACEUTICAL QIANHUI. Hui, Y. L. et al. **Preparation method of allopurinol**. Depósito: 26 nov. 2014. Concessão: 4 mar. 2015. CN104387394A.

THE INTERNATIONAL COUNCIL FOR HARMONISATION OF TECHNICAL REQUIREMENTS FOR PHARMACEUTICALS FOR HUMAN USE. **Q1A (R2): ICH stability testing of new drug substances and products**. Geneva: ICH Harmonised Tripartite Guideline, 2003.

THE INTERNATIONAL COUNCIL FOR HARMONISATION OF TECHNICAL REQUIREMENTS FOR PHARMACEUTICALS FOR HUMAN USE. **Q2(R1): Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology**. Geneva: ICH Harmonised Tripartite Guideline, 2005.

THE INTERNATIONAL COUNCIL FOR HARMONISATION OF TECHNICAL REQUIREMENTS FOR PHARMACEUTICALS FOR HUMAN USE. **Q3A (R2): Impurities in New Drug Substances**. Geneva: ICH Harmonised Tripartite Guideline, 2006.

KELKAR, A.; KUO, A.; FRISHMAN, W. H. Allopurinol as a Cardiovascular Drug. **Cardiol Rev**, v. 19, n. 6, p. 265-271, 2011.

KHAYOON, W. S.; AL-ABAICHY, M. Q.; JASIM, M.; AL-HAMADANY, M. A. Spectrophotometric determination of Allopurinol in tablete formulation. **J Phy Sci** v.19, p. 23-30, 2008.

KUMAR, A.; KISHORE, L.; KAUR, N.; ANROOP NAIR, A. Method development and validation: Skills and tricks. **Chron Young Sci**, v. 3, n. 1, p. 3-11, 2012.

LAGO, V. V.; PEREIRA, R. N.; BERTOL, C. D. Propriedades micromeríticas e análise físico-química de matérias-primas de alopurinol. **J Appl Pharm**, v. 33, n. 3, p. 385-393, 2012.

LARSSON, J. **Methods for measurement of solubility and dissolution rate of sparingly soluble drugs**. 2009. 25f Dissertação (Mestrado em Engenharia Química), Faculdade de Engenharia, Lund University, Lund, 2009.

LEE, A. Y.; ERDEMIR, D.; MYERSON, A. S., 2011. Crystal polymorphism in chemical process development. **Annu Rev Chem Biomol Eng**, v. 2, p. 259-280, 2011.

LI, Y.; CHOW, P. S.; TAN, R. B. H. Quantification of polymorphic impurity in enantiotropic polymorph system using differential scanning calorimetry, X-ray powder diffraction and Raman spectroscopy. **Int J Pharm**, v. p. 415, 110-118, 2011.

LINDER, P. W.; STANFORD, M. J.; WILLIAMS, D. R. Formation constants for the hypoxanthine- and allopurinol-proton and nickel(II) systems. **J Inorg Nucl Chem**, v. 38, p. 1847-1849, 1976.

LIU, C. F. et al. Determination of allopurinol in tablets and urine by oscillopolarography, Yao Xue Xue Bao, v. 24, p. 690-696, 1989.

LLINÀS, A.; BURLEY, J. C.; PRIOR, T. J.; GLEN, R. C.; GOODMAN, J. M.; Concomitant hydrate polymorphism in the precipitation of sparfloxacin from aqueous solution. **Cryst Growth Des**, v. 8, p. 114-118, 2008.

LOHANI, S.; COOPER, H.; JIN, X.; NISSLEY, B. P.; MANSER, K.; RAKES, L. H.; CUMMINGS, J. J.; FAUTY, S. E.; BAK, A. Physicochemical properties, form, and formulation selection strategy for a biopharmaceutical classification system class II preclinical drug candidate. **J Pharm Sci**, v. 103, p. 3007–3021, 2014.

JIANGSU YEW PHARMACEUTICAL. Li Long. **Rectification method of allopurinol**. Depósito: 2010. Concessão: 2011. CN102153560A.

LUI, X. et al. Determination of allopurinol and oxypurinol in human plasma and urine by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **J Chromatog B**. v. 941, p. 10-16, 2013.

MAGNUSSON, B.; ÖRNEMARK, U. (eds.) **Eurachem Guide: the fitness for purpose of analytical methods – a laboratory guide to method validation and related topics**. 2. ed., 2014.

MARÁKOVÁ, K. et al. Capillary electrophoresis hyphenated with mass spectrometry for determination of inflammatory bowel disease drugs in clinical urine samples. **Mol.**, v. 22, 1973.

MCCAULEY, J. A.; VARSOLONA, R. J.; A LEVORSE, D. The effect of polymorphism and metastability on the characterization and isolation of two pharmaceutical compounds. **J Phys D: Appl Phys**, v. 26, n. 8, p. B85-B89, 1993.

NEWMAN, A. W.; BYRN, S. R. Solid-state analysis of the active pharmaceutical ingredient in drug products. **Drug Discov Today**, v. 8, n. 19, p. 898–905, 2003.

NGWA, G. Forced degradation studies as an integral part of HPLC stability indicating method development. **Drug Deliv Technol**, v.10, n. 5, p. 56–59, 2010.

O'NEIL, M. J. The Merck Index - an encyclopedia of chemicals, drugs, and biologicals. Cambridge, UK: **Royal Society of Chem.**, p. 52, 2013.

O'DONNELL, P. B.; BOKSER, A. D. Stability of Pharmaceutical Products. In: GENNARO, A. **Remington: the science and practice of pharmacy**. 21. ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, p. 1025-1036, 2005.

PAYGHAN, S. A. et al. Pharmaceutical solid polymorphism: approach in regulatory consideration. **J GI Pharma Tec.**, v. 2, n. 1, p.8-16, 2010.

PATEL, D. J.; JAIN, V. C.; RAJ, H. A. Development and validation of spectroscopic method for simultaneous estimation of allopurinol and α -lipoic acid in combination tablet. **Res Rev: J Pharm Anal**, v. 3. n. 3, p. 28-36, 2014.

PERALTA-ZAMORA, P; MORAIS, J L; NAGATA, N. Por que otimização multivariada? **Eng Sanit Ambient**, v. 10, n. 2, p.106-110, 2005.

PEREZ-RUIZ T., MARINEZ-LOZANO C., TOMAS V., GALERA R. Development of a capillary electrophoresis method for the determination of allopurinol and its active metabolite oxypurinol. **J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci**, v. 798, p. 303-308, 2003a.

PEREZ-RUIZ T.; MARINEZ-LOZANO C.; TOMAS V.; MARTIN J. Determination of allopurinol by micelle-stabilised room-temperature phosphorescence in real samples. **J Pharm Biomed Anal**, v. 32, p. 225-231, 2013b.

PRADO, L. D.; ROCHA, H. V. A. Estado sólido na indústria farmacêutica: uma breve revisão. **Rev Vir Quím**, v. 7, n. 6, p. 2080-2112, 2015.

PRUSINER, P.; SUNDARALINGAM, M. Stereochemistry of nucleic acids and their constituents. XXIX. Crystal and molecular structure of allopurinol, a potent inhibitor of xanthine oxidase. **Acta Crystallogr Sect B**, v. 28, p.2148, 1972.

PUROHIT, R.; VENUGOPALAN, P. Polymorphism: an overview. **Resonance**, v. 14, n. 9, p. 882-893, 2009.

RAJ, M., A.; JOHN, A. Electrochemical Determination of xanthine oxidase inhibitor drug in urate lowering therapy using graphene nanosheets modified electrode. **Electrochim Acta**, v. 117, p. 360-366, 2014.

RAJKUMAR, B.; BHAVYA, T.; KUMAR, A., A. Reverse phase HPLC method development and validation for the simultaneous quantitative estimation of alpha lipoic acid and allopurinol in tablets. **Int J Pharm Pharm Sci**, v. 6, n. 1, p. 307-312, 2014.

RATHOD, D. M.; PATEL, K. R.; MISTRI, H. N.; JANGID, A. G.; SHRIVASTAV, P. S.; SANYAL, M. Simultaneous analysis of allopurinol and oxypurinol using a validated liquid chromatography-tandem mass spectrometry method in human plasma. **J Pharm Anal**, 2015. No prelo.

RAVINDRA, N. V.; PANPALIA, G. M.; SARMA, J. A. R. P. Bis[5-oxo-4,5-di-hydro-8H-2-azonia-4,8,9-triazabi-cyclo[4.3.0]nona-2,6,9(1)-triene] sulfate. **Acta Crystallogr Sect E Struct Rep Online**, v. 64, n. 24, 2008.

REFAT M. S.; MOHAMED G. G.; FATHI A. Spectrophotometric determination of allopurinol drug in tablets: Spectroscopic characterization of the solid CT complexes. **Bull Korean Chem Soc**, v. 31, p. 535-542, 2010.

RIBANI, M. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Quim Nova**, v. 27, n. 5, p. 771-780, 2004.

RIBEIRO, B. T. L.; SILVA, F. S. Q. Avaliação do perfil de dissolução de comprimidos a base de Alopurinol. Disponível em: < <http://www2.unigranrio.br/recursos/documentos/IC/6IC.pdf>>. Acesso em: 27 de jul. de 2018.

ROSA, M., F.; VILHENA, R. de O. Dissolução intrínseca: conceito e aplicações na indústria farmacêutica. **Rev Eletronica Farm.**, v. 9, n. 1, p. 49-61, 2012.

SAIFEE, M. et al. Drug Polymorphism: A Review. **Inter J Health Res**, v. 2, n. 4, p.291-306, 2009.

SANTOS, O. M. M. et al. Polymorphism: an evaluation of the potential risk to the quality of drug products from the Farmácia Popular Rede Própria. **Braz J Pharm Sci**, v. 50, n. 1, p.1-24, 2014.

SCOPUS. Scopus: document search, 2019. Disponível em: <https://www.scopus.com/search/form.uri?display=basic>. Acesso em: 6 de fevereiro de 2019.

SHELDRIK, W. S.; BELL, P. Interaction of metal ions with 7-deaza-8-aza- and 8-aza-purines preparation and x-ray structural analysis of copper (ii) complexes. **Z Naturforsch B**, v. 42, p. 195, 1987a.

SHELDRIK, W. S.; BELL, P. Interaction of metal ions with allopurinol derivatives. Preparation and structural characterization of methylmercury (II) complexes. **Inorg Chim Acta**, v. 137, n. 3, p. 181-188, 1987.

SHOSTAK, D. LC method for determination of allopurinol in tablets: a collaborative study. **J Assoc Off Anal Chem**, v. 67, p. 121-1122, 1984.

SHOUKRALLAHA, I.; SAKLAB, A.; WINTERSTEIGERC, R. Determination of allopurinol and flucytosine in tablets by differential UV spectroscopy. **Anal Let**, v. 23, p. 843-861, 1990.

SHRIVASTAVA, A.; GUPTA, V. B. Methods for the determination of limit of detection and limit of quantitation of the analytical methods. **Chron Young Sci**, v. 2, n. 1, p. 21-25, 2011.

SMETISKO, J.; MILJANIC, S. Dissolution assessment of allopurinol immediate release table by near infrared spectroscopy. **J Pharm Biom Anal**, v. 145, p. 322-330, 2017.

SINGH, S.; GADHAWALA, Z. Development of a stability indicating RP-RRLC method for determination of allopurinol and its degradation products in solid oral dosage. **International Journal of PharmTech Research**, v. 5, n. 1, p.44-53, 2013.

SNYDER, L. R.; KIRKLAND, J. J.; GLAJCH, J. L. **Practical HPLC Method Development**. 2. ed. New Jersey: John Wiley & Sons, 1997, 800p.

STAMP, L., K. et al. Relationship between serum urate and plasma oxypurinol in the management of gout: determination of minimum plasma oxypurinol concentration to achieve a target serum urate level. **Nature**, v. 90, n. 3, p. 392-398, 2011.

STEPHENSON, G. A. Structure Determination from Conventional Powder Diffraction Data: Application to Hydrates, Hydrochloride Salts, and Metastable Polymorphs. **J Pharma Sci.**, v. 89, n. 7, p. 958-966, 2000.

SWARTZ, M. E.; KRULL, I. S. **Handbook of analytical validation**. Flórida: CRC Press, 2012, 220p.

TAVERNIERS, I.; DE LOOSE, M.; BOCKSTAELE, E. V. Trends in quality in the analytical laboratory. II. Analytical method validation and quality assurance. **Trends Anal Chem**, v. 23, n. 8, p. 535-552, 2004.

TKACH, V. V. et al. The mathematical description of allopurinol electrochemical determination, assisted by VO₂⁺/VO₂⁺ redox pair in acidic solutions. **Anal Bioanal Electrochem**, v. 10, n. 3, p. 302-309, 2018.

THOMPSON, M.; ELLISON, S. L. R.; WOOD, R. Harmonized guidelines for single-laboratory validation of methods of analysis - (IUPAC technical report). **Pure and Applied Chemistry**, v. 74, n. 5, p. 835-855, 2002.

TOMMASO R., CATALDI I., PALMISANO F., ZAMBONIN P. G. Flow injection with anodic polarographic detection for the determination of allopurinol in pharmaceutical formulations. **Analyst**, v. 114, p. 1449-1452, 1989.

UNITED STATES. FDA. **Guidance for industry, analytical procedures and methods validation for drugs and biologics**. Center for Drug Evaluation and Research. July 2015.

UNITED STATES PHARMACOPEIA-NATIONAL FORMULARY (USP-NF). **USP40-NF35 ed.** Rockville: United States Pharmacopeial Convention, 2017. 4 v.

VOGT, F. G.; KORD, A. S. K. Development of quality-by-design analytical methods. **J Pharm Sci**, v. 100, n. 3, p. 797-812, 2011.

WANG, B.; HU, L.; SIAHAAN, T. J. **J Drug Deliv Sci Technol**. 2. ed. New Jersey: John Wiley & Sons, 2016.

WATZIG, H. Validation of analytical methods using capillary electrophoresis. **Sep Sci Technol**, v. 9, n. 1, p. 225-244, 2008.

WESSEL, T.; LANVERS, C.; FRUEND, S.; HEMPEL, G. Determination of purines including 2,8-dihydroxyadenine in urine using capillary electrophoresis. **J Chromatog A**, v. 894, p. 157-164, 2000.

WIEDMANN, T. S.; NAQWI, A. Pharmaceutical salts: Theory, use in solid dosage forms and in situ preparation in an aerosol. **Asian J Pharm Sci**, v. 11, ed. 6, p. 722-734, 2016.

YAZID, E., A.; SUPRIYANTO, G.; TJAHLJANDARIE, T., S. Development of spectrophotometric method for allopurinol in urine based on the diazotation reaction. **Anal Sci**, v. 18, n. 1, p. 212-220, 2014.

SHANGHAI TITAN TECHNOLOGY. Xie Yingbo. **Synthesis process of pyrazolo [3,4-d] pyrimidine compounds**. Depósito: 19 nov. 2014. Concessão: 25 mar. 2015. CN104447758A.

YU, L. X. Scientific considerations of pharmaceutical solid polymorphism in abbreviated new drug applications. **Pharm Res**, v. 20, n. 4, p. 531-536, 2003.