



**UNIVERSIDADE DO ESTADO DA BAHIA (UNEB)**  
**DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS HUMANAS E DA TERRA (DCET)**  
**PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM QUÍMICA APLICADA (PGQA)**



**DESENVOLVIMENTO DE MÉTODOS ANALÍTICOS SUSTENTÁVEIS,  
ESTUDOS DE DISSOLUÇÃO E ESTABILIDADE PARA A AVALIAÇÃO DA  
QUALIDADE DE ALOPURINOL**

Salvador/Bahia

2020

**ANDERSON SILVA DE OLIVEIRA**

**DESENVOLVIMENTO DE MÉTODOS ANALÍTICOS SUSTENTÁVEIS,  
ESTUDOS DE DISSOLUÇÃO E ESTABILIDADE PARA A AVALIAÇÃO DA  
QUALIDADE DE ALOPURINOL**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Química Aplicada (PGQA), da Universidade do Estado da Bahia (UNEB), como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Química Aplicada.

**Orientador:** Prof. Dr. Aníbal de Freitas Santos Júnior

**Coorientadora:** Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Débora de Andrade Santana

Salvador/Bahia

2020

FICHA CATALOGRÁFICA  
Sistema de Bibliotecas da UNEB  
Dados fornecidos pelo autor

O48d

Oliveira, Anderson Silva de

DESENVOLVIMENTO DE MÉTODOS ANALÍTICOS  
SUSTENTÁVEIS, ESTUDOS DE DISSOLUÇÃO E ESTABILIDADE PARA  
A AVALIAÇÃO DA QUALIDADE DE ALOPURINOL / Anderson Silva de  
Oliveira.-- Salvador, 2020.

121 fls : il.

Orientador(a): Aníbal de Freitas Santos Júnior.

Coorientador(a): Débora de Andrade Santana.

Inclui Referências

Dissertação (Mestrado Acadêmico) - Universidade do Estado da  
Bahia. Departamento de Ciências Exatas e da Terra. Programa de  
Pós-Graduação em Química Aplicada - PGQA, Câmpus I. 2020.

1.Alopurinol. 2.Desenvolvimento de métodos. 3.Validação analítica.  
4.Dissolução. 5.Estabilidade.

CDD: 543

## AGRADECIMENTOS

A Deus por me dar a oportunidade de viver e estar alcançando mais um objetivo de vida, neste curto espaço de tempo em que estamos na Terra;

Ao meu orientador Aníbal de Freitas Santos Júnior, pelo exemplo como professor, sempre educado e exigente, mas sempre com a intenção de mostrar que podemos ultrapassar nossos obstáculos e avançar em prol de nossos objetivos;

À minha Coorientadora Débora de Andrade Santana por todos os seus ensinamentos e sua paciência e dedicação para meu aprendizado e dos demais colegas;

A todos os colegas da turma do mestrado do PGQA 2018, com os quais pude conviver esse período e dividir experiências, sempre com a intenção de somá-las;

A todos os professores e técnicos dos colegiados de graduação e pós-graduação de química. Tive o prazer de aprender muito com vocês durante todo este período e tenham certeza de que levarei esses ensinamentos para os meus espaços de aprendizagem;

A todos os professores e técnicos do PPGFARMA, que também tive o prazer de conhecer e trocar experiências;

Aos grupos de pesquisa GPDQA e Biofarmácia que me deram o suporte no momento necessário e, sem nossas discussões, este trabalho não seria possível;

Aos alunos de Iniciação científica do laboratório de professor Aníbal que me auxiliaram nos processos de desenvolvimento deste trabalho e todos os outros que aconteceram em paralelo;

A Diretoria de Vigilância Sanitária e Ambiental do Estado da Bahia, em especial a COVIM/NUVIP, por me apoiar nos momentos mais estressantes deste processo e por me motivar a ir mais além.

Aos alunos do curso de Farmácia da Universidade Dom Pedro II, pois a vontade de aprender cada dia mais passa pela necessidade de ofertar, o pouco que sei, e construirmos um mundo melhor, a partir desta oferta.

E, por fim, agradeço a minha família de um modo geral, pelas bagunças e as distrações nos momentos adequados. A minha irmã, Elineusa, que é um exemplo de força e coragem para perseguir os seus objetivos e acaba contagiando todos ao redor. Meus sobrinhos, Letícia e Pablo, que são os meus maiores motivos de alegria. Pena que não podemos estar juntos sempre, mas os meios de comunicação nos aproximam muito. Minha mãe, Neusa, que sempre fez e faz de tudo por mim. Sabia que não tenho como pagar, tudo o que fizeste por mim e que sempre serei grato por todos os ensinamentos que a mim foram dados. Tudo o que conquistei até agora devo a senhora.

***“Seja você quem for, seja qual for a posição social que você tenha na vida, a mais alta ou a mais baixa, tenha sempre como meta muita força, muita determinação e sempre faça tudo com muito amor e com muita fé em Deus, que um dia você chega lá. De alguma maneira você chega lá.”***

***Ayrton Senna***

## RESUMO

O alopurinol é um fármaco inibidor da xantina oxidase, utilizado no tratamento da gota e de outras condições associadas com o aumento dos níveis séricos de ácido úrico. No Brasil, esta molécula é fabricada por cinco laboratórios em duas apresentações, comprimidos (genérico e referência) contendo 100 e 300 mg do fármaco. É relevante a garantia do controle de qualidade destes produtos, a partir do desenvolvimento de métodos analíticos sensíveis, utilizando a menor quantidade de solventes tóxicos, agredindo menos o meio ambiente. O objetivo deste estudo foi desenvolver métodos analíticos sustentáveis, utilizando a espectrofotometria no ultravioleta (UV) e a cromatografia líquida de alta eficiência com detector de arranjo fotodiodos (CLAE-DAD), realizar estudos de dissolução e de estabilidade para o controle de qualidade de alopurinol (produto acabado). Foi utilizada otimização univariada para o estabelecimento das condições espectrofotométricas e cromatográficas para a detecção do fármaco e, multivariado para a seleção do meio de dissolução, além do estudo de estabilidade do fármaco. Foram adquiridas 06 amostras de medicamentos: 03 apresentações de 100 mg [referência (Z1) e genéricos (M1 e S)] e 03 apresentações de 300 mg (referência (Z2) e genéricos (M2 e P)). As condições otimizadas para o método espectrofotométrico foram: meio de solubilização HCl 0,001 mol L<sup>-1</sup> e comprimento de onda 249 nm; e, para o cromatográfico: Coluna C8 (150 mm x 4,6 mm x 5 µm), fase móvel: etanol 50% + HCl 0,1 mol L<sup>-1</sup> 25% + água ultrapura 25%, fluxo: 0,6 mL min<sup>-1</sup>, detecção em 249 nm e tempo de análise de 5 minutos. Os métodos foram validados conforme parâmetros da União Internacional de Química Pura e Aplicada (IUPAC) e Resolução – RDC nº 166/2017, da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), exibindo para o método espectrofotométrico: exatidão entre 99,61 e 99,86%; precisão (desvio padrão relativo, DPR < 0,70%); limites de detecção (LOD) e quantificação (LOQ) de 0,08 e 0,24 µg mL<sup>-1</sup>, respectivamente e, robustez < 0,80%, em relação a precisão. Para o método cromatográfico, obteve-se: exatidão na faixa entre 99,76 e 99,80%; precisão (DPR < 0,50%); LOD e LOQ de 0,06 e 0,18 µg mL<sup>-1</sup>, respectivamente e, robustez < 1,90%, em relação a precisão. Para os ensaios (teste e perfis) de dissolução, as condições ótimas foram: meio de dissolução HCl 0,001 mol L<sup>-1</sup>, rotação de 75 rpm e aparato tipo 2 (pá). Os comprimidos contendo alopurinol se dissolveram antes de 15 minutos, exibindo perfis de dissolução semelhantes, após análise de variância (ANOVA) e teste de Tukey. O modelo cinético que representou o processo de dissolução dos medicamentos foi o de primeira ordem, exibindo os melhores coeficientes de correlação. Os medicamentos analisados apresentaram estabilidade frente a degradação ácida, básica e térmica; não exibindo a estabilidade para a degradação oxidativa, com degradação acima de 10% do teor de alopurinol no meio de peróxido de hidrogênio 3%, quando submetidos a aquecimento a 60 °C por 5 dias. Os métodos desenvolvidos foram satisfatórios para quantificar o fármaco alopurinol, em comprimidos, utilizando os princípios da química verde. Portanto, os métodos propostos podem ser utilizados pelas indústrias farmacêuticas e agências regulatórias para o controle de qualidade de comprimidos contendo alopurinol, uma vez que utilizam um menor quantitativo de solventes nocivos à saúde humana e meio ambiente, contribuindo para um ambiente mais sustentável e princípios da química verde.

**Palavras-chave:** alopurinol, desenvolvimento de métodos, validação analítica, planejamento fatorial, química verde, dissolução, estabilidade.

## ABSTRACT

Allopurinol is a xanthine oxidase inhibitor drug used to treat gout and other conditions associated with increased serum uric acid levels. In Brazil, it is manufactured by five laboratories in two presentations, tablets (generic and reference) containing 100 and 300 mg of the drug. It is important to guarantee the quality control of these products, based on the development of sensitive analytical methods, using the least amount of toxic solvents, harming the environment less. The objective of this study was to develop sustainable analytical methods using ultraviolet spectrophotometry (UV) and high-performance liquid chromatography with a photodiode array detector (HPLC-PDA), stability and dissolution studies for quality control of allopurinol (pharmaceutical forms). Univariate optimization was used to establish spectrophotometric and chromatographic conditions for detection of the drug, and multivariate design for selection of the dissolution medium, in addition to the study of drug stability. Six samples of drugs were purchased: 03 presentations of 100 mg [reference (Z1) and generics (M1 and S)] and 03 presentations of 300 mg (reference (Z2) and generics (M2 and P)). The optimized conditions for spectrophotometric method were: solubilization medium 0.001 mol L<sup>-1</sup> HCl and wavelength 249 nm; and, for chromatographic: Column C8 (150 mm x 4.6 mm x 5 µm), mobile phase: 50% ethanol + 0.1 mol L<sup>-1</sup> HCl + 25% ultrapure water, flow: 0.6 ml min<sup>-1</sup>, detection at 249 nm and run time of 5 minutes. The methods were validated according to parameters of the International Union of Pure and Applied Chemistry (IUPAC) and Resolution - RDC n° 166/2017, of the National Health Surveillance Agency (ANVISA), showing for the spectrophotometric method: accuracy between 99.61 and 99.86%; precision (relative standard deviation, RSD <0.70%); detection limits (DL) and quantification limits (QL) of 0.08 and 0.24 µg mL<sup>-1</sup>, respectively, and robustness <0.80%, in relation to precision. For the chromatographic method, the method showed: accuracy in the range between 99.76 and 99.80%; precision (RSD <0.50%); DL and QL of 0.06 and 0.18 µg mL<sup>-1</sup>, respectively, and robustness <1.90%, in relation to precision. For the dissolution assay (tests and profiles), the optimal conditions were: dissolution medium 0.001 mol L<sup>-1</sup> HCl, 75 rpm rotation and type 2 apparatus (paddle). The tablets containing allopurinol dissolved before 15 minutes, showing similar dissolution profiles, after analysis of variance (ANOVA) and Tukey's test. The kinetic model represented the drug dissolution process was the first order showing the best correlation coefficients. The analyzed drugs showed stability in acid, basic and thermal degradation; not showing stability for oxidative degradation, with degradation above 10% of the content of allopurinol in the H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 3% medium, when submitted to heating at 60 °C for 5 days. The methods developed were satisfactory to quantify the drug allopurinol, in tablets, using the principles of green chemistry. Therefore, the proposed methods can be used by the pharmaceutical industries and regulatory agencies for the quality control of tablets containing allopurinol, since they use a lower amount of solvents harmful to human health and the environment, contributing to a more sustainable environment and principles of green chemistry.

**Keywords:** allopurinol, method development, analytical validation, factorial design, green chemistry, dissolution, stability.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 01</b> – Estrutura Química do Alopurinol	26
<b>Figura 02</b> – Solubilidade ( $\text{mg mL}^{-1}$ ) do alopurinol em diferentes valores de pH	26
<b>Figura 03</b> – Distribuição das espécies de alopurinol em diferentes valores de pH	27
<b>Figura 04</b> – Esquema de funcionamento do espectrofotômetro de absorção na região do ultravioleta	38
<b>Figura 05</b> – Esquema do cromatógrafo líquido de alta eficiência	40
<b>Figura 06</b> – Espectro de varredura de absorção molecular UV Vis do alopurinol	74
<b>Figura 07</b> – Equação da reta da curva analítica do alopurinol empregando espectrofotometria de absorção molecular no ultravioleta	76
<b>Figura 08</b> – Curva de Ringbom para a determinação do intervalo linear do método espectrofotométrico para determinação de alopurinol	77
<b>Figura 09</b> – Avaliação dos resíduos gerados no processo de construção da curva analítica para a determinação de alopurinol por espectrofotometria de absorção molecular na região UV.	78
<b>Figura 10</b> – Determinação do meio de solubilização de alopurinol comprimidos e substância química de referência	79
<b>Figura 11</b> – Cromatograma da solução padrão de alopurinol ( $1,0 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) em meio HCl $0,1 \text{ mol L}^{-1}$	79

<b>Figura 12</b> – Comparação das fases móveis para determinação de alopurinol utilizando como solvente HCl 0,1 mol L <sup>-1</sup>	81
<b>Figura 13</b> – Seleção do fluxo da fase móvel da CLAE para a determinação de alopurinol (SQR e comprimidos) utilizando como solvente de HCl 0,1 mol L <sup>-1</sup>	81
<b>Figura 14</b> – Equação da reta da curva analítica alopurinol (SQR e SQR + excipientes) empregando cromatografia líquida de alta eficiência	83
<b>Figura 15</b> – Avaliação dos resíduos gerados no processo de construção da curva analítica para a determinação de alopurinol por cromatografia líquida de alta eficiência	84
<b>Figura 16</b> – Diagrama de Pareto do planejamento experimental para a determinação das condições de execução do teste de dissolução de medicamentos contendo alopurinol	85
<b>Figura 17</b> – Perfis de dissolução de alopurinol (comprimidos de 100 e 300 mg) empregando espectrofotometria de absorção molecular UV	87
<b>Figura 18</b> – Perfis de dissolução de alopurinol (comprimidos de 100 e 300 mg) empregando cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)	87
<b>Figura 19</b> – Análise dos resíduos de variância da comparação pareada do teste de Tukey aplicados ao perfil de dissolução de comprimidos de alopurinol utilizando o método espectrofotométrico	88
<b>Figura 20</b> – Análise dos resíduos de variância da comparação pareada do teste de Tukey aplicados ao perfil de dissolução de comprimidos de alopurinol utilizando o método cromatográfico	89

<b>Figura 21</b> – Porcentagem de alopurinol não dissolvido empregando espectrofotometria UV (aplicação do modelo de ordem zero)	91
<b>Figura 22</b> – Porcentagem de alopurinol não dissolvido empregando CLAE (aplicação do modelo de ordem zero)	91
<b>Figura 23</b> – Transformação logarítmica da porcentagem de alopurinol não dissolvido empregando método espectrofotométrico UV (aplicação do modelo de primeira ordem)	92
<b>Figura 24</b> – Transformação logarítmica da porcentagem de alopurinol não dissolvido empregando método CLAE (aplicação do modelo de primeira ordem)	92
<b>Figura 25</b> – Eficiência de dissolução de comprimidos contendo alopurinol empregando os dois métodos (UV e CLAE)	94
<b>Figura 26</b> – Pó da substância química de referência do alopurinol	96
<b>Figura 27</b> – Comprimidos de alopurinol	96

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 01</b> – Validação do método de determinação do alopurinol comprimidos empregando espectrofotometria de absorção molecular na região do UV	76
<b>Tabela 02</b> – Determinação do tempo e fator de retenção, número de pratos teóricos e resolução cromatográfica, para o método de determinação de alopurinol em meio de HCl 0,1 mol L <sup>-1</sup>	82
<b>Tabela 03</b> – Condições ótimas para o método de determinação de alopurinol (comprimidos) empregando cromatografia líquida de alta eficiência	82
<b>Tabela 04</b> – Validação do método de determinação do alopurinol (comprimidos) empregando cromatografia líquida de alta eficiência	83
<b>Tabela 05</b> – Teste de dissolução de comprimidos de alopurinol empregando os dois métodos, até 45 minutos	86
<b>Tabela 06</b> – Análise de variância (ANOVA) do perfil de dissolução de medicamentos contendo alopurinol empregando os métodos desenvolvidos	88
<b>Tabela 07</b> – Comparação pareada do teste de Tukey aplicados ao perfil de dissolução de comprimidos de alopurinol utilizando o método espectrofotométrico	88
<b>Tabela 08</b> – Comparação pareada do teste de Tukey aplicados ao perfil de dissolução de comprimidos de alopurinol utilizando o método cromatográfico	89
<b>Tabela 09</b> – Valores de f1 oriundos do perfil de dissolução comparativo de medicamentos contendo alopurinol empregando os métodos desenvolvidos (espectrofotometria de absorção molecular UV e CLAE)	90

<b>Tabela 10</b> – Parâmetros estatístico dos estudos de regressão, aplicando modelo ordem zero e primeira ordem, derivados dos perfis de dissoluções de medicamentos contendo alopurinol (espectrofotometria UV e CLAE)	93
<b>Tabela 11</b> – Valores médios dos parâmetros cinéticos (desvios-padrão) a partir do modelo de cinética de primeira ordem, derivados dos perfis de dissolução dos medicamentos contendo alopurinol	93
<b>Tabela 12</b> – Descrição dos comprimidos de alopurinol (referência e genéricos) adquiridos para o estudo	97
<b>Tabela 13</b> – Resultado do teste de determinação de peso em comprimidos contendo alopurinol (100 e 300 mg)	98
<b>Tabela 14</b> – Resultados do teste de friabilidade dos medicamentos contendo alopurinol	99
<b>Tabela 15</b> – Resultado do teste de desintegração em comprimidos de alopurinol	100
<b>Tabela 16</b> – Valores, média e critério de aceitação do teste de uniformidade de conteúdo (método de variação de peso) de comprimidos de alopurinol, empregando a espectrofotometria de absorção molecular na região do UV	101
<b>Tabela 17</b> – Valores, média e critério de aceitação do teste de uniformidade de conteúdo (método de variação de peso) de comprimidos de alopurinol, empregando a CLAE	101
<b>Tabela 18</b> – Doseamento de alopurinol (comprimidos) empregando os métodos desenvolvidos	102
<b>Tabela 19</b> – Teores de alopurinol (comprimidos e SQR) e degradação total encontrados no teste de degradação por hidrólise ácida (HCl 0,1 mol L <sup>-1</sup> , a 60 °C, por 5 dias)	103

**Tabela 20** – Teores de alopurinol (comprimidos e SQR) e degradação encontrados no teste de degradação por hidrólise básica (NaOH 0,1 mol L<sup>-1</sup>, a 60 °C, por 5 dias) 104

**Tabela 21** – Teores de alopurinol (comprimidos) e degradação encontrados no teste de degradação oxidativa (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 3%, a 60 °C, por 5 dias) 105

**Tabela 22** – Teores de alopurinol (comprimidos e SQR) e degradação encontrados no teste de degradação térmica a 80 °C, por 5 dias) 106

## LISTA DE QUADROS

<b>Quadro 01</b> – Parâmetros a serem considerados na validação analítica, conforme a Resolução-RDC nº 166, de 24 de julho de 2017, da ANVISA	31
<b>Quadro 02</b> – Condições para a avaliação da robustez do método espectrofotométrico, conforme a Resolução-RDC nº 166, de 24 de julho de 2017, da ANVISA	35
<b>Quadro 03</b> – Farmacopeias estrangeiras admitidas como compêndios oficiais pela ANVISA	36
<b>Quadro 04</b> – Métodos para a determinação de alopurinol em comprimidos que empregam espectrofotometria de absorção molecular encontrados na literatura científica	39
<b>Quadro 05</b> – Métodos para determinação de alopurinol que empregam cromatografia líquida de alta eficiência encontrados na literatura científica	45
<b>Quadro 06</b> – Esquema do planejamento fatorial completo $2^3$ com 6 repetições do ponto central	52
<b>Quadro 07</b> – Métodos empregados para os ensaios de identificação, pureza, dissolução e doseamento de alopurinol encontrados nas Farmacopeias Brasileira (2019) e Americana (USP, 2019)	54
<b>Quadro 08</b> – Determinação de substâncias relacionadas no alopurinol, segundo a Farmacopeia Brasileira e Americana	56
<b>Quadro 09</b> – Critérios de avaliação da determinação de peso para formas farmacêuticas sólidas em dose unitária	57
<b>Quadro 10</b> – Aplicação do método de Uniformidade de conteúdo (UC) ou de Variação de peso (VP) em comprimidos de acordo com a dose e proporção do fármaco	59

<b>Quadro 11</b> – Métodos analíticos para a determinação dos compostos de degradação do alopurinol descritos na literatura	61
<b>Quadro 12</b> – Relação de medicamentos adquiridos para a realização de todos ensaios	63
<b>Quadro 13</b> – Estudo de composição da fase móvel para determinação de alopurinol em comprimidos	67
<b>Quadro 14</b> – Variáveis e níveis utilizados no planejamento experimental	68
<b>Quadro 15</b> – Planejamento fatorial completo $2^3$ com 6 repetições do ponto central	68

## LISTA DE EQUAÇÕES

<b>Equação 01</b> – Lei de Lambert-Beer	38
<b>Equação 02</b> – Determinação do fator de diferença (f1)	49
<b>Equação 03</b> – Determinação do fator de similaridade (f2)	50
<b>Equação 04</b> – Cálculo do limite de detecção, preconizado pela ANVISA	64
<b>Equação 05</b> – Cálculo do limite de detecção, preconizado pela IUPAC	64
<b>Equação 06</b> – Cálculo do limite de quantificação, preconizado pela ANVISA	64
<b>Equação 07</b> – Cálculo do limite de quantificação, preconizado pela IUPAC	65
<b>Equação 08</b> – Determinação da precisão	65
<b>Equação 09</b> – Determinação da exatidão	65
<b>Equação 10</b> – Determinação do fator de retenção (k)	66
<b>Equação 11</b> – Determinação do número de pratos teóricos (N)	66
<b>Equação 12</b> – Determinação da resolução cromatográfica (R)	66
<b>Equação 13</b> – Determinação da meia-vida de dissolução ( $t_{50\%}$ )	69
<b>Equação 14</b> – Determinação da Eficiência de dissolução (%ED)	69
<b>Equação 15</b> – Determinação das quantidades individuais estimadas de insumo farmacêutico ativo, conforme teste de uniformidade de doses unitárias (método variação de peso)	71
<b>Equação 16</b> – Determinação do valor de aceitação (VA) para o método de uniformidade de dose unitárias em comprimidos de alopurinol, método de variação de peso	71

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>20</b>
<b>2. OBJETIVOS.....</b>	<b>23</b>
2.1 GERAL.....	23
2.2 ESPECÍFICOS.....	23
<b>3. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....</b>	<b>24</b>
3.1 GOTA.....	24
3.2 ALOPURINOL.....	25
3.3 DESENVOLVIMENTO DE MÉTODOS PARA QUANTIFICAÇÃO DO ALOPURINOL EM COMPRIMIDOS.....	30
3.3.1 SELETIVIDADE.....	32
3.3.2 LINEARIDADE.....	32
3.3.3 LIMITE DE DETECÇÃO.....	33
3.3.4 LIMITE DE QUANTIFICAÇÃO.....	33
3.3.5 PRECISÃO.....	34
3.3.6 EXATIDÃO.....	34
3.3.7 FAIXA DE TRABALHO.....	35
3.3.8 ROBUSTEZ.....	35
3.4 ESPECTROFOTOMETRIA DE ABSORÇÃO MOLECULAR NA REGIÃO ULTRAVIOLETA NA DETERMINAÇÃO DE FÁRMACOS.....	37
3.5 CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA NA DETERMINAÇÃO DE FÁRMACOS.....	39
3.6 ENSAIOS DE DISSOLUÇÃO DE MEDICAMENTOS.....	46
3.6.1 TESTE DE DISSOLUÇÃO.....	46
3.6.2 PERFIL DE DISSOLUÇÃO.....	47
3.7 PLANEJAMENTO FATORIAL.....	51
3.8 ENSAIOS DE CONTROLE DE QUALIDADE DO ALOPURINOL (COMPRIMIDOS).....	53
3.8.1 CARACTERÍSTICAS ORGANOLÉPTICAS DO ALOPURINOL (COMPRIMIDOS).....	54
3.8.2 ENSAIO DE IDENTIFICAÇÃO DE ALOPURINOL (COMPRIMIDOS).....	55

3.8.3	ENSAIOS DE PUREZA.....	55
3.8.4	DETERMINAÇÃO DE PESO MÉDIO EM COMPRIMIDOS DE ALOPURINOL.....	56
3.8.5	DETERMINAÇÃO DE DUREZA EM COMPRIMIDOS DE ALOPURINOL.....	57
3.8.6	DETERMINAÇÃO DE FRIABILIDADE EM COMPRIMIDOS DE ALOPURINOL.....	57
3.8.7	DETERMINAÇÃO DO TEMPO DE DESINTEGRAÇÃO EM COMPRIMIDOS DE ALOPURINOL.....	58
3.8.8	UNIFORMIDADE DE DOSES UNITÁRIAS EM COMPRIMIDOS DE ALOPURINOL.....	58
3.8.9	DOSEAMENTO DE ALOPURINOL (COMPRIMIDOS).....	59
3.9	ESTUDO DE DEGRADAÇÃO EM MEDICAMENTOS.....	59
<b>4.</b>	<b>MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>	<b>62</b>
4.1	SUBSTÂNCIA QUÍMICA DE REFERÊNCIA.....	62
4.2	FORMA FARMACÊUTICA COMPRIMIDOS.....	62
4.3	DESENVOLVIMENTO DE MÉTODO, EMPREGANDO ESPECTROFOTOMETRIA DE ABSORÇÃO MOLECULAR, NA REGIÃO DO ULTRAVIOLETA, PARA QUANTIFICAÇÃO DE ALOPURINOL EM COMPRIMIDOS.....	62
4.3.1	LINEARIDADE.....	62
4.3.2	LIMITE DE DETECÇÃO.....	64
4.3.3	LIMITE DE QUANTIFICAÇÃO.....	64
4.3.4	PRECISÃO.....	65
4.3.5	EXATIDÃO.....	65
4.3.6	FAIXA DE TRABALHO.....	65
4.3.7	ROBUSTEZ.....	65
4.4	DESENVOLVIMENTO DE MÉTODO, EMPREGANDO CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA, PARA QUANTIFICAÇÃO DE ALOPURINOL EM COMPRIMIDOS E SUBSTÂNCIA QUÍMICA DE REFERÊNCIA.....	66
4.4.1	ROBUSTEZ.....	67
4.5	ENSAIOS DE DISSOLUÇÃO DE COMPRIMIDOS DE ALOPURINOL 100 MG E 300 MG.....	67

4.6 ENSAIOS DE CONTROLE DE QUALIDADE DO ALOPURINOL (COMPRIMIDOS).....	69
4.6.1 CARACTERÍSTICAS ORGANOLÉPTICAS.....	69
4.6.2 DETERMINAÇÃO DE PESO EM COMPRIMIDOS.....	70
4.6.3 DETERMINAÇÃO DE FRIABILIDADE EM COMPRIMIDOS.....	70
4.6.4 DETERMINAÇÃO DO TEMPO DE DESINTEGRAÇÃO EM COMPRIMIDOS.....	70
4.6.5 UNIFORMIDADE DE DOSES UNITÁRIAS EM COMPRIMIDOS DE ALOPURINOL.....	71
4.6.6 DOSEAMENTO DE ALOPURINOL (COMPRIMIDOS).....	71
4.7 ESTUDOS DE DEGRADAÇÃO DE MEDICAMENTOS.....	72
4.7.1 HIDRÓLISE ÁCIDA.....	72
4.7.2 HIDRÓLISE BÁSICA.....	72
4.7.3 DEGRADAÇÃO POR OXIDAÇÃO.....	72
4.7.4 DEGRADAÇÃO TÉRMICA.....	73
<b>5. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>74</b>
5.1 DESENVOLVIMENTO DE MÉTODO, EMPREGANDO ESPECTROFOTOMETRIA DE ABSORÇÃO MOLECULAR, NA REGIÃO DO ULTRAVIOLETA, PARA QUANTIFICAÇÃO DE ALOPURINOL EM COMPRIMIDOS.....	74
5.2 DESENVOLVIMENTO DE MÉTODO, EMPREGANDO CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA, PARA QUANTIFICAÇÃO DE ALOPURINOL EM COMPRIMIDOS.....	78
5.3 ENSAIOS DE DISSOLUÇÃO DE COMPRIMIDOS DE ALOPURINOL 100 MG E 300 MG.....	84
5.3.1 TESTE DE DISSOLUÇÃO.....	85
5.3.2 PERFIL DE DISSOLUÇÃO.....	86
5.4 OUTROS ENSAIOS DE CONTROLE DE QUALIDADE DO ALOPURINOL (COMPRIMIDOS).....	96
5.4.1 CARACTERÍSTICAS ORGANOLÉPTICAS.....	96
5.4.2 DETERMINAÇÃO DE PESO (PESO MÉDIO) EM COMPRIMIDOS DE ALOPURINOL.....	98

5.4.3 DETERMINAÇÃO DE FRIABILIDADE EM COMPRIMIDOS DE ALOPURINOL.....	99
5.4.4 DETERMINAÇÃO DO TEMPO DE DESINTEGRAÇÃO EM COMPRIMIDOS DE ALOPURINOL.....	99
5.4.5 UNIFORMIDADE DE DOSES UNITÁRIAS EM COMPRIMIDOS DE ALOPURINOL.....	100
5.4.6 DOSEAMENTO DE ALOPURINOL (COMPRIMIDOS).....	102
5.5 ESTUDOS DE DEGRADAÇÃO.....	103
5.5.1 HIDRÓLISE ÁCIDA.....	103
5.5.2 HIDRÓLISE BÁSICA.....	104
5.5.3 DEGRADAÇÃO POR OXIDAÇÃO.....	105
5.5.4 DEGRADAÇÃO TÉRMICA.....	105
<b>6. CONCLUSÕES.....</b>	<b>107</b>

## **REFERÊNCIAS**

## 1 INTRODUÇÃO

A gota, considerada a artrite inflamatória, mais comum em homens acima dos 40 anos, é uma doença caracterizada pela deposição, nas articulações, ossos e pele, de cristais de urato de monossódico, oriundos do processo metabólico das purinas, bases nitrogenadas presentes nas estruturas dos: ácido desoxirribonucleico (DNA) e ácido ribonucleico (RNA) (ROCHA; LANDIM; ROCHA, 2018). O processo metabólico destas bases nitrogenadas gera a xantina, que sofre a ação da enzima xantina oxidase, presente nos peroxissomos celulares, oxidando-a e transformando em ácido úrico (ZHANG et al., 2018). O nível de ácido úrico circulante no sangue é em torno de  $6,0 \text{ mg dL}^{-1}$ . O excesso desse ácido formado é eliminado na urina, após depuração renal. Acima desta concentração no nível sanguíneo, considera-se o indivíduo com hiperuricemia (AZEVEDO et al., 2017). Neste ponto, o ácido úrico formado pode participar de reações oxidantes e pró-inflamatórias, prejudiciais ao organismo.

Em concentrações acima de  $6,8 \text{ mg dL}^{-1}$  de ácido úrico (limite de solubilidade do urato), os cristais de urato monossódico são formados e depositados nos tecidos. Estudos apontaram que existe uma relação direta entre o aumento dos níveis de ácido úrico e o desenvolvimento e/ou progressão de doenças cardiovasculares, além de correlação direta com a hipertensão arterial sistêmica e doenças renais, com destaque para a formação de cristais nos rins (pedras nos rins) (AZEVEDO et al., 2017; DRUGBANK, 2019). O sinal clínico da doença da gota é a artrite inflamatória aguda em uma articulação. Estudos apontaram que 50% dos casos ocorrem na articulação metatarso-falangeana, porém são encontrados casos descritos na literatura em articulações de joelho e tornozelo, sendo comum em pacientes com histórico de não tratamento e/ou interrupção por um período longo desta patologia. Esta inflamação é intensa e recorrente, mas é considerada autolimitante (GOICOECHEA et al., 2015; SATTUI; GAFFO, 2016).

O tratamento da gota pode ser dividido em duas etapas, para os casos agudos, o tratamento é iminentemente sintomático, com a intenção de reduzir as dores ocasionadas pela inflamação e restabelecer a função articular, por meio da administração de medicamentos anti-inflamatórios não esteroidais (AINES), anti-inflamatórios esteroidais (AIES) e colchicina, isoladamente ou em associação. Já para os casos crônicos, cujo objetivo é a diminuição dos níveis séricos de ácido úrico são administrados os medicamentos como o alopurinol, febuxostat e outros agentes uricosúricos, associados à

restrição da ingestão de alimentos ricos em purina (SIRCAR *et al.*, 2015; SATTUI; GAFFO, 2016; AZEVEDO *et al.*, 2017).

O alopurinol é um fármaco aprovado pela *Food and Drug Administration* (FDA), em 1966, produzido pela Glaxo Wellcome INC, como Zyloric®. É um inibidor da enzima xantina oxidase, considerado um dos medicamentos mais eficazes para diminuir os níveis de urato, é frequentemente usado no tratamento da gota crônica (CHEMICALIZE, 2019; DRUGBANK, 2019). No Brasil, existem 05 indústrias farmacêuticas com registros ativos para a comercialização de alopurinol nas apresentações: 100 mg e 300 mg, na forma farmacêutica sólida (comprimidos). Para os comprimidos de 100 mg estão disponíveis no mercado 09 apresentações, sendo 01 de referência e 08 de medicamentos genéricos. Já para comprimidos de 300 mg estão disponíveis 08 apresentações, sendo 01 de referência e 07 de genéricos (BRASIL, 2019a).

Com vistas a garantia da qualidade dos produtos comercializados no país, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) determinou que todos os laboratórios produtores de medicamentos cumpram a Resolução RDC Nº 301, de 06 de novembro de 2019, que dispõe sobre as Boas Práticas de Fabricação de Medicamentos e estabelece os requisitos mínimos a serem seguidos na fabricação de medicamentos. Dentro destes requisitos tem-se, a obrigação da indústria em efetuar testes que assegurem o cumprimento dos requisitos estabelecidos em seu registro e não coloque em risco os usuários dos medicamentos por apresentarem segurança, qualidade ou eficácia inadequada. A indústria produtora do medicamento pode utilizar testes oriundos dos compêndios oficiais definidos pela ANVISA ou desenvolver e validar seus próprios métodos, submetendo-os à apreciação deste órgão regulador (BRASIL, 2019b).

Até 2018, não havia métodos farmacopeicos para o alopurinol no país. Este fármaco, atualmente, possui monografia na 6ª edição da Farmacopeia Brasileira (2019), apenas para o produto acabado (comprimido), empregando, para o doseamento, a espectrofotometria de absorção no ultravioleta, utilizando como solvente o ácido clorídrico 0,1 mol L<sup>-1</sup> (BRASIL, 2019c). O desenvolvimento de novos métodos que sejam capazes de diminuir o quantitativo de solventes utilizados e/ou a concentração dos mesmos é de extrema importância, pois estes são capazes de contribuir com os princípios da química verde. Ademais, utilizando fontes renováveis ou recicladas de matéria-prima; aumentando a eficiência energética, visando a utilização de menor quantidade de reagentes e evitando o uso de substâncias persistentes, bioacumulativas e tóxicas (MARCO *et al.*, 2019).

Além destes ensaios, a ANVISA, por meio da Resolução-RDC Nº 318, de 06 de novembro de 2019, estabeleceu os critérios para a realização de estudos de estabilidade de insumos farmacêuticos ativos e medicamentos, exceto biológicos, com o objetivo de avaliar os impactos de exposições dos produtos a agentes químicos e físicos fora das condições estabelecidas no rótulo. Ainda, já havia publicado a Resolução-RDC Nº 53, de 04 de dezembro de 2015, que estabeleceu a obrigatoriedade da elaboração do perfil de degradação dos medicamentos, determinando a identificação e qualificação dos produtos de degradação formados ao longo do prazo de validade, estabelecendo como prazo final 31 de dezembro de 2019 (alteração implantada pela Resolução-RDC Nº 171, de 22 de agosto de 2017) para que todos os fabricantes de alopurinol desenvolvam seus estudos (BRASIL, 2015; 2017; 2019d). Visando o cumprimento das determinações, as indústrias e centros de pesquisas, inclusive as Universidades, estão em constante busca pelo desenvolvimento de métodos sensíveis e que visem reduzir ou eliminar o uso ou a geração de substâncias nocivas à saúde humana e ao ambiente, ou seja, utilizando o conceito da química verde, sempre que possível.

O consumo do alopurinol é elevado no país, haja vista que o mesmo pertence ao elenco de medicamentos do Componente Básico da Assistência Farmacêutica, para o tratamento da hiperuricemia em esquema de monodroga (BRASIL, 2020). Este estudo parte da necessidade de aferir a qualidade de matérias primas e medicamentos comercializados, por meio do desenvolvimento de metodologias que sejam capazes de quantificar o alopurinol em formas farmacêuticas sólidas orais (comprimidos), utilizando a menor quantidade de solventes nocivos ao meio ambiente e a saúde humana. Desta forma, a hipótese deste trabalho foi: é possível desenvolver métodos analíticos para o controle de qualidade de alopurinol (insumo farmacêutico ativo e medicamentos) utilizando os princípios da química verde? Ainda, buscou-se otimizar a metodologia, por meio de planejamento fatorial com dois níveis, para o teste de dissolução de comprimidos contendo este fármaco, bem como realizar ensaios de degradação nestes medicamentos.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 Geral

Desenvolver métodos analíticos sustentáveis, ensaios de dissolução e estabilidade para o controle de qualidade de alopurinol (produto acabado).

### 2.2 Específicos

- Desenvolver método de quantificação de alopurinol (comprimidos), empregando a Espectrofotometria de Absorção no Ultravioleta (UV), utilizando a otimização univariada;
- Desenvolver método de quantificação de alopurinol (comprimidos) utilizando Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com Detector *Diode Array* (DAD), com o auxílio da otimização univariada;
- Avaliar a cinética de dissolução de formas farmacêuticas sólidas orais contendo alopurinol, amostras comerciais, por meio de planejamento fatorial com dois níveis;
- Realizar o estudo de degradação em substância química de referência e comprimidos de alopurinol, conforme parâmetros da Resolução RDC Nº 53, de 4 de dezembro de 2015 da ANVISA.

### 3 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

#### 3.1 Gota

A gota é uma artrite inflamatória aguda, causada pela deposição de cristais de urato monossódico nas articulações, mais comum em pacientes adultos acima de 40 anos e do sexo masculino (ROCHA; LANDIM; ROCHA, 2018). Estudos apontaram que 50% dos casos ocorrem na articulação metatarso-falangeana, porém, são encontrados casos descritos na literatura em articulações de joelho e tornozelo, sendo comum em pacientes com histórico de não tratamento e/ou interrupção por um período longo desta patologia. Esta inflamação é intensa e recorrente, mas é considerada autolimitante (SATTUI; GAFFO, 2016; GOICOECHEA *et al.*, 2015)

Estudo realizado pela *National Health Interview Survey* (NHIS) informou que a prevalência global da gota autodeclarada passou de 4,8/1.000 habitantes em 1967, para 9,4/1.000 habitantes em 1999. Já o estudo da *John Hopkins* realizado em 1991, estimou a prevalência da gota nos Estados Unidos da América (EUA), em 1,73/1.000 habitantes. No Brasil, não existem dados estabelecidos de prevalência da gota (AZEVEDO *et al.*, 2017).

As manifestações desta patologia podem ser classificadas em três: crises agudas, desencadeadas pela ingestão excessiva de álcool, estresse metabólico e quedas bruscas dos níveis de ácido úrico, como no início do tratamento para redução dos níveis deste ácido, o que ocasiona a reabsorção de cristais de urato monossódico no túbulo renal; o período intercrises, onde o quadro clínico é assintomático e pode durar anos, porém, com o avanço da doença, tende a diminuir o intervalo entre as crises; e, por fim, as crises crônicas, também conhecidas como artropatia crônica, estágio avançado da doença em que ocorrem múltiplas crises e que com elava duração, sendo classificadas como crises persistentes (BARDIN; RICHETTE, 2014; GOICOECHEA *et al.*, 2015; AZEVEDO *et al.* 2017).

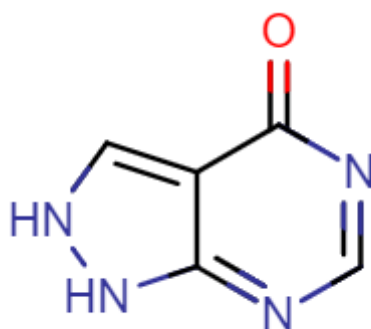
Os fatores de risco para o desenvolvimento da gota são a ingestão de álcool e o índice de massa corporal (IMC). Pacientes com IMC entre 25,0 a 29,9 kg m<sup>-2</sup> (sobrepeso) possuem um risco relativo de incidência da gota de 1,95 e pacientes com IMC acima de 35 kg m<sup>-2</sup> (obeso) possuem risco relativo de incidência desta doença de 2,97 (MARQUITO *et al.*, 2014; SATTUI; GAFFO, 2016). Além destes, são considerados fatores de risco o consumo de alimentos ricos em purina, como as carnes vermelhas e os mariscos e refrigerantes adoçados com frutose. Já o consumo de alimentos como o café, produtos derivados de leite e vitamina C tem sido associado à proteção contra o desenvolvimento da patologia (STACK *et al.* 2013; AZEVEDO *et al.*, 2017).

O diagnóstico da gota é realizado pela observação dos cristais de urato monossódico, presentes na amostra líquido sinovial de articulações afetadas empregando a microscopia de luz polarizada e, neste caso, os cristais exibem birrefringência negativa (SIVERA; ANDRÉS; QUILIS, 2016). Na impossibilidade da coleta e realização do exame do líquido sinovial, o exame físico, associado a concentração sanguínea de ácido úrico e estudos de imagem como raio X, ultrassonografia ou tomografia computadorizada de dupla emissão podem ser utilizados (AZEVEDO *et al.*, 2017; DRUGBANK, 2019; SIRCAR *et al.*, 2015).

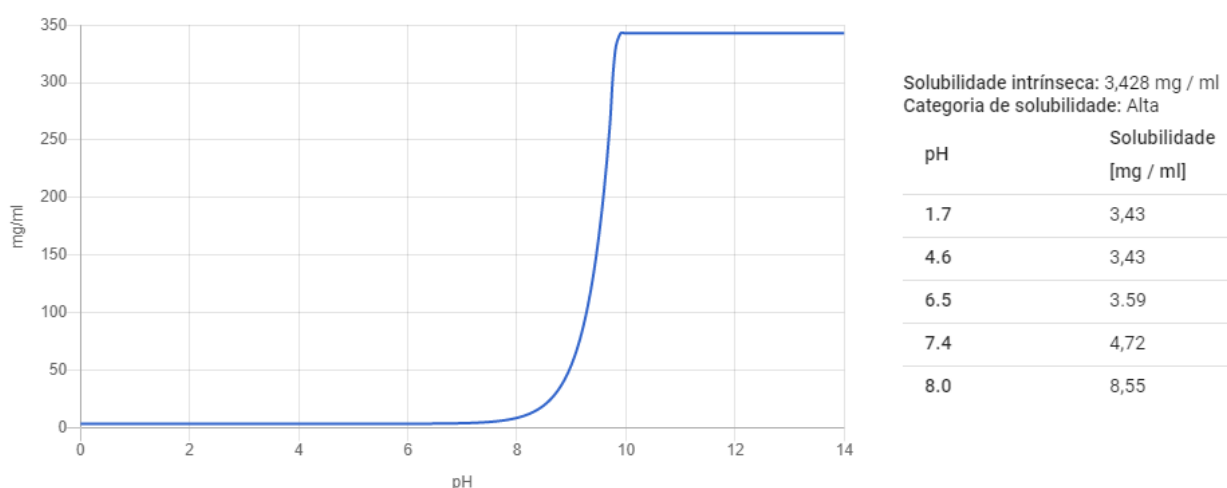
O tratamento da gota pode ser dividido em duas etapas. Nos casos agudos, o objetivo do tratamento é a diminuição da inflamação e, conseqüentemente, o alívio das dores e restabelecimento da capacidade articular e, para tanto, se faz necessária a utilização dos AINES, AIES e colchicina, podendo ser isoladamente ou em associação (SIVERA; ANDRÉS; QUILIS, 2016). Nos casos crônicos, o objetivo do tratamento é a diminuição dos níveis séricos de ácido úrico e prevenção de novos episódios de crises álgicas. Nestes casos, se faz necessária a administração de medicamentos como o alopurinol, febuxostat e outros agentes uricosúricos, além da diminuição da ingestão de alimentos ricos em purina (SIRCAR *et al.*, 2015; SATTUI; GAFFO, 2016; AZEVEDO *et al.*, 2017).

### 3.2 Alopurinol

O alopurinol, fórmula molecular  $C_5H_4N_4O$  e estrutural (Figura 01), Denominação Comum Internacional (DCI): *allopurinol*, possui como nomenclatura química pela *International Union of Pure and Applied Chemistry* (IUPAC): 1H, 2H, 4H-pirazolo [3,4-d] pirimidin-4-ona e, é um pó microcristalino branco, sem sabor e inodoro, com massa molar de  $136,11 \text{ g mol}^{-1}$  (DRUGBANK, 2019; PUBCHEM, 2019). É solúvel em água ( $0,48 \text{ mg mL}^{-1}$ , a  $25 \text{ }^\circ\text{C}$  e  $0,80 \text{ mg mL}^{-1}$ , a  $37 \text{ }^\circ\text{C}$ ), etanol ( $0,30 \text{ mg mL}^{-1}$ , a  $25 \text{ }^\circ\text{C}$ ) e clorofórmio ( $0,60 \text{ mg mL}^{-1}$ , a  $25 \text{ }^\circ\text{C}$ ) (DRUGBANK, 2019), apresentando um incremento na solubilização com o aumento de pH do solvente, exibindo valores acima de  $300 \text{ mg mL}^{-1}$  em pH básico (Figura 02). Possui ponto de fusão de  $350 \text{ }^\circ\text{C}$  e, é estável à fotólise e hidrólise neutra (CHEMICALIZE, 2019; PUBCHEM, 2019).

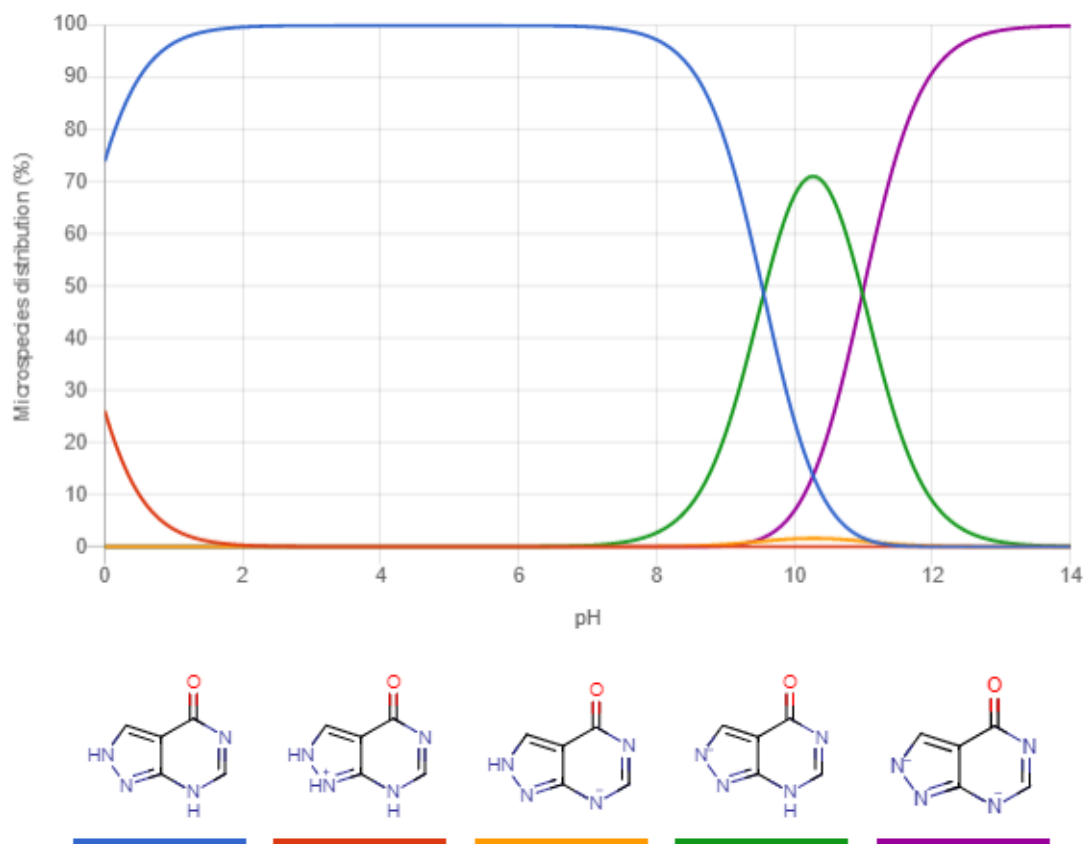
**Figura 01-** Estrutura Química do Alopurinol

Fonte: Software CHEMICALIZE, 2019.

**Figura 02-** Solubilidade (mg mL<sup>-1</sup>) do alopurinol em diferentes valores de pH

Fonte: Software CHEMICALIZE, 2019.

A molécula alopurinol possui 05 microespécies que se distribuem ao longo da faixa de pH, sendo possível a detecção e quantificação da espécie não ionizada na faixa de pH 2,0 a 8,0 (Figura 03). No tocante a classificação biofarmacêutica existem divergências quanto a sua classe. O estudo realizado por Alghadi e Hamedelniei (2017), classifica o alopurinol como de classe I (alta solubilidade e alta permeabilidade), enquanto o software da *Drug Delivery Foundation* (DDFINT) classifica-o como de classe IV (baixa solubilidade e baixa permeabilidade) (DDFINT, 2019).

**Figura 03** – Distribuição das espécies de alopurinol em diferentes valores de pH

Fonte: Software Chemicalize (2019)

O alopurinol é um fármaco antigotoso, cuja classificação na *Anatomical Therapeutic Chemical (ATC)* é M04AA01 (PUBCHEM, 2019), e junto com o seu principal metabólito, o oxipurinol, diminuem os níveis de ácido úrico no plasma e na urina, por meio da inibição da xantina oxidase, que tem por função a catálise das reações de oxidação da hipoxantina em xantina e, desta, em ácido úrico (SANTOS *et al.*, 2018). Este fármaco aumenta a reutilização de hipoxantina e xantina para a síntese de nucleotídeos e ácidos nucleicos por um processo que envolve a enzima hipoxantina-guanina fosforibosiltransferase (BARTOLI *et al.*, 2017). Esse processo resulta em uma concentração aumentada de nucleotídeos, que causa a inibição da realimentação da síntese de purina novamente, resultando na redução da concentração sérica de ácido úrico, diminuindo a incidência dos sintomas da gota (BRASIL, 2019e; DRUGBANK, 2019).

O alopurinol é indicado para redução da formação e depósito de cristais de urato monossódico, que ocorre em indivíduos que desenvolveram ou possuem risco potencial de desenvolvimento de artrite gotosa, tofos cutâneos e nefrolitíase (SIVERA; ANDRÉS;

QUILIS, 2016). Desta forma, o alopurinol é utilizado no tratamento da gota idiopática, litíase por ácido úrico e nefropatia aguda induzida por ácido úrico. Este ativo também, é utilizado em doenças neoplásicas ou mieloproliferativas que, após o seu tratamento com agentes citotóxicos, aumentam os níveis sanguíneos de uratos, ocasionados por disfunções enzimáticas que levam a superprodução de uratos, a exemplo da hipoxantina-guanina fosforibosiltransferase, glicose-6-fosfatase, fosforibosilpirofosfato sintetase, fosforibosilpirofosfato amidotransferase e adenina fosforibosil transferase (SIRCAR *et al.*, 2015; BARTOLI *et al.*, 2017) e, ainda, indicado para o controle dos cálculos renais formados por 2,8-diidroxiadenina (2,8-DHA) e, como segunda linha de tratamento para o controle de cálculos renais mistos de oxalato de cálcio recorrentes com sinal clínico de hiperuricosúria (SIVERA; ANDRÉS; QUILIS, 2016; SATTUI; GAFFO, 2016). A molécula em estudo possui excelente tolerabilidade e seu uso é considerado seguro em idosos e nefropatas (DRUGBANK, 2019).

Quando administrado por via oral, o alopurinol é rapidamente absorvido no trato gastrointestinal superior e concentrações do fármaco já podem ser detectadas na corrente sanguínea entre 30 a 60 minutos após a sua administração. Estudos apontaram uma variação na biodisponibilidade de 67% a 90%. O pico plasmático de alopurinol ocorre 1,5 hora após a sua administração e a molécula é quase indetectável após 6 horas (BRASIL, 2019e).

A metabolização do alopurinol ocorre em nível hepático, em que este é transformado em oxipurinol, metabólito ativo que atinge o pico plasmático de 3 a 5 horas após a administração do alopurinol. Além deste metabólito, são descritos na literatura, o alopurinol-ribosídeo e o oxipurinol-7-ribosídeo, cuja atividade metabólica ainda não foi relatada (THOMSEN *et al.*, 2019; BARTOLI *et al.*, 2017).

O alopurinol e o oxipurinol se ligam muito pouco às proteínas plasmáticas, tendo o alopurinol um volume de distribuição aparente de  $1,6 \text{ L kg}^{-1}$ . Insta salientar que o alopurinol estará presente em maior concentração no fígado e na mucosa intestinal, local onde ocorre a maior atividade da xantina oxidase (SIVERA; ANDRÉS; QUILIS, 2016; BRASIL, 2019e). A eliminação do fármaco é renal, tendo 80% da dose administrada eliminada na urina na forma de alopurinol (10% droga livre inalterada) e de seus metabólitos (90%). A eliminação nas fezes corresponde aos 20% restantes do fármaco administrado. O tempo de meia-vida plasmática do alopurinol é de 0,5 a 2,0 horas. Já o oxipurinol possui a meia-vida plasmática de 13 a 30 horas, o que justifica a administração de alopurinol uma vez ao dia. O tempo

máximo para o início da ação farmacológica deste medicamento é de 1 a 2 semanas (BRASIL, 2019e; DRUGBANK, 2019).

Cerca de 33.253 eventos adversos foram relatados para este fármaco, de 1968 a 2019 e, destes 58% ocorreram em homens. Dos casos relatados, 30% pertencem ao grupo etário de 45 a 64 anos, seguido pelos grupos de mais de 75 anos (26%) e entre 65 a 74 anos (23%) (VIGIACCESS, 2019). Afecções dos tecidos cutâneos e subcutâneos foram os mais relatados (65% dos casos) sendo rash, prurido, síndrome de Stevens-Johnson, rash maculo-papular e reação medicamentosa com eosinofilia e sintomas sistêmicos, os mais relatados, em ordem decrescente (BARDIN *et al.*, 2016). Este fármaco tem contraindicação para pacientes com alergia ao alopurinol, pacientes grávidas e em período de amamentação e crianças menores de 10 anos. Por ser capaz de induzir sonolência, vertigem e ataxia, os pacientes devem ser advertidos sobre o uso do medicamento e a interferência na capacidade de dirigir e operar máquinas (BRASIL, 2019e).

O alopurinol interage farmacologicamente com 6-mercaptopurina, azatioprina, salicilatos, agentes uricosúricos, clorpropamida, anticoagulantes cumarínicos, fenitoína, teofilina, ampicilina, amoxicilina, ciclofosfamida, doxorrubicina, bleomicina, procarbazona, mecloroetamina, ciclosporina, didanosina, diuréticos e inibidores da enzima conversora de angiotensina (BRASIL, 2019e). Ainda, destaca-se a interação alimentar com o álcool, pois o uso concomitante pode diminuir o efeito do alopurinol; com suplementos contendo ferro, o que pode causar um aumento da captação do ferro pelo fígado e, ainda, com a utilização de doses elevadas de vitamina C, que podem acidificar a urina e aumentar o risco de formação de cálculos renais (BARDIN *et al.*, 2016; DRUGBANK, 2019; VIGIACCESS, 2019).

As apresentações disponíveis no mercado são comprimidos nas doses de 100 mg e 300 mg. Atualmente, 05 laboratórios farmacêuticos (Aspen Pharma Indústria Farmacêutica Ltda, Novartis Biociências S.A, Prati Donaduzzi & Cia Ltda, Sandoz do Brasil Indústria Farmacêutica Ltda e Sanofi Medley Farmacêutica Ltda) comercializam alopurinol no país, em ambas as concentrações, totalizando 17 apresentações comercializadas, sendo 02 do medicamento de referência Zyloric® e 15 apresentações de medicamentos genéricos; não existindo, neste momento, apresentações de medicamentos similares (BRASIL, 2019a).

### 3.3 Desenvolvimento de métodos para quantificação do alopurinol em comprimidos

A necessidade de avaliar a qualidade dos medicamentos ofertados à população fez com que as indústrias farmacêuticas, os órgãos reguladores de saúde nacionais e as universidades se debruçassem sobre o desenvolvimento de métodos capazes de identificar e quantificar os fármacos presentes nas mais diversas formas farmacêuticas e nos seus insumos farmacêuticos ativos (POLLITIS *et al.*, 2017). É importante salientar que esses métodos precisam ser capazes de gerar resultados que sejam confiáveis, e para esta garantia é necessário que ele seja validado (KOLLA *et al.*, 2019; BONFILIO *et al.*, 2012).

Para a garantia da qualidade dos produtos farmacêuticos, se faz necessário atestar a qualidade das análises químicas realizadas, haja vista que dados analíticos não confiáveis são capazes de conduzir a decisões desastrosas e prejuízos irreparáveis, tanto do ponto de vista financeiro como do risco sanitário envolvido. Visando atestar estas medições, dois fatores devem ser considerados: a qualidade das medidas instrumentais e a confiabilidade estatística dos cálculos envolvidos no seu processamento (RIBANI *et al.*, 2004; POLLITIS *et al.*, 2017; COELHO *et al.*, 2018). Neste contexto, destaque especial deve ser dado ao desenvolvimento de um novo método analítico, à adaptação ou à aplicação de um método conhecido para gerar as medições químicas (MARCO *et al.*, 2019).

Existem diversos conceitos para a validação, dentre eles, pode-se destacar o do Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial (INMETRO), que define validação como a comprovação, por meio do fornecimento de evidência objetiva, de que os requisitos para uma aplicação ou uso específico foram atendidos, esta mesma definição pode ser encontrada na NBR ISO/IEC 17025:2005 (apud KOLLA *et al.*, 2019). Já, a ANVISA define a validação analítica como a avaliação sistemática de um método por meio de ensaios experimentais, de modo a confirmar e fornecer evidências objetivas de que os requisitos específicos para o seu uso pretendido são atendidos (BRASIL, 2017c; MARCO *et al.*, 2019). Apesar de serem definições diferentes, estes conceitos apresentam similaridades nos quesitos necessários para a verificação da confiabilidade dos métodos: a necessidade da avaliação dos parâmetros de validação e a aplicação de métodos estatísticos para a análise dos dados oriundos desta experimentação (ORTIZ; SARABIA; SANCHEZ, 2010; OLIVIERI, 2015).

**Quadro 01** – Parâmetros a serem considerados na validação analítica, conforme a Resolução-RDC nº 166, de 24 de julho de 2017, da ANVISA.

Parâmetro Avaliado	Identificação	Teste de impurezas		Doseamento Dissolução (quantificação) Uniformidade de conteúdo Potência
		Quantitativo	Ensaio limite	
Exatidão	Não	Sim	Não	Sim
Precisão repetibilidade	Não	Sim	Não	Sim
Precisão intermediária	Não	Sim <sup>(1)</sup>	Não	Sim <sup>(1)</sup>
Seletividade <sup>(2)</sup>	Sim	Sim	Sim	Sim
Limite de Detecção	Não	Não <sup>(3)</sup>	Sim	Não
Limite de Quantificação	Não	Sim	Não	Não <sup>(3)</sup>
Linearidade	Não	Sim	Não	Sim
Intervalo	Não	Sim	Não	Sim

(1) Nos casos em que foi conduzida a reprodutibilidade, não é necessário conduzir a precisão intermediária.

(2) Nos casos de ensaios de identificação, pode ser necessária a combinação de dois ou mais procedimentos analíticos para atingir o nível necessário de discriminação.

(3) Pode ser necessário em alguns casos.

**Fonte:** (BRASIL, 2017c)

Em 1990, a *International Union of Pure and Applied Chemistry* (IUPAC) estabeleceu um protocolo para a padronização da determinação das características de mérito. Neste mesmo período, as agências reguladoras de saúde dos Estados Unidos da América, Japão e União Europeia passaram a se reunir para o estabelecimento dos critérios para a determinação das figuras de mérito, em métodos que tinham como escopo a avaliação de fármacos, criando a Conferência Internacional sobre Harmonização (ICH, do inglês *International Conference on Harmonisation*). Além destes existe, na área de química ambiental, a Agência de Proteção Ambiental Americana (EPA, do inglês *Environmental Protection Agency*), que estabelece as orientações para a validação dos métodos empregados na análise de contaminantes publicados pela Agência de Proteção Ambiental (apud OLIVIERI, 2015).

No Brasil, a ANVISA publicou a Resolução-RDC nº 166, de 24 de julho de 2017, que dispõe sobre a validação de métodos analíticos e determina quais as figuras de mérito devem ser aferidas dependendo da finalidade do método desenvolvido (Quadro 01) (ALLEGRIANI; OLIVIERI, 2014; BRASIL, 2017c).

### **3.3.1 Seletividade**

A seletividade é entendida como a capacidade de identificação ou quantificação do analito na presença de componentes que possam estar presentes numa amostra. É a capacidade do método de determinar, identificando e/ou quantificando a substância de interesse no meio de outras. Esta identificação deve ser feita de modo que o sinal gerado pelo equipamento seja especificadamente da substância analisada. Desta forma a comprovação da seletividade se dá por meio da comprovação de que a resposta analítica se deve única e exclusivamente ao analito, sem interferência de solventes, diluentes, da matriz, de impurezas ou de produtos de degradação. A avaliação deste parâmetro pode ser feita pela comparação da resposta de uma substância química de referência ao método e com a resposta do analito em sua matriz (OLIVIERI, 2015). Cabe salientar que para métodos cromatográficos deve ser comprovada a pureza do sinal (pico) do analito (BRASIL, 2017c).

### **3.3.2 Linearidade**

A linearidade é entendida como o intervalo no qual existe uma relação linear entre o sinal medido (variável dependente) e a concentração do analito (variável independente) e, a partir dessa relação pode-se transpor a um modelo matemático linear do tipo  $y = ax + b$ , gerando uma curva, a qual dá-se o nome de curva de calibração ou curva analítica (ORTIZ; SARABIA; SANCHEZ, 2010).

Para que se possa estabelecer a linearidade deve-se utilizar, no mínimo, 5 concentrações diferentes da substância química de referência, com a determinação em triplicata, os dados obtidos devem ser apresentados em representação gráfica em função da concentração do analito. O gráfico de dispersão dos resíduos, acompanhado de sua avaliação estatística, deve ser avaliado em nível de significância de 5%. A equação da reta de regressão de  $y$  em  $x$  deve ser estimada pelo método dos mínimos quadrados. A avaliação da associação linear entre as variáveis, por meio do coeficiente de correlação ( $r$ )

e de determinação ( $r^2$ ) devem estar acima de 0,990 e, finalmente, a avaliação do coeficiente angular que deve ser significativamente diferente de zero (BRASIL, 2017c).

### 3.3.3 Limite de Detecção

O limite de detecção é definido como a menor quantidade de analito presente em uma amostra que pode ser detectada, mas não necessariamente pode ser quantificada (ALLEGRIINI; OLIVIERI, 2014; BRASIL, 2017c).

Existem três maneiras de se estimar o limite de detecção: o **método visual**, em que se considera a menor concentração a ser detectada na análise de amostras com baixas concentrações de analito; o **método da relação sinal ruído**, no qual o limite é estimado pela comparação do sinal analítico proveniente de uma amostra contendo uma baixa concentração do analito com o sinal produzido pelo branco, considerando a razão sinal-ruído maior ou igual a 2:1 e, por fim, o **método baseado em parâmetros da curva analítica**, que leva em consideração o intervalo de confiança da regressão e, neste caso, o limite de detecção é definido como a concentração mínima de uma substância que pode ser medida e informada com 99% ou 95% de confiança (OLIVEIRI, 2014; OLIVIERI, 2015).

### 3.3.4 Limite de quantificação

O limite de quantificação é definido como a menor quantidade de analito presente em uma amostra que pode ser determinado dentro dos limites de precisão e exatidão do método (ALLEGRIINI; OLIVIERI, 2014; BRASIL, 2017c).

O limite de quantificação também pode ser estimado de três maneiras diferentes: **método visual**, que parte da análise de amostras com concentrações conhecidas do analito e se define o limite de quantificação pela menor concentração que pode ser quantificada levando em consideração a precisão e exatidão, o **método sinal ruído**, estimado pela comparação do sinal analítico apresentado para uma amostra em baixas concentrações do analito com o sinal do branco e, então se estabelece a concentração mínima em que o analito pode ser quantificado, considerando a relação sinal-ruído de 10:1 e, o **método baseado em dados da curva analítica**, que também é calculado a partir do intervalo de confiança da curva analítica (ORTIZ; SARABIA; SANCHEZ, 2010; MARCO *et al.*, 2019).

### 3.3.5 Precisão

A precisão avalia a dispersão entre os valores medidos e o valor médio e, é calculada por meio do estabelecimento do desvio padrão relativo (DPR) da série de medições. A precisão pode ser avaliada de três maneiras: **repetibilidade ou precisão intra-corridas**, que define a precisão dos resultados com o mesmo analista e o mesmo equipamento, na mesma condição de operação em única corrida analítica e num curto intervalo de tempo, a **precisão intermediária** ou inter-corridas/inter-dias, realizadas dentro de um mesmo laboratório, por diferentes analistas e em diferentes dias, ou por equipamento diferentes e, **reprodutibilidade** quando os resultados obtidos são realizados **por laboratórios diferentes**, mas seguindo o mesmo protocolo (BARACHE *et al.*, 2017; BRASIL, 2017c; KOLLA, *et al.*, 2019).

Para a determinação da precisão por repetibilidade, a ANVISA preconiza que as amostras devem estar sob as mesmas condições de operação, mesmo analista e mesma instrumentação e, realizadas em única corrida analítica, utilizando no mínimo 9 determinações dentro do intervalo linear, com 3 concentrações: baixa e média e alta, realizando em cada uma delas três réplicas ou a realização de 6 réplicas na concentração 100%, sendo preparada individualmente (BRASIL, 2017c).

### 3.3.6 Exatidão

A exatidão é obtida por meio do grau de concordância entre o valor medido por um método e o valor de referência, considerado como valor verdadeiro, tendo uma relação direta com o erro absoluto de uma medida (OLIVIERI, 2014; BRASIL, 2017c). Para a determinação da exatidão existem três maneiras que podem ser utilizadas: a verificação da exatidão por meio de uma **substância química de referência**, que possui pureza conhecida e documentada ou pelo estabelecimento de comparação entre o método a ser validado e um método já validado e com precisão e exatidão já conhecidos (OLIVIERI, 2015). Na indisponibilidade de amostras de todos os componentes do medicamento, pode ser realizada a análise pelo método de **adição de substância química de referência**, no qual quantidades conhecidas desta substância são acrescentadas à solução do produto terminado, ou ainda a exatidão pode ser calculada pela **diferença entre o valor encontrado (valor predito) e o valor de referência (valor verdadeiro)** (OLIVIERI, 2014; BARACHE *et al.*, 2017; BRASIL, 2017c; KOLLA, *et al.*, 2019).

Cabe destacar ainda que, para a ANVISA, a realização da exatidão deve ser feita em, no mínimo, 9 determinações, contemplando o intervalo linear do método, sendo em três concentrações definidas como baixa, média e alta e, que nestes pontos, sejam realizadas em três réplicas (BRASIL, 2017c).

### 3.3.7 Faixa de trabalho

A faixa de trabalho é definida a partir dos estudos de linearidade, precisão e exatidão e determina qual o domínio de concentração do analito em que o método responde e é capaz de gerar dados confiáveis (BRASIL, 2017c).

### 3.3.8 Robustez

A robustez é a figura de mérito que avalia a capacidade do sinal analítico oriundo do método em questão resistir a pequenas e deliberadas variações das condições analíticas, sem alterar significativamente sua exatidão e precisão, portanto, é uma medida da quantidade de variabilidade que o método pode suportar, sem perder a confiabilidade (OLIVIERI, 2015). Para a análise da robustez, a ANVISA informa quais parâmetros devem ser modificados nos diferentes métodos (Quadro 02) (BRASIL, 2017c).

**Quadro 02**– Condições para a avaliação da robustez do método, conforme a Resolução-RDC nº 166, de 24 de julho de 2017, da ANVISA.

Método	Parâmetro
Preparo de amostras	Estabilidade das soluções analíticas
	Tempo de extração
	Compatibilidade de filtros
Espectrofotometria	Variação do pH da solução
	Diferentes lotes ou fabricantes de solventes
Cromatografia líquida	Variação do pH da fase móvel
	Variação da composição da fase móvel
	Diferentes lotes ou fabricantes da coluna

Fonte: adaptado de (BRASIL, 2017c)

Os compêndios considerados oficiais pela agência reguladora nacional, no caso do Brasil, a ANVISA, informam quais os métodos devem ser aplicados nos testes para a aferição da qualidade dos medicamentos. Estes ensaios estão disponíveis na Farmacopeia Brasileira, que se encontra da 6ª Edição (2019) e, na falta de uma monografia ou de um ensaio para o insumo farmacêutico ativo ou produto acabado, podem ser utilizadas outras

Farmacopeias (Quadro 03) que são reconhecidas por esta Agência (BRASIL, 2009). Caso não existam métodos, também nestes compêndios, os estabelecimentos produtores de medicamentos devem propor e otimizar suas metodologias próprias para utilização no controle de qualidade dos medicamentos e submeter a análise da ANVISA (BRASIL, 2017c; BRASIL, 2019b).

Nestes compêndios, para a determinação dos fármacos, são empregadas técnicas analíticas tais clássicas como: titulações ácido-base, potenciométricas e complexométricas; ou instrumentais: espectrofotométricas e cromatográficas (CONCEIÇÃO *et al.*, 2019). Um estudo realizado por Siddiqui; AlOthmam; Rahman (2017), com os métodos disponíveis na Farmacopeia Americana (USP 27), de 2004, demonstra que os métodos empregando a espectrofotometria de absorção molecular no ultravioleta e visível (UV-Vis) representava 8,5% e a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) representava 44% dos ensaios para a determinação do quantitativo de fármacos tanto no insumo farmacêutico ativo quanto nos produtos acabados. Analisando a Farmacopeia Brasileira (2019) são, aproximadamente, 20% de métodos empregando a espectrofotometria de absorção molecular UV- Vis e 36% utilizando CLAE.

Em se tratando, especificadamente, do alopurinol o compêndio brasileiro possui uma monografia para o produto acabado (comprimidos), inexistindo para o insumo farmacêutico ativo, enquanto algumas Farmacopeias, como a Europeia (2017), Americana (2019), Internacional (2019) e Japonesa (2019) possuem tanto a monografia para o insumo quanto para os comprimidos.

**Quadro 03** – Farmacopeias estrangeiras admitidas como compêndios oficiais pela ANVISA

<b>Farmacopeias</b>	
Alemã	Francesa
Americana	Internacional (Organização Mundial de Saúde)
Argentina	Japonesa
Britânica	Mexicana
Europeia	Portuguesa

Fonte: BRASIL, 2009

### 3.4 Espectrofotometria de absorção molecular na região ultravioleta na determinação de fármacos

Os métodos espectroscópicos de análises, de um modo geral, baseiam-se na medida da radiação emitida ou absorvida pela espécie que se pretende analisar e, estes podem ser classificados de acordo com a região espectral onde ocorre a medição: visível, ultravioleta ou infravermelho (YI *et al.*, 2016). Esta radiação é fruto da excitação eletrônica de átomos (espectroscopia atômica) ou de moléculas (espectroscopia molecular), que pode ocorrer quando uma energia (calor, energia elétrica, luz ou reação química) interage com a substância (LI; HUR, 2017). Dentre as técnicas analíticas que utilizam a interação da matéria com a luz pode-se destacar a espectrofotometria de absorção molecular na região do ultravioleta (UV) e visível (VIS), que tem larga aplicação na quantificação de insumos farmacêuticos ativos nos diversos produtos farmacêuticos, pois possui vantagens como: a simplicidade dos procedimentos, velocidade de execução dos testes, além da precisão e exatidão (REZENDE *et al.*, 2017).

A absorção se dá por meio da interação da radiação eletromagnética com o composto, fazendo com que ocorra a absorção da radiação eletromagnética pela molécula sendo seus elétrons promovidos para níveis de maior energia. A região espectral de absorção depende do tipo de ligação química presente na molécula absorvente, podendo ser na região UV de 200 a 400 nm ou na região VIS de 400 a 800 nm. Estas moléculas são capazes de absorver a radiação devido à presença de grupos cromóforos, que absorvem no UV-VIS. Cabe destacar que cada molécula é capaz de absorver a radiação eletromagnética em frequências específicas e, por este motivo podem ser utilizadas para a identificação e quantificação (REDASANI *et al.*, 2018). Estes procedimentos envolvem medidas diretas de espécies que absorvem radiação, ou medidas realizadas após derivação química, sendo possíveis ainda acoplamento a diversas técnicas ou processos, como cromatografia, eletroforese, além da realização em fluxo (SIDDIQUI; ALOTHMAM; RAHMAN, 2017). Na literatura científica, encontram-se diversos exemplos de métodos desenvolvidos utilizando esta técnica para a determinação de fármacos seja como insumo farmacêutico ativo isolado ou como constituintes de formas farmacêuticas.

Eles são empregados para determinar a concentração dos insumos farmacêuticos ativos em condições bem definidas, por meio da razão entre a radiação (monocromática) incidente ( $I_0$ ) e a radiação transmitida ( $I$ ). A radiação absorvida pela amostra é comparada

com a radiação absorvida por uma substância com concentração conhecida (padrão), e as determinações espectrofotométricas estão fundamentadas na lei de Lambert-Beer (Equação 01) (REZENDE *et al.*, 2017).

$$A = \log\left(\frac{I_0}{I}\right) = \epsilon \times b \times c \quad (\text{Equação 01})$$

A = Absorvância

$I_0$  = radiação monocromática incidente

I = radiação transmitida

$\epsilon$  = Absortividade molar

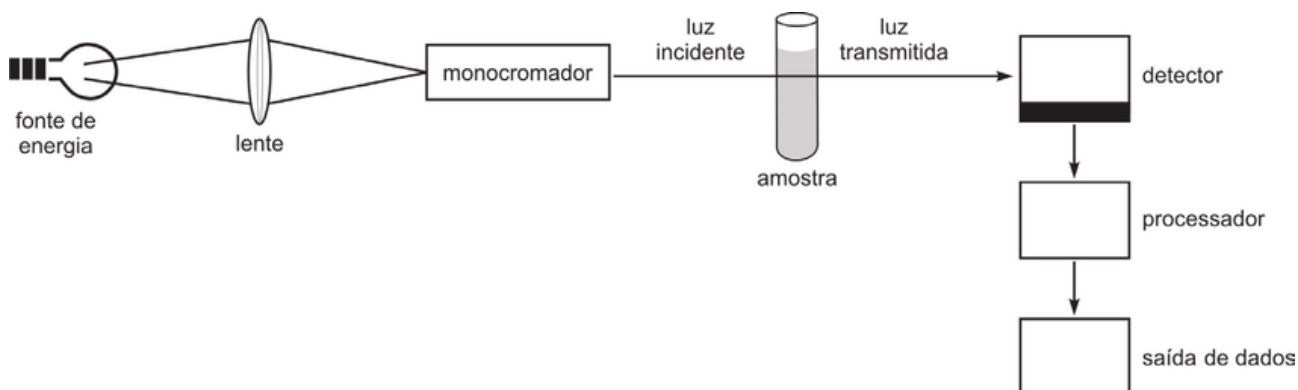
b = caminho ótico

c = concentração da espécie absorvente

A absortividade molar é entendida como a capacidade que um mol de substância tem de absorver a luz incidida, em um dado comprimento de onda (YI *et al.*, 2016). Esta propriedade é característica de cada substância e depende do comprimento de onda, da temperatura e do solvente onde a substância está dispersa. O caminho ótico é definido como o caminho percorrido pelo feixe de luz através da amostra e a concentração da substância absorvente (LI; HUR, 2017). Cabe salientar que a Lei de Lambert-Beer possui a limitação para absorvâncias compreendidas entre 0 e 1 para amostras líquidas, valores acima de 1 não seguirão a correlação linear e, portanto, não podem ser utilizadas.

As medidas espectrofotométricas são realizadas por meio de um equipamento chamado de espectrofotômetro (Figura 04) que é capaz de dispersar a radiação emitida por uma fonte luminosa, separando, por meio de um monocromador ou filtro, os comprimentos de onda da fonte e incidindo na amostra um comprimento de onda específico, e captando a radiação que não foi absorvida (radiação transmitida) que, então, é captado pelo aparelho e transformado em um sinal elétrico (REZENDE *et al.*, 2017).

**Figura 04** – Esquema de funcionamento do espectrofotômetro de absorção na região do ultravioleta.



Fonte: PARRON; PEREIRA; MUNIZ (2011)

Apesar das versatilidades e do fácil emprego na rotina laboratorial, esta técnica possui como desvantagem o fato de não ser uma técnica separativa, não é capaz de detectar compostos diferentes que absorvam em comprimentos de ondas próximos (REDASANI *et al.*, 2018).

A Farmacopeia Brasileira (2019) emprega a espectrofotometria de absorção molecular no ultravioleta para o alopurinol em três ensaios diferentes: Ensaio de identificação, dissolução e doseamento (BRASIL, 2019c). Em algumas Farmacopeias, como a Americana (2019), Internacional (2019) e Japonesa (2019) esta técnica só é utilizada no ensaio de dissolução. Já na literatura foram encontradas 05 publicações que empregaram espectrofotometria de absorção molecular no ultravioleta para determinação de alopurinol em comprimidos (Quadro 04).

**Quadro 04** – Métodos para a determinação de alopurinol em comprimidos que empregam espectrofotometria de absorção molecular encontrados na literatura científica.

Solvente	Comprimento de onda (nm)	Referência
HCl 0,01 mol L <sup>-1</sup>	250	Farmacopeia Brasileira, 2019
HCl 0,01 mol L <sup>-1</sup>	250	Farmacopeia Japonesa, 2019
HCl 0,01 mol L <sup>-1</sup>	250	Farmacopeia Americana, 2019
HCl 0,01 mol L <sup>-1</sup>	250	Farmacopeia Internacional, 2019
HCl 0,1 mol L <sup>-1</sup>	215	ALGHADI; HAMEDELNEIL, 2017
Tampão acetato pH 4,5	242	
Tampão fosfato pH 6,8	242	
HCl 0,01 mol L <sup>-1</sup>	250	MOGAL <i>et al.</i> , 2016
HCl 0,01 mol L <sup>-1</sup>	250	SMETISKO; MILJANIC, 2017
Tampão fosfato pH 6,8	262	KUMAR; BASAVA RAO, 2016
HCl 0,1 mol L <sup>-1</sup>	250	AMMAR <i>et al.</i> , 2011

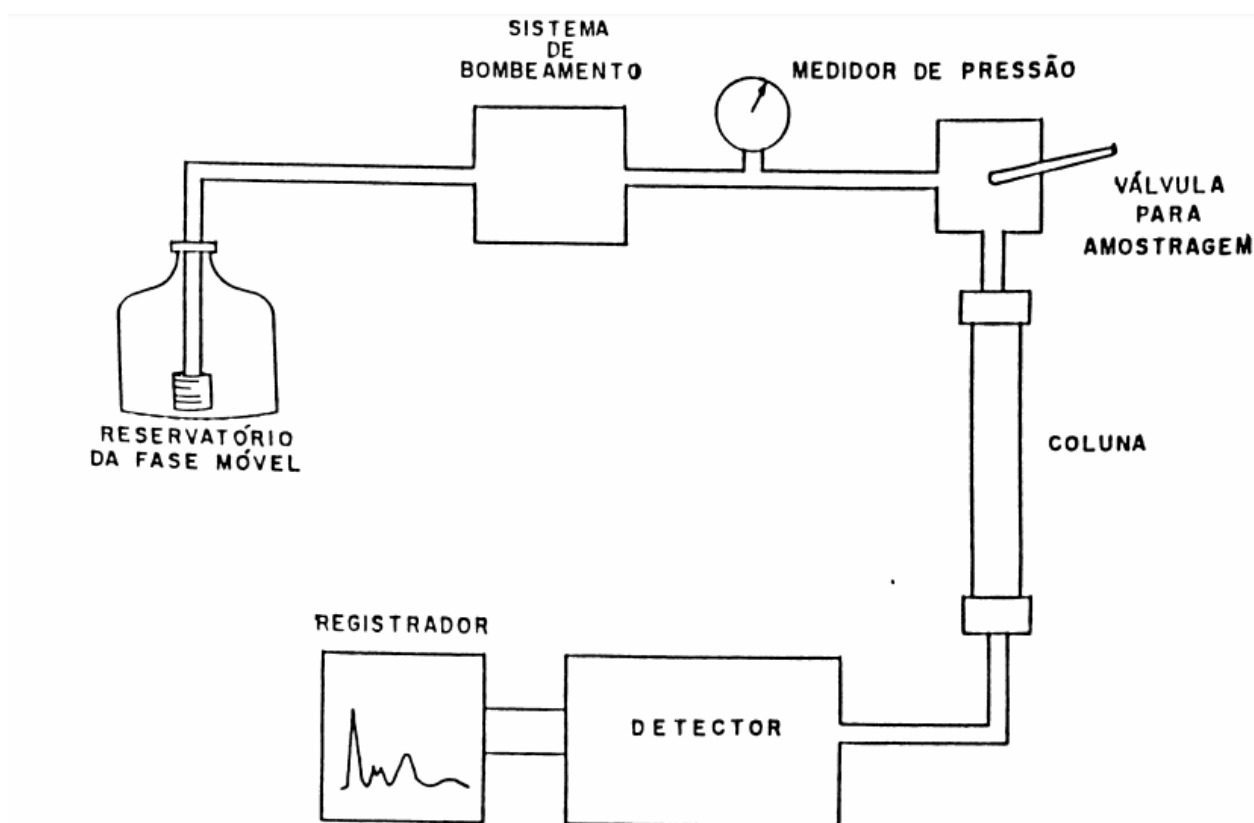
### 3.5 Cromatografia líquida de alta eficiência na determinação de fármacos

A CLAE é uma das técnicas analíticas mais empregadas para a identificação e quantificação de fármacos nas diversas farmacopeias, pois é capaz de separar os compostos presentes em uma mistura, identificá-los e/ou quantificá-los, separadamente (BONFILIO *et al.*, 2012; THAMMANA, 2016). Esta técnica apresenta como vantagens a alta resolução e capacidade de gerar resultados quantitativos com alta precisão e boa sensibilidade, tendo uma ampla aplicação nas áreas: farmacêutica, ambiental, alimentar, forense e clínica (BOADU *et al.*, 2015). Como desvantagens, podem-se citar o alto custo

de instrumentação e operação, a necessidade de experiência para o manuseio (DA SILVA; COLLINS, 2011).

A execução desta técnica é feita em um equipamento chamado de cromatógrafo líquido de alta eficiência (Figura 05), equipado com uma bomba de alta pressão capaz de fazer o solvente (fase móvel) eluir por uma coluna preenchida com um material sorvente (fase estacionária) (POLITIS *et al.*, 2017). Nesta eluição cada composto presente na mistura terá interações diferentes com a fase estacionária e com a fase móvel, portanto, gerará tempos de saída da coluna e, conseqüentemente, detecção diferentes, sendo então este o princípio desta técnica (THAMMANA, 2016). A comparação dos tempos de retenção ( $T_r$ ) do cromatograma oriundo da substância química de referência com os dos medicamentos é o que revela a presença do fármaco nos produtos testados (SAHU *et al.*, 2017).

**Figura 05** – Esquema do cromatógrafo líquido de alta eficiência.



Fonte: GUIMARÃES; COLLINS (1997)

Para o desenvolvimento de métodos empregando a cromatografia líquida de alta eficiência deve-se observar as características físico-químicas da amostra e do analito, pois

este conhecimento evita problemas na quantificação, que podem estar relacionados com reações secundárias, com impurezas ou degradações nas estruturas durante a aplicação do método analítico (SILVA; COLLINS, 2011). Deve especial destaque a compatibilidade da amostra e do analito tanto com a fase móvel, quanto com a fase estacionária, para não causar entupimento na coluna e, por conseguinte, inviabilizar as determinações (SIDDIQUI; ALOTHMAM; RAHMAN, 2017).

Existem diversas colunas cromatográficas no mercado, as quais variam de fabricante, dimensão e tamanho das partículas que as preenchem (POLITIS *et al.*, 2017). As colunas normalmente são feitas de aço inoxidável, com comprimento entre 50 e 300 mm, com o diâmetro interno em torno de 2 e 5 mm, e preenchidas com uma fase estacionária, cujo tamanho das partículas podem variar de 3 a 10  $\mu\text{m}$  (THAMMANA, 2016). Dependendo do tipo de preenchimento da fase estacionária, a CLAE pode ser processada em: fase normal, fase reversa, por exclusão de tamanho ou troca iônica (SIDDIQUI; ALOTHMAM; RAHMAN, 2017).

Na fase normal a separação a fase estacionária é polar, tendo o destaque para a utilização da sílica, e é percolado por ela um solvente, ou misturas deles, de característica não polar, tais como, hexano, clorofórmio e o éter dietílico. A separação é baseada na polaridade e a capacidade da fase estacionária em reter as substâncias polares na coluna, fazendo com que estas levem mais tempo para alcançarem o detector (tempo de corrida) (BOADU *et al.*, 2015). Logo, este método é aplicado para a determinação de compostos apolares. Já na fase reversa, a coluna é preenchida com substância apolar, sendo amplamente utilizadas as de sílica modificada com octadecilsilano (C18) e octacilsilano (C8), e o solvente que atravessa esta fase é de natureza polar. Quanto mais apolar for a substância carregada por este solvente maior será o tempo em que esta atravessará a fase estacionária e, por conseguinte, detectada (SILVA; COLLINS, 2011). Para a determinação de compostos polares este método é utilizado com frequência, tendo destaque para as aplicações farmacêuticas incluindo os ensaios de qualidade, estudos de dissolução e estabilidade dos medicamentos (THAMMANA, 2016).

Além destes dois métodos, são empregados na CLAE a exclusão por tamanho, em que é incorporado à coluna substância com poros de tamanho definidos para que as partículas carregadas pela fase móvel, com diâmetro maior que o tamanho dos poros sejam

eluídas primeiro, enquanto as partículas de tamanho menor ficam retidas na coluna cromatográfica (POLITIS *et al.*, 2017). Por fim, o método de separação por troca iônica, no qual a fase estacionária possui superfície ionicamente carregada, e as partículas de cargas iguais a desta superfície migrarão pela coluna com maior rapidez, enquanto que as partículas carregadas com carga oposta à da coluna irão interagir com ela, ficando retidas por mais tempo e detectadas *a posteriori* (BOADU *et al.*, 2015). Neste caso, a fase móvel usada é um tampão aquoso que controla o pH e a força iônica (MEHTA; PATELIA; BHOYA, 2013).

Outro ponto que merece destaque em uma separação cromatográfica é a fase móvel, pois a mesma “carrega” o analito pela coluna e o faz chegar ao detector para ser identificado e/ou quantificado (SAHU *et al.*, 2017). Esta fase deve ser capaz de carrear o analito sem, no entanto, reagir com o mesmo, para que não se forme outro composto e inviabilize a determinação (SILVA; COLLINS, 2011; SIDDIQUI; ALOTHMAM; RAHMAN, 2017). A fase móvel deve ser compatível com o detector empregado e, também possuir polaridade adequada para permitir uma separação conveniente dos componentes da amostra (SABIR; MOLOY; PARMINDER, 2013). Embora existam vários solventes, três deles são mais utilizados: água, metanol e acetonitrila (MARCO *et al.*, 2019).

A bomba presente na CLAE tem o objetivo de captar o solvente, ou a mistura deles, que compõem a fase móvel e eluir na fase estacionária, perpassando-a até que se chegue ao detector, no qual o analito será determinado (SILVA; COLLINS, 2011). Os equipamentos são equipados com bombas que podem chegar a uma pressão de 42.000 Kpa, quando em operação, mas esta pressão é dependente das dimensões da coluna, do tamanho das partículas e da composição da fase móvel (THAMMANA, 2016). Esta pressão gera um fluxo de passagem de fase móvel pelo equipamento, sendo também uma variável a ser parametrizada nos métodos cromatográficos desenvolvidos (SIDDIQUI; ALOTHMAM; RAHMAN, 2017). O fluxo pode ser subdividido em dois: fluxo derivado de bombeamento isocrático, em que a composição da fase móvel é mantida constante durante toda análise cromatográfica, ou bombeamento por gradiente, em que há a necessidade de alteração da composição da fase móvel, sem alteração da vazão total, com a finalidade de diminuir tempo de análise e/ou melhorar a separação dos componentes da amostra (BOADU *et al.*, 2015). O fluxo, por sua vez, pode ser subdividido em dois: bombeamento por gradiente em baixa pressão, onde se utiliza uma única bomba e a seleção do solvente a ser utilizado dá-

se por meio de válvula de múltiplas vias controladas pelo *software* do sistema, e bombeamento por gradiente em alta pressão, onde são necessárias bombas específicas para cada solvente utilizado na fase móvel (MARCO *et al.*, 2019).

Já o injetor é o local onde a amostra é injetada para ser carregada pela fase móvel e seguir seu trajeto, atravessando a fase estacionária, separando-a nos mais diversos componentes e encaminhadas em tempos diferentes para o detector (BOADU *et al.*, 2015). Na CLAE, o volume de injeção pode variar de 0,5 a 500  $\mu\text{L}$  e os injetores automáticos (auto-injetores ou auto-amostradores) são utilizados frequentemente, pois conferem ao método uma boa precisão (SABIR; MOLOY; PARMINDER, 2013).

O detector da CLAE está situado após a coluna e é capaz de distinguir os analitos à medida que eluem da coluna cromatográfica (THAMMANA, 2016). A seleção do detector é de extrema importância e é dependente da natureza dos analitos, dos potenciais interferentes, do limite de detecção necessário, além do custo associado para a aquisição (SILVA; COLLINS, 2011). Os detectores mais utilizados regularmente são: espectroscopia de UV, que exibe boa versatilidade e alta sensibilidade, sendo empregado rotineiramente na determinação de impurezas e análises quantitativas de baixas concentrações, podendo ser encontrado no mercado como um detector que faz leitura apenas pontual, ou seja em um único comprimento de onda ou com detector simultâneos de comprimento de onda *Diode Array* (DAD), no qual pode-se selecionar o melhor comprimento de onda para cada um dos componentes, otimizando dessa forma a sensibilidade (LI; HUR, 2017). O DAD é um detector importante na determinação de impurezas, nas sínteses e controle de qualidade de insumos farmacêuticos ativos e de produtos farmacêuticos (SIDDIQUI; ALOTHMAM; RAHMAN, 2017). O detector de fluorescência oferece alta sensibilidade e seletividade para a quantificação de compostos capazes de emitir luz quando submetidos a radiação. O detector por espectrometria de massa é capaz de identificar e quantificar compostos por meio da relação carga-raio ( $m/z$ ), dentre outros detectores disponíveis no mercado (POLITIS *et al.*, 2017).

O registro dos sinais oriundos dos detectores é realizado pelos *softwares* dos cromatógrafos, estabelecendo uma correlação entre o tempo de detecção e o sinal da grandeza física ou físico-química apresentada, gerando um gráfico, o qual é chamado de cromatograma (SABIR; MOLOY; PARMINDER, 2013). A partir do cromatograma são

gerados uma série de parâmetros importantes no processo de identificação dos compostos separados, além de avaliar o desempenho cromatográfico e auxiliar na otimização do processo de separação. Dentre eles tem-se: o tempo de retenção, fator de retenção, fator de separação, número de pratos e resolução (BOADU *et al.*, 2015).

O tempo de retenção ( $T_r$ ) de um analito é definido como o tempo decorrido do instante em que a amostra foi injetada até o instante do máximo do pico (SIDDQUI; ALOTHMAM; RAHMAN, 2017). Nas análises cromatográficas, desde que mantidas constantes o fluxo da fase móvel e a temperatura da coluna, o tempo de retenção será constante (THAMMANA, 2016). A partir do tempo de retenção pode ser calculado os seguintes parâmetros: fator de retenção ( $k$ ), fator de separação ( $\alpha$ ), número de pratos teóricos ( $N$ ) e resolução, sendo esta uma medida quantitativa da habilidade da cromatografia em separar dois compostos (POLITIS *et al.*, 2017).

As Farmacopeias Brasileira (2019) e Americana (USP, 2019) utilizam para a determinação de alopurinol como fase estacionária uma coluna C18 (octadecilsilano), de dimensões 250 mm X 4,6 mm X 5,0  $\mu\text{m}$ , com o tempo de corrida de 30 minutos e 35 minutos, respectivamente. O desenvolvimento de métodos com menor tempo de corrida, favorece tanto a rotina (número maior de corridas, em menor tempo), como o reduzido consumo de solventes (SABIR; MOLOY; PARMINDER, 2013). Na literatura foram encontrados 06 estudos de determinação de alopurinol empregando a CLAE, destes 04 realizam a determinação do fármaco em urina e sangue e apenas 02 estudos trataram da avaliação em medicamentos (Quadro 05).

A busca por processos cada vez mais rápidos faz com que sejam desenvolvidas colunas cada vez menores e com um tamanho de partículas de preenchimento menor ( $\leq 5,0 \mu\text{m}$ ), o que faz com que a superfície de contato entre partículas e fase móvel, que carrega o analito, seja maior gerando maior número de interações e, por consequência, uma separação mais efetiva (POLITIS *et al.*, 2017). Além do tamanho das partículas, uma alternativa que pode ser utilizada no desenvolvimento de métodos é a mudança da polaridade da fase estacionária, diminuindo-a ou aumentando-a, dependendo do analito a ser separado (RODRIGUES, 2011) e a junção dessas duas alternativas, tamanho da coluna e polaridade dela, pode reduzir em muito o tempo necessário para a separação dos compostos de uma mistura (BOADU *et al.*, 2015).

**Quadro 05-** Métodos para determinação de alopurinol que empregam cromatografia líquida de alta eficiência encontrados na literatura científica.

Objetivo do estudo	Técnica analítica	Fase estacionária	Fase móvel	Condições	Referência
Determinar alopurinol e oxipurinol em plasma humano	Cromatografia líquida-espectrometria de massas (LC-MS/MS)	C18 (150 mm x 4,6 mm x 5,0 µm)	ácido fórmico 0,1% (v v <sup>-1</sup> ) e acetonitrila (98:2, v v <sup>-1</sup> )	Fluxo: 0,5 mL min <sup>-1</sup> temperatura da coluna 40°C	RATHOD <i>et al.</i> , 2017
Determinar alopurinol e oxipurinol em soro humano	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência	C18 (250 mm x 4,0 mm x 5,0 µm)	acetato de sódio 0,02 mol L <sup>-1</sup> ajustado com ácido acético 30% para pH 4,5;	Fluxo: 1,0 mL min <sup>-1</sup> Temperatura da coluna 32,5°C Detecção: 254 nm	REINDERS <i>et al.</i> , 2007
Determinar alopurinol e oxipurinol em plasma e urina de humanos	Cromatografia líquida-espectrometria de massas (LC-MS/MS)	C18 (150 mm x 4,6 mm x 3,5 µm)	metanol e solução aquosa de formiato de amônio 5 mmol L <sup>-1</sup> (95:5, v v <sup>-1</sup> )	Fluxo: 0,5 mL min <sup>-1</sup> Temperatura da coluna 40°C	LIU <i>et al.</i> , 2013
Determinar alopurinol e oxipurinol em soro humano	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência	C18 (100 mm x 8,0 mm x 10,0 µm)	acetonitrila contendo 100 mmol L <sup>-1</sup> de solução de fosfato de potássio pH 4,0 e 0,5 mmol L <sup>-1</sup> de Hidrogenossulfato de tetra-n-butilamônio (2:98, v v <sup>-1</sup> )	Fluxo: 2,0 mL min <sup>-1</sup> detecção: 260 nm	TADA <i>et al.</i> 2003
Determinar alopurinol em comprimidos	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência	C18 (250 mm x 4,6 mm x 5,0 µm)	solução aquosa de ácido acético e acetato de sódio (2,72 g L <sup>-1</sup> ) ajustado para pH 4,5 e acetonitrila (96:4, v v <sup>-1</sup> )	Fluxo: 1,0 mL min <sup>-1</sup> Detecção: 254 nm	AMMAR <i>et al.</i> , 2011
Determinar alopurinol e ácido lipóico em comprimidos	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência	C18 (250 mm x 4,6 mm x 5,0 µm)	acetonitrila e tampão acetato de amônio ajustado para 4,6 (50:50, v v <sup>-1</sup> )	Fluxo: 0,8 mL min <sup>-1</sup> Detecção: 210 nm	RAJKUMAR; BHAVYA; KUMAR, 2014

Outro aspecto a ser abordado é a utilização de solventes tóxicos pode comprometer o meio ambiente e, desta forma, urge a necessidade de desenvolvimento de métodos com maior consciência ambiental, eliminando ou reduzindo o uso dos mesmos. Logo, o uso amigável de solventes menos tóxicos e menos agressivos ao meio ambiente é uma alternativa (MARCO *et al.*, 2019; JAHANGIRIAN *et al.*, 2017; OLIVIERI, 2014).

### **3.6 Ensaios de dissolução de medicamentos**

Para que ocorra a liberação de um fármaco presente em uma forma farmacêutica sólida existem três etapas, que podem ou não ocorrer simultaneamente: desintegração, desagregação e dissolução. Destes, a dissolução tem um importante papel no processo de absorção, uma vez que a velocidade com que ocorre a dissolução é o fator determinante para esta etapa (CONCEIÇÃO *et al.*, 2018). Com o objetivo de determinar a extensão desta velocidade de dissolução foi desenvolvido e aplicado o teste de dissolução *in vitro*, pois este possui papel fundamental no desenvolvimento de formulações sólidas orais e na avaliação da qualidade dos produtos disponíveis a população (PESSANHA *et al.*, 2012; ; SANTOS JUNIOR *et al.*, 2014). Os ensaios de dissolução podem ser subdivididos em: ensaio de dissolução de um ponto e perfil de dissolução. Nestes ensaios é possível avaliar tanto a cinética quanto a eficiência de dissolução de um determinado produto sólido oral (CONCEIÇÃO *et al.*, 2018; CABRAL *et al.*, 2019).

#### **3.6.1 Teste de dissolução**

A realização do teste de dissolução em uma única observação (teste de um ponto) é ideal para a avaliação da adequabilidade da formulação ao seu uso pretendido, disponibilizando ao beneficiário do medicamento, o quantitativo do fármaco para ser absorvido e distribuído no corpo, ou seja, a fração biodisponível (BIANCHINI *et al.*, 2019).

O teste de dissolução de um ponto é realizado, conforme definido no compêndio oficial, empregado para determinar a quantidade de substância ativa dissolvida em um meio de dissolução e em condições especificadas nas monografias, quando o produto é submetido à ação de aparelho chamado de dissolutor (BRASIL, 2019c). Este ensaio determina a porcentagem do insumo farmacêutico ativo liberado no meio de dissolução em função do tempo, tendo como balizador o quantitativo declarado no rótulo e, ainda, visa demonstrar se o produto atende aos critérios definidos na monografia do medicamento

estudado, tendo uma relação de predição *in vitro* da biodisponibilidade (ZAMAN *et al.*, 2016; POLITIS *et al.*, 2017). O dissolutor é dotado de cubas com capacidade de (1.000 mL) a serem preenchidas com o meio de dissolução. Cada cuba deve estar imersa em banho de aquecimento a temperatura controlada de  $(37 \pm 1) ^\circ\text{C}$ . Hastes metálicas contendo o aparato responsável pela rotação do meio de dissolução ficam acima da cuba de dissolução para, quando acionados, promoverem no meio uma velocidade de agitação controlada, conforme definido na monografia do produto. Os aparatos utilizados para a realização do teste são: cesta (aparato 1), pás (aparato 2) e cilindros alternantes (aparato 3), sendo este último de baixa aplicabilidade no compêndio brasileiro (BRASIL, 2019c). Após o processo de dissolução é colhida uma alíquota de cada uma das soluções teste e realizada a quantificação do fármaco presente nas mesmas (BRASIL, 2019c; USP, 2019). O processo de agitação deve ser analisado no teste de dissolução, pois este deve ser suave e constante, numa velocidade determinada na monografia do produto, com eliminação de fontes de vibração para não afetar a hidrodinâmica do sistema (PESSANHA *et al.*, 2012).

Conforme as Farmacopeias Brasileira (2019) e Americana (2019), o teste de dissolução para comprimidos, deve ser executado nas seguintes condições: 900 mL ácido clorídrico (HCl)  $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ ; aparato 2 (pá), com velocidade rotacional de 75 rotações por minuto (rpm), durante 45 minutos. Após o teste uma alíquota é retirada, devidamente filtrada e diluída até concentração adequada ( $1,0 \mu\text{g mL}^{-1}$ ). Em seguida, é realizada a medida da absorvância, empregando a espectrofotometria de absorção molecular, no comprimento de onda 250 nm (BRASIL, 2019c; USP, 2019).

### 3.6.2 Perfil de dissolução

Para a avaliação da qualidade de medicamentos genéricos e similares, a legislação brasileira, por meio da Resolução-RDC nº 200, de 26 de dezembro de 2017, determina a realização do perfil de dissolução comparativo com o medicamento referência. Este teste é realizado através da coleta de diversos pontos ao longo da execução do teste de dissolução, para então determinar se os perfis de dissolução dos dois medicamentos estudados são próximos, sendo possível, então, avaliar um dos parâmetros constantes no estudo de equivalência farmacêutica (SANTOS JUNIOR *et al.*, 2014; VIANA *et al.*, 2016; FERREIRA *et al.*, 2016; BRASIL, 2017b).

Os estudos de equivalência são importantes, pois fazem parte do arcabouço para a comprovação de que os medicamentos genéricos e similares, que em sua grande maioria são de custos inferiores aos de referência, possuem qualidade e podem ser intercambiáveis sem prejuízo da atividade terapêutica. Desde a criação dos medicamentos genéricos (Lei Federal nº 9.787/1999), os testes de equivalência farmacêutica e, dentre eles, o perfil de dissolução comparativo entre medicamentos genéricos e o medicamento referência são exigidos. Para os medicamentos similares esta obrigação só foi determinada pela ANVISA em 2003, com a publicação da Resolução RDC nº 134/2003, que estabeleceu que todo medicamento similar deveria apresentar no ato de renovação do registro do seu medicamento os ensaios de equivalência terapêutica. Já em 2014, foi publicada a Resolução RDC nº 58/2014 obrigando que todos os medicamentos similares que já haviam apresentados os testes de equivalência farmacêutica, incluíssem em suas bulas a expressão; “medicamento similar equivalente ao de referência”, inaugurando, então, mais uma classificação de medicamentos, os similares equivalentes, que possuem a intercambialidade garantida (BRASIL, 2003; BRASIL, 2014). Além disto, esta resolução determinou a publicização da lista de medicamentos similares equivalentes farmacêuticos no site da ANVISA.

O perfil de dissolução é traçado com base no método disponível para a determinação do teste de dissolução (um ponto) disponível nos compêndios oficiais [Farmacopeias Internacional (2017), Brasileira (2019), Americana (2019) e Japonesa (2019)]. Para o estabelecimento do perfil são retiradas amostras ao longo do tempo de execução do teste (o número de pontos de coleta das amostras deve ser representativo do processo de dissolução até a obtenção do platô na curva), devidamente filtradas e diluídas até concentração adequada. Em seguida, é realizada a medida da absorvância empregando a espectrofotometria de absorção molecular, no comprimento de onda 250 nm (IP, 2017; BRASIL, 2019c; JP, 2019; USP, 2019).

Para a realização dos cálculos do estudo comparativo dos perfis de dissolução existem, ao menos, três métodos que podem ser utilizados: o método que utiliza a análise de variância (ANOVA); o modelo independente, que necessitam da realização do cálculo dos fatores: de diferença ( $f_1$ ) e de similaridade ( $f_2$ ), e o modelo dependente, que se utilizam dos modelos matemáticos para a determinação da função mais adequada ao modelo estudado (cinética de dissolução) (PESSANHA *et al.*, 2012). Estes modelos matemáticos

correlacionam as porcentagens dissolvidas do fármaco com o tempo para, então, construir equações de reta e avaliar o seu coeficiente de correlação (BIANCHINI *et al.*, 2019). Dentre as possibilidades de estudo das relações, existem duas que podem ser estudadas neste processo: o **modelo de ordem zero**, em que é construído, para cada produto, um gráfico que relaciona o tempo com a quantidade de fármaco não dissolvido e o modelo de primeira ordem em que, o gráfico é construindo com base na relação tempo versus logaritmo neperiano (ln) da porcentagem de fármaco não dissolvido. A definição de qual modelo melhor explica o comportamento experimental é dada pelo coeficiente de correlação, e a significância dele é fornecida pelos valores de p e pelo teste F (CABRAL *et al.*, 2019).

A partir da definição do modelo matemático é possível realizar os cálculos de meia-vida de dissolução ( $t_{50\%}$ ), entendido como o tempo no qual se dissolvem 50% do fármaco, a constante de velocidade de dissolução (k) e a quantidade dissolvida de fármaco em função do tempo do ensaio de dissolução ( $Q_t$ ), sendo este tempo determinado na monografia do medicamento dos compêndios oficiais (no caso do alopurinol 45 minutos). Além destes modelos cinéticos apresentados, outro parâmetro que pode ser avaliado é a eficiência de dissolução (ED%), que tem por definição a área sob a curva de dissolução em um determinado intervalo de tempo (CONCEIÇÃO *et al.*, 2018). Com este parâmetro é possível ter uma comparação mais fidedigna entre dois produtos, além de ser um parâmetro real da quantidade de fármaco dissolvida no meio (SANTOS JUNIOR *et al.*, 2014).

A ANVISA preconiza que a comparação dos perfis de dissolução seja feita empregando o método modelo independente simples e calculado apenas o fator  $f_2$  (BRASIL, 2010). O fator  $f_1$  indica a porcentagem de diferença entre os dois perfis de dissolução e é calculado por meio da Equação 02:

$$f_1 = \{[\sum_{t=1}^n (R_t - T_t)] / [\sum_{t=1}^n R_t]\} \times 100 \quad (\text{Equação 02})$$

Onde: n = número do tempo  
 $R_t$  = valor de referência da dissolução do grupo de tempo t  
 $T_t$  = valor do teste de dissolução do grupo de tempo t

Já o fator  $f_2$  indica a média da similaridade da porcentagem de dissolução entre os dois perfis e tem seu cálculo por meio da Equação 03:

$$f_2 = 50 \times \log \left\{ \left[ \frac{1}{n} \sum_{t=1}^n (R_t - T_t)^2 \right]^{-0.5} \times 100 \right\} \text{ (Equação 03)}$$

Em que: n = número do tempo  
 $R_t$  = valor de referência da dissolução do grupo de tempo t  
 $T_t$  = valor do teste de dissolução do grupo de tempo t

Na literatura, os valores de  $f_1$  aceitos são de 0 a 15, enquanto para  $f_2$  os valores devem estar compreendidos entre 50 e 100 (PESSANHA *et al.*, 2012), mesmo critério de aceitação definido pela ANVISA (BRASIL, 2019c). Insta salientar que a norma da agência reguladora brasileira, ainda pormenoriza o cálculo de  $f_2$ , nos casos de fármacos que apresentam alta solubilidade e estejam presentes em uma forma farmacêutica sólida de liberação imediata e, ainda, que apresentam dissolução muito rápida, entendido como a dissolução maior que 85% em até 15 minutos (nos dois medicamentos estudados), este fator perde sua capacidade de estabelecer a similaridade (BRASIL, 2010).

Existem poucos estudos na literatura que visam desenvolver e otimizar métodos de doseamento e dissolução de alopurinol em comprimidos. Destes, podem-se destacar o estudo de Ammar e colaboradores (2011) que visava a formulação, caracterização e avaliação biofarmacêutica de comprimidos de alopurinol utilizando para o teste de dissolução o meio de HCl 0,1 mol L<sup>-1</sup>. Para a quantificação da dissolução, foi utilizada a CLAE com fase estacionária a coluna C18 (250 mm x 4,6 mm x 5 µm), com fase móvel: solução aquosa de ácido acético e acetato de sódio (2,72 g L<sup>-1</sup>) ajustado para pH 4,5 e acetonitrila 96:4 (v v<sup>-1</sup>), no fluxo de 1 mL min<sup>-1</sup> e detector UV 254 nm (Quadro 06). Já Alghadi e Hamedelneil (2017) utilizaram os meios de dissolução tampão acetato pH 4,6 e tampão acetato pH 6,8, empregando espectrofotometria de absorção no ultravioleta (215 nm e 242 nm). (Quadro 05). As outras publicações encontradas empregavam, como meio de dissolução, o mesmo determinado pelas farmacopeias, em concentração igual ou superior a estabelecida, HCl 0,01 mol L<sup>-1</sup>).

A partir dos dados encontrados na literatura científica, foi possível observar a utilização de solventes tóxicos como o metanol e acetonitrila em grandes proporções, o que contraria os conceitos da química verde, definida como o desenho, desenvolvimento e implementação de produtos químicos e processos para reduzir ou eliminar o uso ou geração de substâncias nocivas à saúde humana e ao ambiente (JAHANGIRIAN *et al.*, 2017). Portanto, se faz necessário o desenvolvimento de novos métodos que visem a

substituição desses solventes, se possível, ou a minimização da sua utilização (MARCO *et al.*, 2019).

### 3.7 Planejamento fatorial

A busca pelo desenvolvimento de métodos que fossem cada vez mais sensíveis e o advento de técnicas analíticas mais sofisticadas, com a maior responsabilidade ambiental, menos nocivos e mais sustentáveis, fez surgir a quimiometria, entendida como o campo da química que utiliza ferramentas estatísticas e matemáticas para o planejamento e otimização das condições experimentais, e para a extração de informação química relevante de dados químicos multivariados (SAHU *et al.*, 2017).

Na quimiometria, com o emprego das análises multivariadas, é possível avaliar mais de uma variável do domínio experimental simultaneamente, além das correlações (interações) entre elas, sendo uma das vantagens quando comparadas as análises univariadas, diminuindo o número de experimentos a serem realizados e estabelecendo as condições para a extração dos melhores resultados experimentais (KOLLA *et al.*, 2019).

Dentro das ferramentas utilizadas na quimiometria, o planejamento fatorial tem seu destaque, pois é uma ferramenta estatística simples e amplamente empregada na química, em diferentes amostras e com diferentes propósitos (SANTOS *et al.*, 2017). Na área das Ciências Farmacêuticas o planejamento fatorial é encontrado em estudos para determinação das melhores condições de dissolução de medicamentos (HENRÍQUEZ *et al.*, 2019; KOLLA *et al.*, 2019), na quantificação de metais em urina (SANTOS *et al.*, 2017), no desenvolvimento de formulações orais, de liberação imediata e prolongada, nasais, transdérmicas, cutâneas, oculares e injetáveis, nos controles de processo da indústria farmacêutica, avaliação de produtos genéricos e desenvolvimento de métodos analíticos para a quantificação de fármacos nas formas farmacêuticas (POLITIS *et al.*, 2017).

Para a realização de um planejamento fatorial é de fundamental importância a definição dos fatores que serão avaliados (variáveis independentes), estes fatores podem ser tanto qualitativos quanto quantitativos. O estabelecimento dos níveis que serão testados e a definição do resultado a ser comparado (variável dependente) também é relevante (KOLLA *et al.*, 2019). Com estas informações é possível realizar a representação do planejamento fatorial, que sendo em dois níveis será representado por  $2^k$ , em que 2 significa

o número de níveis e  $k$  o número de fatores a serem estudados. No caso de três níveis, o número 2 é substituído por 3 e tem-se a seguinte representação  $3^k$  (NOVAES *et al.*, 2016). Desta forma, um planejamento fatorial de 2 níveis e 3 fatores estudados, terá no mínimo, 8 ( $2^3$ ) experimentos.

O planejamento fatorial de dois níveis ( $2^k$ ) é particularmente útil nos estágios iniciais de um trabalho experimental, quando se têm muitas variáveis a se investigar (POLITIS *et al.*, 2017). Esse procedimento fornece o menor número de análises com os quais os  $k$  fatores podem ser estudados em um planejamento fatorial completo e, por esse motivo, esse planejamento é largamente usado em experimentos de varredura de fatores (NOVAES *et al.*, 2016). Com a definição dos níveis, estes são classificados como baixo e alto, e representados, por convenção, como (-1) e (+1), respectivamente (SANTOS *et al.*, 2017). Cabe salientar que na definição de mais de dois níveis ocorrerá uma nova classificação, de modo que se estabeleça uma nova convenção, e no estabelecimento de um ponto central, será designado como valor (0) (NOVAES *et al.*, 2016). A partir deste estabelecimento é construída a matriz de planejamento para a definição dos experimentos a serem realizados (Quadro 06).

**Quadro 06-** Matriz do planejamento fatorial completo  $2^3$  com 6 repetições do ponto central

Experimento	Variável 1	Variável 2	Variável 3
1	-1	-1	-1
2	+1	-1	-1
3	-1	+1	-1
4	+1	+1	-1
5	-1	-1	+1
6	+1	-1	+1
7	-1	+1	+1
8	+1	+1	+1
9 (C)	0	0	0
10 (C)	0	0	0
11 (C)	0	0	0
12 (C)	0	0	0
13 (C)	0	0	0
14 (C)	0	0	0

Legenda: C: ponto central  
 (-1): nível baixo  
 (+1): nível alto  
 (0): nível do ponto central

Com o estabelecimento da matriz a realização dos experimentos e a medida da variável analítica definida como resultado (variável dependente), pode-se efetuar os cálculos estatísticos para a definição do efeito principal de cada variável (por meio da diferença entre os resultados), o efeito total (somas dos resultados) e dos efeitos ocasionados pela interação destes fatores (diferença dos efeitos simples de cada variável) (SANTOS *et al.*, 2017). O *software Statistica*<sup>®</sup> é uma ferramenta disponível para a realização destes cálculos e geração de parâmetros de avaliação como o gráfico de Pareto e definição da significância estatística de cada variável e suas interações (NOVAES *et al.*, 2016).

### **3.8 Ensaios de controle de qualidade do alopurinol (comprimidos)**

A análise físico-química de um produto visa a qualificação e/ou quantificação de um ou mais componentes presentes na formulação (POLITIS *et al.*, 2017). Estes ensaios são de grande importância para a verificação tanto do processo de fabricação do produto, quanto das avaliações dos insumos farmacêuticos e materiais de embalagem que compõem o produto a ser comercializado (LOMBARDO; ESERIAN, 2017). Cabe destacar que de acordo com art. 14, da Resolução RDC 301/2019, os produtos acabados (medicamentos) devem possuir a composição, tanto quantitativa quanto qualitativa, em conformidade com o descrito no registro. As monografias das farmacopeias informam quais testes são necessários para cada fármaco. No geral tem-se os seguintes ensaios para formulações sólidas orais: ponto de fusão, ensaios de identificação, determinação de peso, desintegração, dureza, uniformidade de doses unitárias, friabilidade, ensaios de pureza, doseamento e dissolução (BRASIL, 2019b; BRASIL, 2019c).

Para o alopurinol, a Farmacopeia Brasileira (2019) não traz uma monografia para o insumo farmacêutico ativo; apenas existe a monografia para comprimidos, com os seguintes testes físicos: identificação, determinação de peso, teste de dureza, teste de friabilidade, teste de desintegração, uniformidade de doses unitárias, teste de dissolução e doseamento (BRASIL, 2019c). Já, a Farmacopeia Americana (2019) possui tanto a monografia para o insumo farmacêutico ativo quanto para o produto acabado (comprimidos). Para o primeiro são descritos os ensaios de identificação, ensaios de pureza: perda por dessecação e substâncias relacionadas, e doseamento. Já para o segundo, os ensaios são os mesmos encontrados no compêndio oficial brasileiro (Quadro 07) (USP, 2019).

**Quadro 07-** Métodos empregados para os ensaios de identificação, pureza, dissolução e doseamento de alopurinol encontrados nas Farmacopeias Brasileira (2019) e Americana (USP, 2019).

Ensaio	Farmacopeia Brasileira (2019)	Farmacopeia Americana (USP, 2019)
Identificação (Insumo farmacêutico ativo)	Espectrofotometria de absorção no ultravioleta (200 nm a 350 nm); <b>ou</b> Espectrofotometria de absorção no infravermelho	Espectrofotometria de absorção no infravermelho
Pureza	Cromatografia líquida de alta eficiência; Fase estacionária: coluna C18 (250 mm X 4,6 mm X 5,0 µm); Fase móvel: Eluente A: mistura de um volume de álcool metílico e nove volumes de fosfato de potássio monobásico a 0,125% (p v <sup>-1</sup> ); Eluente B: mistura de 3 volumes de álcool metílico com sete volumes de fosfato de potássio monobásico a 0,125% (p v <sup>-1</sup> ); Fluxo: 1,0 mL min <sup>-1</sup> ; Detecção: 230 nm; Tempo de corrida: 30 minutos	Cromatografia líquida de alta eficiência; Fase estacionária: coluna C18 (250 mm X 4,6 mm X 5,0 µm); Fase móvel: Eluente A: solução aquosa de fosfato de potássio monobásico 0,125% (p v <sup>-1</sup> ); Eluente B: metanol; Fluxo: 1,8 mL min <sup>-1</sup> ; Detecção: 230 nm; Tempo de corrida: 35 minutos
Dissolução (Produto acabado)	Espectrofotometria de absorção no ultravioleta (250 nm); Meio de dissolução: 900 mL de HCl 0,01 mol L <sup>-1</sup> ; Aparato: pá; Rotação: 75 rpm; Tempo: 45 minutos	Espectrofotometria de absorção no ultravioleta (250 nm); Meio de dissolução: 900 mL de HCl 0,01 mol L <sup>-1</sup> ; Aparato: pá; Rotação: 75 rpm; Tempo: 45 minutos
Doseamento	Espectrofotometria de absorção no ultravioleta (250 nm); Solvente: 0,1 mol L <sup>-1</sup>	Cromatografia líquida de alta eficiência Fase estacionária: coluna C18 (250 mm X 4,6 mm X 5,0 µm); Fase móvel: Eluente A: solução aquosa de fosfato de potássio monobásico 0,125% (p v <sup>-1</sup> ); Eluente B: metanol; Fluxo: 1,8 mL min <sup>-1</sup> ; Detecção: 230 nm; Tempo de corrida: 35 minutos

Fonte: Farmacopeia Brasileira (2019); USP (2019)

### 3.8.1 Características organolépticas de alopurinol (comprimidos)

Os ensaios para averiguação das características são realizados a partir da comparação entre a descrição da especificação e a observação dos aspectos visuais: aspecto e cor, olfativos, gustativos e o tato (BRASIL, 2019c).

### 3.8.2 Ensaio de identificação de alopurinol (comprimidos)

Os ensaios de identificação são utilizados para verificar a identidade do material que está em exame (BRASIL, 2019c). É realizado tanto no insumo farmacêutico ativo quanto no produto acabado para comparação dos achados com o descrito na rotulagem do produto (USP, 2019). Estes são considerados específicos e podem aferir, com um nível de certeza aceitável, a presença da substância pesquisada, mas não podem ser utilizados como prova absoluta de identidade, sendo necessário a execução de outros testes para tal fato, porém, o não cumprimento deste teste já é suficiente para afirmar que existe um erro de rotulagem do produto (BRASIL, 2019c). São considerados ensaios de identificação para o insumo farmacêutico ativo: as características organolépticas, como o aspecto visual e coloração, polarimetria, pH e ponto de fusão (BRASIL, 2019c; USP, 2019).

A Farmacopeia Brasileira (2019) descreve dois ensaios de identificação que podem ser realizado: empregando a espectrofotometria de absorção no ultravioleta (200 nm a 350 nm) ou espectrofotometria de absorção no infravermelho dispersos em pastilha de brometo de potássio (KBr), são realizadas as comparações entre as intensidades de absorvância da solução preparada com substância química de referência e a solução preparada contendo a amostra a ser identificada (BRASIL, 2019c). Na Farmacopeia Americana (2019) encontra-se apenas a alternativa da espectrofotometria de absorção no infravermelho utilizando pastilhas de KBr para a identificação de alopurinol (USP, 2019).

### 3.8.3 Ensaio de pureza

Os ensaios de pureza visam identificar e quantificar as impurezas presentes na amostra comparando com os limites determinados nos compêndios oficiais (KOLLA *et al.*, 2019). São considerados ensaios de pureza os ensaios de metais pesados, cloretos, sulfatos, ferro, perda por dessecação e substâncias relacionadas (BRASIL, 2019c; USP, 2017).

A Farmacopeia Brasileira (2019) determina a realização do ensaio de substâncias relacionadas nos comprimidos de alopurinol empregando a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), provido de detector ultravioleta a 230 nm, utilizando como fase estacionária uma coluna C18 (250 mm X 4,6 mm X 5,0  $\mu\text{m}$ ), fase móvel: Eluente A: mistura de um volume de álcool metílico e nove volumes de fosfato de potássio monobásico a 0,125% (p v<sup>-1</sup>), e Eluente B: mistura de 3 volumes de álcool metílico com sete volumes de fosfato de potássio monobásico a 0,125% (p v<sup>-1</sup>), sendo eluídos durante 30 minutos em

gradiente linear a um fluxo de 1,0 mL min<sup>-1</sup>. Neste ensaio é possível a avaliação da presença, na solução padrão e na solução amostra, das seguintes impurezas: 5-amino-1H-pirazol-4-carboxamida, impureza A, 5-formilmino-1H-pirazol-4-carboxamida, impureza B, 5-(4H-1,2,4-triazol-4-il)-1H-pirazol-4-carboxamida, impureza C, etil 5-amino-1H-pirazol-4-carboxilato, impureza D e etil 5-(formilamino)-1H-pirazol-4-carboxilato, impureza E.

O ensaio de substâncias relacionadas, preconizado na Farmacopeia Americana (2019), tanto para o insumo farmacêutico ativo como para o produto acabado (comprimidos) também é realizado por CLAE com a mesma fase estacionária, porém a fase móvel difere daquela descrita na Farmacopeia Brasileira (2019); utiliza-se o Eluente A: solução aquosa de fosfato de potássio monobásico 0,125% (p v<sup>-1</sup>) e, Eluente B: metanol, com tempo de corrida de 35 minutos, num fluxo de 1,8 mL min<sup>-1</sup> e detecção em 230 nm. Além disso, é relatada uma sexta impureza a etil-(E/Z)-3-(2-carbetoxi-2-cianoetenil)amino-1H-pirazol-4-carboxilato, a impureza F (Quadro 08). Além deste ensaio, no insumo farmacêutico ativo, é necessária a determinação de umidade, através do método de perda por dessecação, tendo um limite máximo de < 0,5% de umidade (USP, 2019).

**Quadro 08** – Determinação de substâncias relacionadas no alopurinol, segundo a Farmacopeia Brasileira e Americana

Impureza	Nome	Farmacopeia Brasileira (2019)	Farmacopeia Americana (USP, 2019)
A	5-amino-1H-pirazol-4-carboxamida	X	X
B	5-formilmino-1H-pirazol-4-carboxamida	X	X
C	5-(4H-1,2,4-triazol-4-il)-1H-pirazol-4-carboxamida	X	X
D	etil 5-amino-1H-pirazol-4-carboxilato	X	X
E	etil 5-(formilamino)-1H-pirazol-4-carboxilato	X	X
F	etil-(E/Z)-3-(2-carbetoxi-2-cianoetenil)amino-1H-pirazol-4-carboxilato	-	X

X = necessidade de determinação / - = não há a necessidade de determinação

### 3.8.4 Determinação de peso em comprimidos de alopurinol

A determinação de peso é um teste farmacopeico, aplicado em formas farmacêuticas sólidas em dose unitária, como os comprimidos, acondicionadas em recipientes para dose unitária e, também, para formas farmacêuticas sólidas ou semissólidas acondicionadas em recipientes para múltiplas doses. Neste teste é possível verificar se as unidades de um

mesmo lote apresentam uniformidade de peso. Esta uniformidade é avaliada por meio do peso médio de 20 unidades de um lote e avaliada conforme os critérios definidos para a forma farmacêutica (Quadro 09) (BRASIL, 2019c; USP, 2019).

**Quadro 09-** Critérios de avaliação da determinação de peso para algumas formas farmacêuticas sólidas (comprimidos) em dose unitária.

<b>Formas farmacêuticas em dose unitária</b>	<b>Peso médio</b>	<b>Limites de variação</b>
Comprimidos não-revestidos ou revestidos com filme, comprimidos efervescentes, comprimidos sublinguais, comprimidos vaginais e pastilhas	80 mg ou menos	$\pm 10,0\%$
	mais que 80 mg e menos que 250 mg	$\pm 7,5\%$
	250 mg ou mais	$\pm 5,0\%$

**Fonte:** adaptado (BRASIL, 2019c)

Cabe destacar que é admitido no máximo 02 unidades testadas excedam os limites de variação, que para o alopurinol de 100mg de peso médio é  $\pm 7,5\%$  e para a apresentação de 300 mg, a variação de peso médio admitida é de  $\pm 5,0\%$ , esta tolerância só é permitida desde que nenhuma das unidades testadas esteja acima ou abaixo do dobro das porcentagens indicadas (BRASIL, 2019c).

### 3.8.5 Determinação de dureza em comprimidos de alopurinol

O teste de dureza é um teste informativo que determina a resistência dos comprimidos ao esmagamento ou ruptura, quando submetido a uma pressão radial (DE BRUM *et al.*, 2012; BRASIL, 2019c). Este teste é realizado, geralmente, em comprimidos sem revestimento, servindo de balizador da etapa de compressão dos comprimidos, uma vez que quanto maior for a dureza dos comprimidos menor será sua porosidade, e isto, terá um impacto nas etapas de desintegração e dissolução (ZAMAN *et al.*, 2016). A execução do teste é feita empregando um equipamento específico chamado de durômetro e seus resultados são expressos em Newton (N) (média das determinações) (USP, 2019). Cabe salientar que este teste, de acordo com a Farmacopeia Brasileira (2019), não possui mais obrigatoriedade de execução.

### 3.8.6 Determinação de friabilidade em comprimidos de alopurinol

O teste de friabilidade é utilizado para “determinar a resistência dos comprimidos a abrasão, sendo aplicado apenas, em comprimidos não revestidos. Com este teste é

possível avaliar a tendência dos comprimidos liberarem pós, nas suas embalagens primárias, racharem ou quebrarem” (BRASIL, 2019c). A friabilidade é um dos parâmetros utilizados pela indústria para a avaliação do comportamento do produto, nas mais diversas situações que podem acontecer durante o transporte do medicamento até a utilização pelo consumidor (BRASIL, 2019a). O desprendimento de pós pelos comprimidos pode levar consigo um quantitativo de fármaco e, por este motivo, a dose administrada será menor do que a declarada no rótulo do produto (ZAMAN *et al.*, 2016; BRASIL, 2019c).

### **3.8.7 Determinação do tempo de desintegração em comprimidos de alopurinol**

O teste de desintegração é utilizado para a determinação *in vitro* do processo de descompactação do pó presente na forma farmacêutica (DE BRUM *et al.*, 2012). *In vivo* esta descompactação é importante para deixar o fármaco disponível para ser absorvido pelas vilosidades do trato gastrointestinal e, posteriormente, distribuído pelo organismo. A execução do teste possibilita verificar se comprimidos e cápsulas se desintegraram dentro do limite de tempo determinado pelas Farmacopeias. Este estudo é realizado com seis unidades pertencentes ao mesmo lote que são submetidas à ação de uma aparelhagem específica (desintegrador) conforme condições definidas (BRASIL, 2019c; USP, 2019).

Para o alopurinol, o meio de desintegração recomendado tanto pela Farmacopeia Brasileira (2019) quanto a Farmacopeia Americana (2019) é água purificada (1.000 mL), envolto por um banho maria mantido com água a temperatura de  $(37 \pm 1) ^\circ\text{C}$ .

### **3.8.8 Uniformidade de doses unitárias em comprimidos de alopurinol**

O teste de uniformidade de doses unitárias é utilizado para avaliar a quantidade do insumo farmacêutico ativo presente nas unidades de forma farmacêutica de um determinado lote, podendo ser realizadas de modo individual (uniformidade de conteúdo) ou com base na estimativa, a partir do resultado do doseamento e dos pesos individuais, assumindo-se distribuição homogênea do componente ativo (variação de peso) (Quadro 10) (BRASIL, 2019c). Este teste é aplicado nas formas farmacêuticas: comprimidos, revestidos ou não, cápsulas, duras e moles, e sólidos e soluções acondicionados em recipientes para dose única.

Para os comprimidos de alopurinol o método a ser utilizado para a determinação da uniformidade de dose unitária é a variação de peso.

**Quadro 10** - Aplicação do método de Uniformidade de conteúdo (UC) ou de Variação de peso (VP) em comprimidos de acordo com a dose e proporção do fármaco.

Forma farmacêutica	Tipo	Dose e proporção do fármaco	
		Maior ou igual a 25 mg e maior ou igual a 25%	Menor a 25 mg ou menor a 25%
Comprimido	Não revestido	Variação de peso	Uniformidade de conteúdo
	Revestido	Variação de peso	Uniformidade de conteúdo

Fonte: BRASIL, 2019c

### 3.8.9 Doseamento de alopurinol (comprimidos)

O doseamento é um teste que visa quantificar o teor de substância ativa presente na amostra. Este teste é realizado tanto no insumo farmacêutico ativo quanto no produto acabado, sempre verificando a veracidade do que está declarado no rótulo (POLITIS *et al.*, 2017). Os métodos utilizados no doseamento podem ser clássicos (baseados em reações químicas), ou em técnicas analíticas mais sofisticadas (espectrofotometria e cromatografia) (ZAMAN *et al.*, 2016).

Na Farmacopeia Brasileira (2019) o doseamento do alopurinol é realizado empregando a técnica de espectrofotometria de absorção molecular, no comprimento de onda 250 nm, tendo como solvente a solução de HCl 0,1 mol L<sup>-1</sup>. Esta informa que os comprimidos de alopurinol devem possuir entre 93,0% a 107,0 % da quantidade declarada de alopurinol (C<sub>5</sub>H<sub>4</sub>N<sub>4</sub>O) (BRASIL, 2019c). Para a Farmacopeia Americana (2019) o teste é realizado utilizando a CLAE, tanto no insumo farmacêutico ativo quanto no produto acabado (comprimidos) tendo como fase estacionária: coluna C18 (250 mm X 4,6 mm X 5,0 µm), Fase móvel: eluente A: solução aquosa de fosfato de potássio monobásico 0,125% (p/v) e eluente B: metanol, com fluxo: 1,8 mL min<sup>-1</sup>, detecção em 230 nm e tempo de corrida de 35 minutos, tendo o limite de 98,0% a 102,0% da quantidade declarada de alopurinol (C<sub>5</sub>H<sub>4</sub>N<sub>4</sub>O) (USP, 2019). Insta salientar que doseamento com resultados abaixo ou acima dos limites determinados são capazes de retirar o medicamento do mercado (BRASIL, 2019c; USP, 2019).

### 3.9 Estudo de Degradação em medicamentos

Com o intuito de aprimorar o controle sobre os medicamentos, a ANVISA publicou a Resolução RDC Nº 53, de 04 de dezembro de 2015 que estabeleceu parâmetros para a

notificação, identificação e qualificação de produtos de degradação em medicamentos com substâncias ativas sintéticas e semissintéticas, classificados como novos, genéricos e similares. Esta resolução definiu parâmetros para a verificação de produtos oriundos da degradação dos constituintes das formas farmacêuticas e, a necessidade de elaboração do perfil de degradação dos produtos formados ao longo do prazo de validade do medicamento (BRASIL, 2015).

Para a elaboração deste perfil de degradação, faz-se necessário o desenvolvimento de testes de degradação forçada, entendido como o estudo que permite verificar a presença de produtos de degradação por meio da exposição do insumo farmacêutico ativo e produto acabado a condição de estresse, como por exemplo, luz, temperatura, calor, umidade, hidrólise ácida/ básica e oxidação, entre outras. Este estudo permite o desenvolvimento de métodos indicativos de estabilidade com seletividade adequada, bem como fornece informações acerca das possíveis rotas de degradação de um determinado produto (BRASIL, 2015; VENKATARAMAN; MANASA, 2018).

No Brasil, somente no ano de 2017, as indústrias produtoras de medicamentos movimentaram mais de R\$ 69 bilhões de reais com a venda de mais de 4,4 bilhões de medicamentos, nas mais diversas apresentações e classes farmacológicas (BRASIL, 2018). Com o intuito de cumprir o disposto na referida Resolução sem, no entanto, impactar no abastecimento do mercado farmacêutico, a ANVISA determinou um escalonamento desta exigência por classes farmacológicas, de modo que os medicamentos antigotosos deveriam apresentar seus testes de degradação até o dia 31 de dezembro de 2019 (BRASIL, 2017).

Foram encontrados, na literatura científica, dois estudos que tratavam do perfil de degradação de comprimidos contendo alopurinol (Quadro 11). O primeiro, de Singh e Gadhawala (2013) que tratou do desenvolvimento de um método indicativo de estabilidade por HPLC em fase reversa, para a determinação do alopurinol e seus produtos de degradação em dosagem sólida oral, no qual foi utilizada como fase estacionária a coluna C8 (50 mm X 4,6 mm X 1,8  $\mu\text{m}$ ) e fase móvel: a solução de dihidrogenofosfato de potássio 0,025 mol L<sup>-1</sup> pH 2,50 e metanol 95:5 (v v<sup>-1</sup>), com fluxo de 1 mL min<sup>-1</sup>, temperatura da coluna 25 °C e detecção em UV 230 nm. O segundo estudo, de Kharia, Vishwakarma e Singour (2018) desenvolveu um método empregando HPLC em fase reversa para o estudo de degradação forçada de comprimidos de alopurinol, para a estimativa das impurezas e dos produtos da degradação, utilizando como fase estacionária a coluna C18 (250 mm x

4,6 mm x 5,0  $\mu\text{m}$ ) e fase móvel: a solução aquosa de dihidrogenofosfato de potássio 0,00125 g L<sup>-1</sup>, com fluxo de 1,5 mL min<sup>-1</sup> e detecção no DAD.

**Quadro 11** - Métodos analíticos para a determinação dos compostos de degradação do alopurinol descritos na literatura

Objetivo do estudo	Técnica	Fase estacionária	Fase móvel	Método	Referência
Determinar alopurinol e produtos de degradação	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência	C8 (50 mm X 4,6 mm X 1,8 $\mu\text{m}$ )	solução padrão de dihidrogenofosfato de potássio 0,025 mol L <sup>-1</sup> pH 2,50 e metanol 95:5 (v v <sup>-1</sup> )	Fluxo: 1,0 mL min <sup>-1</sup> Temperatura: 25°C Detecção: 230 nm	SINGH; GADHAWALA, 2013
Determinar alopurinol e produtos de degradação	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência	C18 (250 mm X 4,6 mm X 5,0 $\mu\text{m}$ )	solução aquosa de dihidrogenofosfato de potássio 1,25 g	Fluxo: 1,5 mL min <sup>-1</sup> Temperatura: 8°C Detecção: ultravioleta	KHARIA; VISHWAKAMA; SINGOUR, 2018

Desta forma, é necessário o desenvolvimento de métodos que sejam capazes de quantificar o alopurinol, tanto o insumo farmacêutico ativo quanto o produto acabado, empregando as mais diversas formas de desenho de estudo, empregando a menor quantidade de reagentes e experimentos possíveis, sem afetar a qualidade do método. Estes métodos, por sua vez devem ser capazes de eliminar ou diminuir a utilização de solventes considerados tóxicos para o ambiente e, serem de fácil operação, se tornando uma ferramenta de verificação do controle de qualidade dos medicamentos comercializados, no Brasil e no mundo, contendo o insumo farmacêutico ativo alopurinol, menos tóxicas e contribuindo para que empresas e as agências regulatórias possam ter opções mais ambientalmente sustentáveis para a execução das análises.

## **4 MATERIAIS E MÉTODOS**

### **4.1 Substância Química de Referência**

A substância química de referência (SQR) utilizada para o desenvolvimento deste trabalho foi adquirida do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde da Fundação Oswaldo Cruz (INCQS/FIOCRUZ), órgão da esfera federal referendado pela ANVISA para a produção e comercialização das substâncias padrões da Farmacopeia Brasileira. A SQR alopurinol, lote 1086, foi estabelecida pela referida farmacopeia e oficializada pela Resolução RDC nº 80, de 30 de maio de 2016, possuindo como descrição: pó cristalino branco ou quase branco e teor declarado de 100,0% calculado em relação à substância dessecada e determinado por CLAE (BRASIL, 2016).

### **4.2 Forma farmacêutica comprimidos**

Para a realização de todos ensaios foram adquiridas amostras (comprimidos) de alopurinol (100 mg e 300 mg), referência e genéricos, conforme Lei Federal nº 9.787/1999, nas drogarias de Salvador e de Santo Amaro da Purificação/Bahia. As amostras foram devidamente codificadas e, relatados quais excipientes foram utilizados em cada formulação, a partir da análise das bulas dos medicamentos (Quadro 12).

### **4.3 Desenvolvimento do método, empregando a espectrofotometria de absorção molecular na região do ultravioleta, para a quantificação do alopurinol em comprimidos**

Foi preparada uma solução de SQR ( $5,0 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) em HCl  $0,001 \text{ mol L}^{-1}$ , uma solução contendo somente os excipientes dos medicamentos: lactose, amido, croscarmelose sódica, celulose microcristalina, macrogol, crospovidona, povidona, polivinilpirrolidona e estearato de magnésio) na concentração de 1% (p v<sup>-1</sup>) a que foi chamada de branco analítico e uma solução de SQR ( $5,0 \mu\text{g mL}^{-1}$  + branco analítico). Estas soluções foram submetidas ao espectrofotômetro (UV-2600, Shimadzu, Quioto, Japão) para realização da varredura na região do ultravioleta e visível (200 a 800 nm), para determinação do comprimento de onda de maior absorção e seletividade.

#### **4.3.1 Linearidade**

Para a determinação do intervalo de linearidade do método foram preparadas soluções, em triplicata, contendo a SQR nas concentrações (0,1; 0,2; 0,3; 0,4; 0,5; 0,6; 0,7;

0,8; 0,9 e 1,0  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) e submetidas ao equipamento para a realização das medidas. A seguir, os dados foram apresentados em representação gráfica (concentração da analito X absorvância), gerado o gráfico de dispersão dos resíduos, que fora devidamente avaliado estatisticamente, por meio do teste F, com nível de significância de 95%, e equação da reta de regressão de y em x, estimada pelo método dos mínimos quadrados e, por fim, a avaliação da associação linear entre as variáveis foi feita por meio do coeficiente de correlação (r) e de determinação ( $r^2$ ). Paralelamente, foi construída a curva de Ringbom com mesmo conjunto de dados, para determinar a faixa na qual a absorvância varia linearmente em relação a concentração de alopurinol.

**Quadro 12** – Relação de medicamentos adquiridos para a realização de todos ensaios.

Medicamento	Codificação	Produzido por	Lote	Validade	Excipientes
Zyloric® 100 mg comprimido	Z1	Aspen Pharma Indústria Farmacêutica Ltda	A873807	06/2023	lactose, amido, polivinilpirrolidona e estearato de magnésio
Alopurinol 100 mg comprimido, medicamento genérico	M1	Sanofi Medley Farmacêutica Ltda	9KP03737	02/2021	lactose monoidratada, amido, croscarmelose sódica e estearato de magnésio
Alopurinol 100 mg comprimido, medicamento genérico	S	Sandoz do Brasil Indústria Farmacêutica Ltda	JU4768	03/2021	celulose microcristalina, povidona, macrogol, crospovidona, talco, estearato de magnésio e celulose microcristalina
Zyloric® 300 mg comprimido	Z2	Aspen Pharma Indústria Farmacêutica Ltda	A868662	04/2021	lactose, amido, polivinilpirrolidona e estearato de magnésio
Alopurinol 300 mg comprimido, medicamento genérico	M2	Sanofi Medley Farmacêutica Ltda	9KP04723	03/2021	lactose monoidratada, amido, croscarmelose sódica e estearato de magnésio
Alopurinol 300 mg comprimido, medicamento genérico	P	Prati Donaduzzi & Cia Ltda	19C679	12/2021	lactose monoidratada, amido, povidona, croscarmelose sódica e ácido esteárico.

Fonte: rótulos e bulas dos medicamentos (2019; 2019; 2019; 2019)

### 4.3.2 Limite de detecção

Para a estimativa do limite de detecção foram analisadas 10 amostras do branco para o estabelecimento do desvio padrão entre essas medidas e realizado o cálculo, conforme determinação da ANVISA (BRASIL, 2017c).

Para a ANVISA o limite de detecção é calculado pela Equação 04:

$$\text{Limite de detecção (LD)} = 3,3 \sigma / \text{IC} \text{ (Equação 04)}$$

Onde: IC é a inclinação da curva de calibração  
 $\sigma$  = desvio padrão

Paralelamente, foi calculado o limite de detecção pelo método em parâmetros da curva analítica, utilizando a Equação 05.

$$\text{LD} = 2 \times \frac{S_y \times t}{\alpha_1} \times \sqrt{\left(\frac{1}{N}\right) + 1 + \frac{(y_c - \bar{y})^2}{\alpha_1^2 \times \sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}} \text{ (Equação 05)}$$

Onde:  $S_y$  é o desvio padrão calculado para o ajuste linear  
 $t$  é o parâmetro de student  
 $\alpha_1$  é o coeficiente angular da curva analítica  
 $N$  é o número de padrões de calibração utilizados na curva  
 $y_c$  é a resposta crítica ou limite crítico  
 $\bar{y}$  é a média dos sinais determinados  
 $x_i$  é a concentração do padrão  
 $\bar{x}$  é a média das concentrações do padrão

### 4.3.3 Limite de quantificação

Para a definição do limite de quantificação foram analisadas 10 amostras branco para o estabelecimento do desvio padrão entre essas medidas e realizado o cálculo, conforme determinação da ANVISA (BRASIL, 2017c).

Os cálculos do limite de quantificação definidos pela ANVISA são (Equação 06):

$$\text{Limite de quantificação (LQ)} = 10 \sigma / \text{IC} \text{ (Equação 06)}$$

Onde: IC é a inclinação da curva de calibração  
 $\sigma$  = desvio padrão

Paralelamente, foi calculado o limite de quantificação pelo método em parâmetros da curva analítica, utilizando a Equação 07.

$$LQ = \left( \frac{y_h - \alpha_0}{\alpha_1} \right) + \left( \frac{s_y \times t}{\alpha_1} \right) \times \sqrt{\left( \frac{1}{N} \right) + 1 + \frac{(y_h - \bar{y})^2}{\alpha_1^2 \times \sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}} \quad (\text{Equação 07})$$

Onde:  $y_h$  é o valor de  $y$  para a projeção da concentração no limite de controle superior.

$\alpha_0$  é o coeficiente linear da curva analítica

$\alpha_1$  é o coeficiente angular da curva analítica

$S_y$  é o desvio padrão calculado para o ajuste linear

$t$  é o parâmetro de student

$N$  é o número de padrões de calibração utilizados na curva

$\bar{y}$  é a média dos sinais determinados

$x_i$  é a concentração do padrão

$\bar{x}$  é a média das concentrações do padrão

#### 4.3.4 Precisão

Para a determinação da precisão por repetibilidade foram preparadas, em triplicata, soluções contendo a SQR nas concentrações (0,1; 0,4 e 0,8  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ). Estas soluções foram submetidas ao equipamento para leitura e realizado os cálculos do desvio padrão relativo, conforme equação 08:

$$DPR = \frac{100 S}{\bar{x}} \quad (\text{Equação 08})$$

Onde:  $S$  é o desvio padrão das medições

$\bar{x}$  é a concentração média determinada

#### 4.3.5 Exatidão

Para a determinação da exatidão foram preparadas, em triplicata, soluções contendo a SQR nas concentrações (0,1; 0,4 e 0,8  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) e, submetidas ao equipamento para a realização das leituras. Após este processo, os dados foram calculados usando a equação 09:

$$\text{Exatidão} = \text{concentração média experimental} / \text{concentração teórica} \times 100 \quad (\text{Equação 09})$$

#### 4.3.6 Faixa de trabalho

A definição da faixa de trabalho foi realizada após avaliação dos limites de detecção e quantificação, respeitando os dados da linearidade do método.

#### 4.3.7 Robustez

Foram preparadas soluções, em triplicata, da SQR nas concentrações (0,1; 0,4 e 0,8  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) e submetidas a leitura no espectrofotômetro UV-Vis (modelo 1240, Shimadzu, Kyoto, Japan) para a avaliação da robustez. A avaliação deste parâmetro foi realizada através do desvio padrão relativo da precisão.

#### 4.4 Desenvolvimento do método, empregando a cromatografia líquida de alta eficiência, para a quantificação do alopurinol em comprimidos

Para a definição das condições cromatográficas foram preparadas soluções contendo SQR alopurinol ( $1,0 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) utilizando como solvente: etanol P.A. (Quimex, Uberaba/MG, Brasil), HCl ( $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ ), NaOH ( $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ ) e metanol P.A. (Quimex, Uberaba/MG, Brasil), sendo as mesmas injetadas ( $20 \mu\text{L}$ ) no cromatógrafo (Shimadzu instrumentos científicos, Kyoto, Japão), equipado com bomba quaternária de alta pressão (Modelo LC-20AD), degaseificador (modelo DGU-20A5), detector de matriz de diodos (Modelo SPD-20A), amostrador automático (modelo SIL-20A), forno de aquecimento para coluna (modelo CTO-20A), módulo de comunicação (modelo CBM-20A), operado pelo software LCsolutions. Como fase estacionária, utilizou-se uma coluna C8 ( $150 \text{ mm X } 4,6 \text{ mm X } 5,0 \mu\text{m}$ ) (Shimadzu, Barueri/SP, Brasil) e, como fase móvel metanol e água ultrapura ( $50: 50, \text{ v v}^{-1}$ ) com a mistura entre os solventes, sendo realizada pelo próprio equipamento. Com a definição de qual meio ocorreu a melhor solubilização, então foi avaliada a composição da fase móvel (Quadro 13), aferido qual o fluxo apresentava melhor separação entre picos. De posse destes dados, foi injetada ( $20 \mu\text{L}$ ) uma solução contendo a substância química de referência (alopurinol, na concentração de  $1,0 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) + solução a 1% ( $\text{p v}^{-1}$ ) de excipientes, contidos na formulação dos comprimidos, para avaliação da seletividade, a saber: lactose, amido, croscarmelose sódica, celulose microcristalina, macrogol, crospovidona, povidona, polivinilpirrolidona e estearato de magnésio.

Cabe salientar que foram calculados os seguintes termos para avaliação da eficiência do processo cromatográfico. Tempo de retenção ( $T_r$ ), fator de retenção ( $k$ ), número de pratos teóricos ( $N$ ) e resolução cromatográfica ( $R$ ), a partir das Equações 10, 11 e 12:

$$K = \left( \frac{t_r - t_m}{t_m} \right) \text{ (Equação 10)}$$

Onde:  $t_r$ : tempo de retenção do alopurinol  
 $t_m$ : tempo do volume morto

$$N = 16 \times \left( \frac{t_r}{W_b} \right)^2 \text{ (Equação 11)}$$

onde:  $W_b$  é a largura da base do pico cromatográfico do ativo

$$R = \frac{2\Delta t}{(t_{w1} + t_{w2})} \text{ (Equação 12)}$$

Onde:  $\Delta t$  é a diferença do tempo de retenção entre o alopurinol e fase móvel  
 $t_{w1}$  largura da base do pico do alopurinol  
 $t_{w2}$  largura da base do pico da fase móvel

Para a continuidade do processo de validação do método cromatográfico foram determinadas as seguintes figuras de mérito: precisão, exatidão, limite de detecção, limite de quantificação e faixa linear de trabalho, utilizando os mesmos métodos descritos nos itens 4.3.1 a 4.3.6 e robustez do método.

**Quadro 13** - Estudo de composição da fase móvel para a determinação de alopurinol em comprimidos.

Composição da fase móvel
Etanol, água ultrapura (50: 50 v v <sup>-1</sup> )
Etanol, água ultrapura (70: 30 v v <sup>-1</sup> )
HCl 0,1 mol L <sup>-1</sup> , água ultrapura (50: 50 v v <sup>-1</sup> )
Etanol, HCl 0,1 mol L <sup>-1</sup> (50: 50 v v <sup>-1</sup> )
HCl 0,1 mol L <sup>-1</sup> , etanol, água ultrapura (25: 50: 25 v v <sup>-1</sup> v <sup>-1</sup> )

#### 4.4.1 Robustez

Para a avaliação da robustez foi realizada a variação do fluxo da fase móvel (0,6; 0,7; 0,8 e 0,9 mL min<sup>-1</sup>), sendo aplicado o desvio padrão relativo da precisão para avaliar as variações oriundas desta mudança de fluxo.

#### 4.5 Ensaios de dissolução de comprimidos de alopurinol 100 mg e 300 mg

Para os ensaios de dissolução (teste e perfis) de alopurinol em comprimidos foi realizado um planejamento fatorial completo 2<sup>3</sup>, com 6 pontos centrais, tendo como variáveis estudadas: a concentração do meio de dissolução (HCl 0,1; 0,01 e 0,001 mol L<sup>-1</sup>), em um volume de 900 mL; a velocidade de rotação do dissolutor (Ethik, Modelo 299, Vargem Grande Paulista, SP, Brasil) (50, 75 e 100 rpm); e, o tipo de aparato [tipo 1 (cesta) e tipo 2 (pá)], durante o período de 45 minutos, a (37 ± 1) °C. Posteriormente, foi retirada uma alíquota de 10 mL e realizada diluição até concentração pertencente a faixa de trabalho, definidas nos processos de validações dos métodos, com reposição do volume, na mesma temperatura, extraído (10 mL). Os Quadros 14 e 15 apresentam as variáveis, níveis e o planejamento fatorial propostos.

**Quadro 14** - Variáveis e níveis utilizados no planejamento experimental

Variáveis	Níveis		
	-1	0	1
Rotação (rpm)	50	75	100
[HCl] (mol L <sup>-1</sup> )	0,001	0,01	0,1
Aparato	cesta	Cesta ou pá	pá

**Quadro 15** - Planejamento fatorial completo 2<sup>3</sup> com 6 repetições do ponto central

Experimento	rpm	[HCl]	aparato
1	-1(50)	-1(0,001)	-1(cesta)
2	+1(100)	-1(0,001)	-1(cesta)
3	-1(50)	+1(0,1)	-1(cesta)
4	+1(100)	+1(0,1)	-1(cesta)
5	-1(50)	-1(0,001)	+1(pá)
6	1(100)	-1(0,001)	+1(pá)
7	-1(50)	+1(0,1)	+1(pá)
8	+1(100)	+1(0,1)	+1(pá)
9 (C)	0(75)	0(0,01)	0(cesta)
10 (C)	0(75)	0(0,01)	0(cesta)
11 (C)	0(75)	0(0,01)	0(cesta)
12 (C)	0(75)	0(0,01)	0(pá)
13 (C)	0(75)	0(0,01)	0(pá)
14 (C)	0(75)	0(0,01)	0(pá)

C: ponto central

Posteriormente, os comprimidos de alopurinol (Z1, Z2, M1, M2, S e P) foram submetidos ao dissolutor para o estudo dos perfis de dissolução, conforme as condições otimizadas do método de dissolução do medicamento alopurinol em comprimidos, descritas na seção 5.3, 900 mL de HCl 0,001 mol L<sup>-1</sup>; 75 rpm e aparato tipo 2 (pá). Foram coletadas alíquotas de 10 mL nos tempos: 0, 1, 3, 5, 10, 15, 20, 30, 40, 45, 60, 75 e 90 minutos, sendo realizada a reposição do volume retirado com 10 mL de HCl 0,001 mol L<sup>-1</sup>. Essas alíquotas foram devidamente filtradas com filtro de papel quantitativo (Prolab, Jardim Aeroporto, São Paulo/SP, Brasil) e diluídas com o mesmo solvente até concentração dentro da faixa linear de trabalho. Em seguida, foram realizadas leituras no espectrofotômetro de absorção molecular em 249 nm. Ainda, foram realizadas retiradas de 2 mL da solução, filtradas com filtro Politetrafluoretileno (PTFE) de 0,45µm (*Agilent Technologies*, Califórnia, Estados Unidos da América) e injetadas (20 µL) no cromatógrafo líquido de alta eficiência, também

nas condições já otimizadas (Tabela 03) para quantificação do alopurinol nos produtos acabados.

De posse desses resultados, foi calculada a porcentagem de dissolução do fármaco, em cada tempo, obtendo-se, assim, os perfis de dissolução entre os medicamentos que foram comparados por meio do método baseado na ANOVA (fatores:  $f_1$  e  $f_2$ ), método modelo dependente (definição dos modelos de ordem zero e primeira ordem) com construção dos gráficos de relação tempo (minutos) versus quantidade de alopurinol não dissolvida e tempo (em minutos) versus logaritmo neperiano da porcentagem de alopurinol não dissolvido, com estabelecimento de coeficiente de correlação ( $r$ ), determinação da constante de velocidade de dissolução ( $k$ ), meia-vida de dissolução ( $t_{50\%}$ ) e quantidade dissolvida de alopurinol após 45 minutos do início do ensaio de dissolução ( $Q_{45}$ ) e, também calculada a eficiência de dissolução (ED%), conforme equações 13 e 14.

$$t_{50\%} = \frac{0,693}{k} \quad (\text{Equação 13})$$

Onde,  $k$  é constante de velocidade de dissolução

$$ED = \frac{ASC_{(0-45)}}{ASC_{TR}} \times 100\% \quad (\text{Equação 14})$$

Onde,  $ASC_{(0-45)}$  é área sob a curva de dissolução do alopurinol ocorrida entre o tempo 0 e 45 minutos

$ASC_{TR}$  é a área sob a curva total de dissolução do alopurinol

## 4.6 Ensaio de controle de qualidade do alopurinol (comprimidos)

### 4.6.1 Características organolépticas

Alíquotas da SQR e de comprimidos contendo alopurinol foram retiradas e avaliadas quanto a descrição do aspecto visual e conformidade com a descrição presente no laudo de análise no caso da SQR e, das bulas, no caso dos comprimidos. Além desta análise visual, foi determinado com o auxílio de uma régua, o diâmetro de comprimidos de alopurinol (Z1, Z2, M1, M2, S e P).

#### **4.6.2 Determinação de peso em comprimidos de alopurinol**

Para a execução deste teste foram pesados, individualmente, 20 comprimidos de cada medicamento estudado (Z1, Z2, M1, M2, S e P), com auxílio de uma balança analítica (ALC/210.4, Sartorius – Goettingen, Alemanha). Em seguida, foi calculada a média dos pesos e, posteriormente, o desvio padrão relativo, sendo este confrontado com o limite definido na Farmacopeia Brasileira (2019) que, estabelece para os comprimidos com peso médio de 100 mg, os limites de variação de  $\pm 7,5\%$  e para os comprimidos com peso médio de 300 mg os limites  $\pm 5,0\%$ . Cabe destacar que é considerado aprovado no teste o lote do medicamento que tenha, no máximo, duas unidades entre as 20 fora do limite especificado, desde que nenhuma esteja acima ou abaixo do dobro das porcentagens indicadas.

#### **4.6.3 Determinação de friabilidade em comprimidos de alopurinol**

Vinte comprimidos de alopurinol foram pesados, com auxílio de uma balança analítica (ALC/210.4, Sartorius – Goettingen, Alemanha) e submetidos ao friabilômetro (Ethik, Modelo HX 300-2, Vargem Grande Paulista, SP, Brasil) com velocidade de 25 rpm durante 4 minutos. Após este período, foram observadas a presença de comprimidos quebrados, lascados, rachados ou partidos. Os pós foram removidos e os comprimidos foram pesados novamente. Com a diferença de pesos foi calculado o percentual de perda e, comparado com o valor estabelecido na Farmacopeia Brasileira (no máximo,  $< 1,5\%$  de perda) (BRASIL, 2019c).

#### **4.6.4 Determinação do tempo de desintegração em comprimidos de alopurinol**

Foram introduzidos 06 comprimidos de cada medicamento testado em cada um dos orifícios da cesta do desintegrador (Nova Ética, Modelo 301/AC01, Vargem Grande Paulista, SP, Brasil) para realização do teste. Em seguida, os comprimidos foram submetidos ao equipamento para realização do teste em meio de água purificada (1.000 mL) em temperatura de  $(37 \pm 1) ^\circ\text{C}$  por 30 minutos. Os comprimidos foram movimentados em posição vertical, pelo braço mecânico do aparelho, num ciclo de subida e descida, sem deixar de ter contato com o referido banho, para simular a movimentação peristáltica. Durante este período foi verificado o tempo necessário para a desintegração dos comprimidos.

#### 4.6.5 Uniformidade de doses unitárias em comprimidos de alopurinol

Foram pesados, com o auxílio de uma balança analítica (ALC/210.4, Sartorius – Goettingen, Alemanha) 10 comprimidos de cada medicamento analisado (Z1, Z2, M1, M2, S e P), em seguida, pulverizados. Deste, foram pesados, em triplicata, quantidades de pó equivalente a 100 mg de alopurinol e transferido para um balão de 100 mL. Em seguida, foram adicionados 20 mL de solução NaOH 0,001 mol L<sup>-1</sup> com posterior agitação, em mesa agitadora por 15 minutos. Após este tempo, o volume do balão foi completado com água e homogeneizado, sendo filtrado, diluído até concentração dentro da faixa de trabalho e submetidos as análises espectrofotométricas e cromatográficas.

Após a quantificação, foram correlacionados os valores encontrados com os pesos individuais de cada comprimido, estimando a quantidade de insumo farmacêutico ativo presente em cada unidade e sua relação percentual com base na quantidade declarada de cada rótulo dos medicamentos, usando a equação 15:

$$X_i = p_i \times A/P \text{ (Equação 15)}$$

Em que,  $X_i$ : quantidades individuais estimadas

$p_i$ : massas individuais das unidades testadas

A: quantidade de alopurinol, expressa em porcentagem da quantidade declarada

P: peso médio das unidades utilizadas no doseamento

Além destes cálculos, foram definidos os valores de aceitação (VA), empregando a equação 16, conforme preconizado pela Farmacopeia Brasileira (2019).

$$VA = ks$$

Em que, k: constante de aceitabilidade, cujo valor é 2,4 (Equação 16)

s: desvio padrão da amostra

#### 4.6.6 Doseamento de alopurinol (comprimidos)

Foram pesados 20 comprimidos, com o auxílio de uma balança analítica (ALC/210.4, Sartorius – Goettingen, Alemanha) de cada medicamento analisado e pulverizados. Deste, foram pesadas quantidades de pó equivalente a 100 mg de alopurinol e transferido para um balão de 100 mL. Em seguida, foram adicionados 20 mL de solução NaOH 0,001 mol L<sup>-1</sup> com posterior agitação, em mesa agitadora por 15 minutos. Após este tempo, o volume do balão foi completado com água e homogeneizado, sendo filtrado e diluído até concentração dentro da faixa linear de trabalho. O mesmo procedimento foi realizado com a SQR e as soluções foram submetidas a espectrofotometria e cromatografia para quantificação do fármaco.

## 4.7 Estudos de Degradação em medicamentos

Para a execução do estudo de degradação foi realizado os procedimentos para a hidrólise ácida, hidrólise básica, degradação por oxidação e degradação térmica, conforme o estudo de Blessy e colaboradores (2014).

### 4.7.1 Hidrólise ácida

Foram preparadas soluções da SQR e dos medicamentos (Z1, Z2, M1, M2, S e P) na concentração  $0,5 \mu\text{g mL}^{-1}$  utilizando o solvente HCl  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ . A solução foi submetida a estufa (Nova Ética, Modelo 515, Vargem Grande Paulista, SP, Brasil) a  $60 \text{ }^\circ\text{C}$  por 5 dias com retirada de alíquotas de 5 mL nos dias 1, 3 e 5. As alíquotas foram devidamente neutralizadas com solução de NaOH  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ , filtradas em filtros PTFE de  $0,45\mu\text{m}$  (*Agilent Technologies*, Califórnia, Estados Unidos da América) e submetidas as análises cromatográficas.

### 4.7.2 Hidrólise básica

Foram preparadas soluções da SQR e dos medicamentos (Z1, Z2, M1, M2, S e P) na concentração  $0,5 \mu\text{g mL}^{-1}$  utilizando o solvente NaOH  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ . A solução foi submetida a estufa (Nova Ética, Modelo 515, Vargem Grande Paulista, SP, Brasil) a  $60 \text{ }^\circ\text{C}$  por 5 dias com retirada de alíquotas de 5 mL nos dias 1, 3 e 5. As alíquotas foram devidamente neutralizadas com solução de HCl  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ , filtradas em filtros PTFE de  $0,45\mu\text{m}$  (*Agilent Technologies*, Califórnia, Estados Unidos da América) e submetidas as análises cromatográficas, conforme método desenvolvido.

### 4.7.3 Degradação por oxidação

Foram preparadas soluções da SQR e dos medicamentos (Z1, Z2, M1, M2, S e P) na concentração  $0,5 \mu\text{g mL}^{-1}$  utilizando  $\text{H}_2\text{O}_2$  3% ( $v v^{-1}$ ). A solução foi submetida a estufa (Nova Ética, Modelo 515, Vargem Grande Paulista, SP, Brasil) a  $60 \text{ }^\circ\text{C}$  por 5 dias com retirada de alíquotas de 5 mL nos dias 1, 3 e 5. As alíquotas foram devidamente filtradas em filtros PTFE de  $0,45\mu\text{m}$  (*Agilent Technologies*, Califórnia, Estados Unidos da América) e submetidas as análises cromatográficas, conforme método desenvolvido.

#### **4.7.4 Degradação térmica**

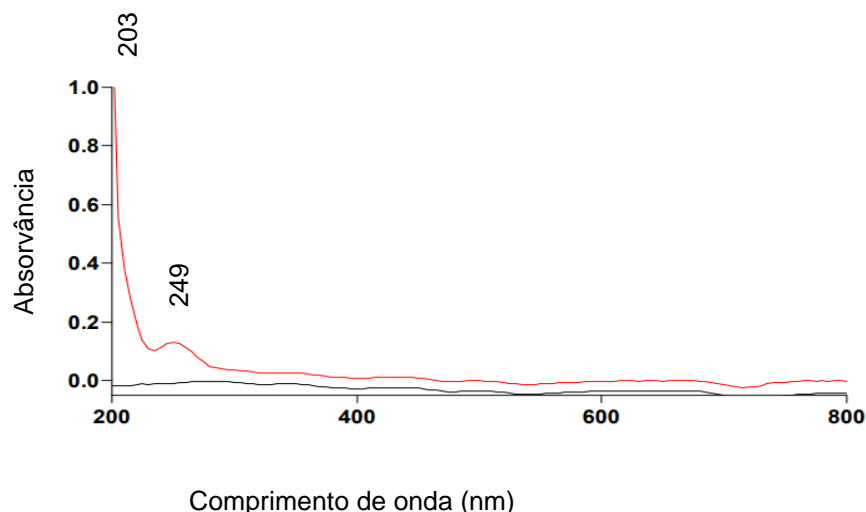
Foram pesadas amostras com quantidades equivalentes a 300 mg da SQR e dos medicamentos (Z1, Z2, M1, M2, S e P) e submetidas a estufa (Nova Ética, Modelo 515, Vargem Grande Paulista, SP, Brasil), a temperatura de 80 °C por 5 dias, com realização de pesagem nos dias 1, 3 e 5 para quantificação do teor de alopurinol. Para esta quantificação foi utilizado o método cromatográfico desenvolvido neste estudo.

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 Desenvolvimento do método, empregando espectrofotometria de absorção molecular na região do ultravioleta, para quantificação do alopurinol em comprimidos

As soluções de concentração  $5,0 \mu\text{g mL}^{-1}$  (SQR e SQR + branco) tendo como solvente HCl  $0,001 \text{ mol L}^{-1}$  exibiram absorção nos comprimentos de onda de 203 nm e 249 nm (Figura 06). Estes máximos de comprimento de onda também foram observados por Lago, Pereira e Bertol (2012), em sua análise das propriedades micromeríticas do alopurinol em 04 insumos farmacêuticos ativos, fabricados na China e utilizados por farmácias de manipulação de Passo Fundo/RS. Inicialmente, foi proposto estudo do método tendo como ponto de partida estes dois comprimentos de onda. Cabe salientar que as Farmacopeias Brasileira (2019) e Americana (2019) definem que as determinações de alopurinol devem ser realizadas em comprimento de onda de 250 nm, valor divergente do comprimento de onda 203 nm e próximo ao 249 nm.

**Figura 06-** Espectro de varredura de absorção molecular UV Vis do alopurinol



Após a seleção do meio de dissolução (HCl  $0,001 \text{ mol L}^{-1}$ ) e do comprimento de onda (249 nm) as outras figuras de mérito foram determinadas (Tabela 01 e Figura 07).

Neste aspecto, foi investigada, inicialmente, a figura de mérito linearidade para os dois comprimentos de onda 203 nm e 249 nm. Entretanto, no comprimento de onda 203

não foi possível aferir a linearidade do método, devido à instabilidade do pico, tendo, em alguns momentos, o pico encontrado ultrapassado os limites de linearidade da Lei de Lambert- Beer, mesmo com diluições cada vez maiores das soluções. E, por este motivo, as investigações passaram a ser realizadas com o comprimento de onda 249 nm. Neste comprimento de onda foi possível, avaliar a seletividade, uma vez que, neste comprimento de onda, foi capaz de quantificar o alopurinol na solução padrão ( $0,20 \mu\text{g mL}^{-1}$ ), na solução padrão adicionada dos excipientes e nos comprimidos sem interferências, demonstrando que não há efeito de matriz (Figura 07).

Cabe destacar que Ammar e colaboradores (2011) ao formularem, caracterizarem e avaliarem os comprimidos de alopurinol no Egito; Kumar e colaboradores (2016) ao formular e avaliar comprimidos de liberação imediata de alopurinol na Índia; Moghal e colaboradores (2016), que fabricaram e avaliaram *in vitro* comprimidos de dissolução rápida de alopurinol usando croscarmelose sódica, glicolato de sódio e crospovidona como superdesintegrantes em Bangladesh; e Smetiskoa e Miljanic (2017) que realizaram o teste de dissolução de comprimidos produzidos na Croácia também empregaram, nos seus métodos, a técnica espectrofotométrica no comprimento de onda 250 nm, com solvente HCl em concentrações que variaram de  $0,01$  a  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ . Todos estes estudos possuíam, no mínimo, um dos excipientes encontrados nos medicamentos utilizados no presente estudo e, foi constatado que a presença destes não afetou o sinal analítico do alopurinol, neste comprimento de onda.

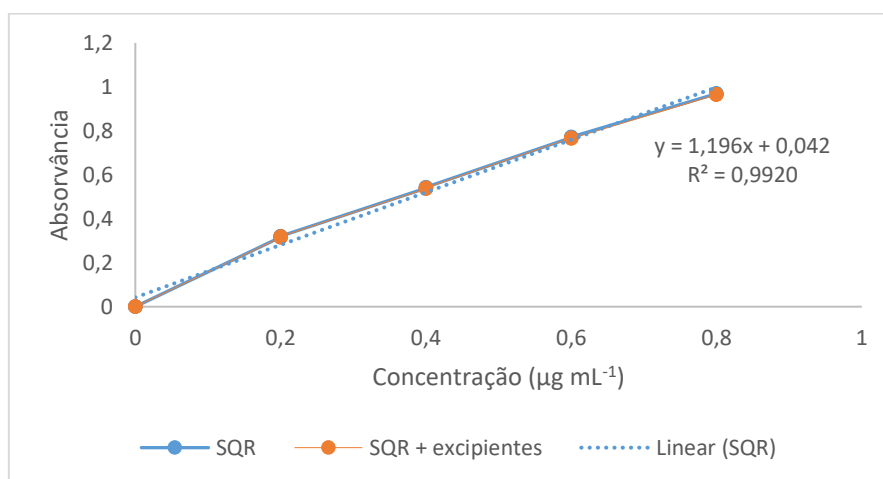
Já, Alghadi e Hamedelniei (2017) ao realizarem o estudo de biossenção em sete medicamentos genéricos de alopurinol (100 mg) comercializados no Sudão utilizaram, para as suas determinações, os comprimentos de onda 242 nm e 215nm, sendo que no primeiro comprimento de onda, os solventes utilizados foram HCl  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  e tampão acetato pH 4,5 e, no segundo comprimento de onda foi usado o tampão fosfato pH 6,8. Kumar e Basava Rao (2016), também empregaram o tampão fosfato para a determinação de alopurinol em comprimidos de dissolução rápida em Telangana, Índia e, neste caso, o comprimento de onda utilizado para a determinação foi 262 nm, diferindo do estudo citado anteriormente.

A Tabela 01 reúne os parâmetros de validação analítica do método proposto, empregando espectrofotometria de absorção molecular na região do ultravioleta, para quantificação do alopurinol em comprimidos e insumo farmacêutico ativo.

**Tabela 01-** Validação do método de determinação do alopurinol comprimidos empregando espectrofotometria de absorção molecular na região do ultravioleta

Condições		
Meio de dissolução	HCl 0,001 mol L <sup>-1</sup>	
Comprimento de onda	249 nm	
Figuras de mérito	Valores ANVISA	Valores IUPAC
Exatidão (%)	99,61- 99,86	99,69 – 99,92
Precisão (DPR, %)	< 0,70	< 0,70
Limite de detecção, em µg mL <sup>-1</sup>	0,08	0,07
Limite de quantificação, em µg mL <sup>-1</sup>	0,24	0,19
Equação da reta	$y = 1,196x + 0,0042$	$y = 1,108x - 0,0036$
Coefficiente de correlação (r)	0,9960	0,9966
Coefficiente de determinação (r <sup>2</sup> )	0,9920	0,9933
Faixa de trabalho, em µg mL <sup>-1</sup>	0,25 - 0,80	0,20 – 0,80
Robustez (DPR, %)	<0,80	<0,80

**Figura 07-** Equação da reta da curva analítica do alopurinol empregando espectrofotometria de absorção molecular no ultravioleta

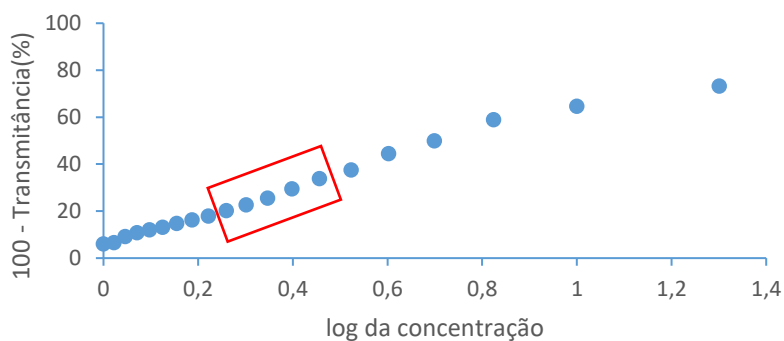


Os dados apresentados para as figuras de mérito estão de acordo com o preconizado na Resolução RDC 166/2017, que trata de validação de métodos analíticos determinada pela ANVISA. Ademais, também atenderam aso requisitos estabelecidos pela IUPAC. Desta forma, este método poderá ser utilizado na prática laboratorial para a

determinação de alopurinol (SQR e comprimidos), conforme a sequenciamento procedimental. Métodos validados resultam em resultados confiáveis e reprodutíveis, de modo que outro analista e/ou outro laboratório possam executá-lo (KOLLA, *et al.*, 2019; BARACHE *et al.*, 2017; OLIVIERE, 2015).

Adicionalmente, para a avaliação do erro fotométrico no método espectrofotométrico na determinação de alopurinol, a curva de Ringbom foi construída (Figura 08) e revelou o menor erro fotométrico nas concentrações de (0,30 a 0,55  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ). Os limites de detecção e quantificação diferiram, em valores, nas determinações pela ANVISA e IUPAC, mas não foram estatisticamente significantes quando os dados foram submetidos a ANOVA.

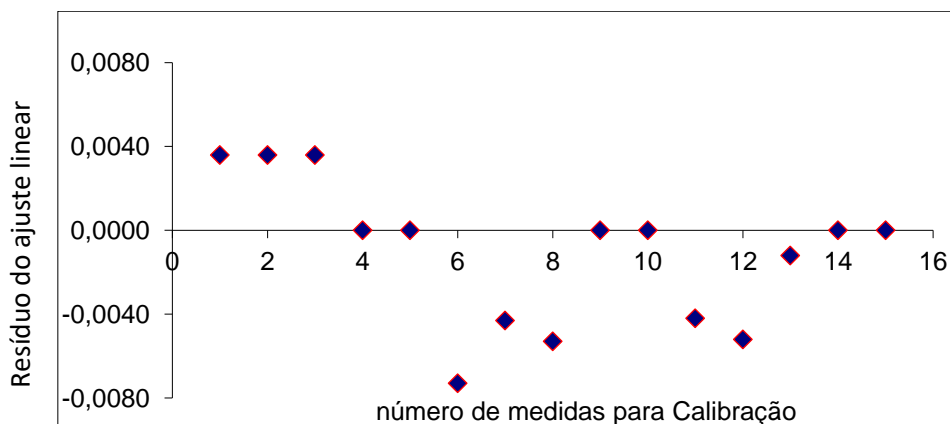
**Figura 08** – Curva de Ringbom para a determinação do intervalo linear do método espectrofotométrico para a determinação de alopurinol



Neste mesmo contexto, foi realizada a análise do gráfico de resíduos oriundo das curvas de linearidade para a verificação da dispersão dos resíduos (Figura 09) e, os mesmos apresentaram homocedasticidade, ou seja, os resíduos estão normalmente distribuídos.

A determinação das figuras de mérito de um método desenvolvido é de fundamental importância, uma vez que sem a devida análise estatística, o método proposto não terá a aplicabilidade, o que é essencial para demonstrar que os resultados encontrados são os dados mais próximos ao real e que a execução repetida do teste levará a resultados confiáveis (CAZEDEY; SALGADO, 2014).

**Figura 09** - Avaliação dos resíduos gerados no processo de construção da curva analítica para a determinação de alopurinol por espectrofotometria de absorção molecular na região UV.

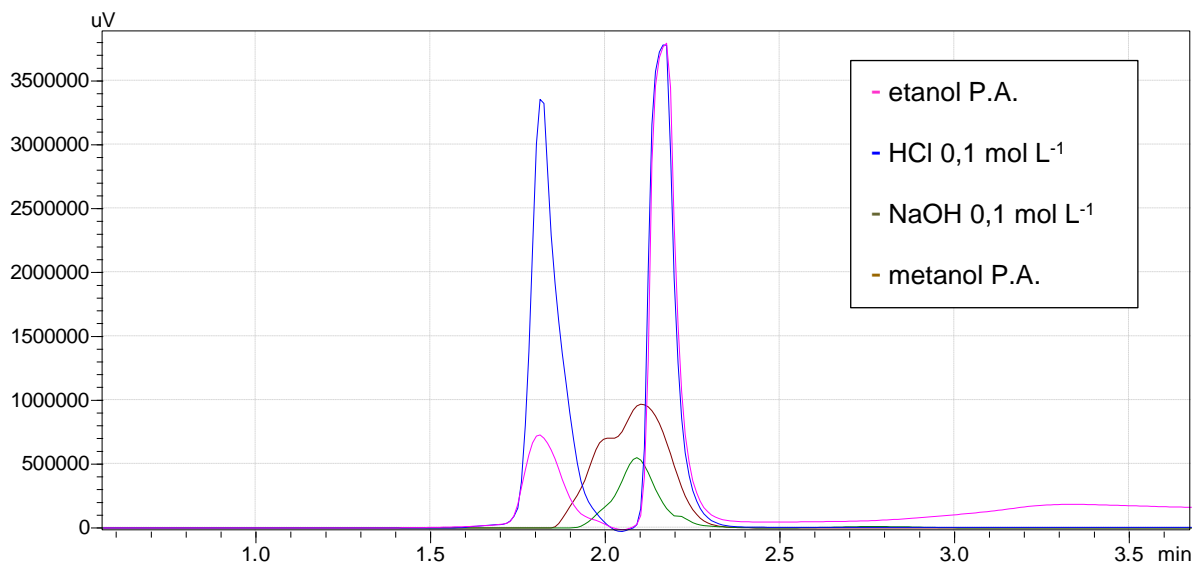


Diante destes resultados, o método espectrofotométrico de absorção molecular no ultravioleta proposto, nas condições meio de dissolução HCl 0,001 mol L<sup>-1</sup> e detecção em comprimento de onda 249 nm pode ser utilizado para a determinação de alopurinol, em SQR e comprimidos, respeitada a faixa linear de trabalho.

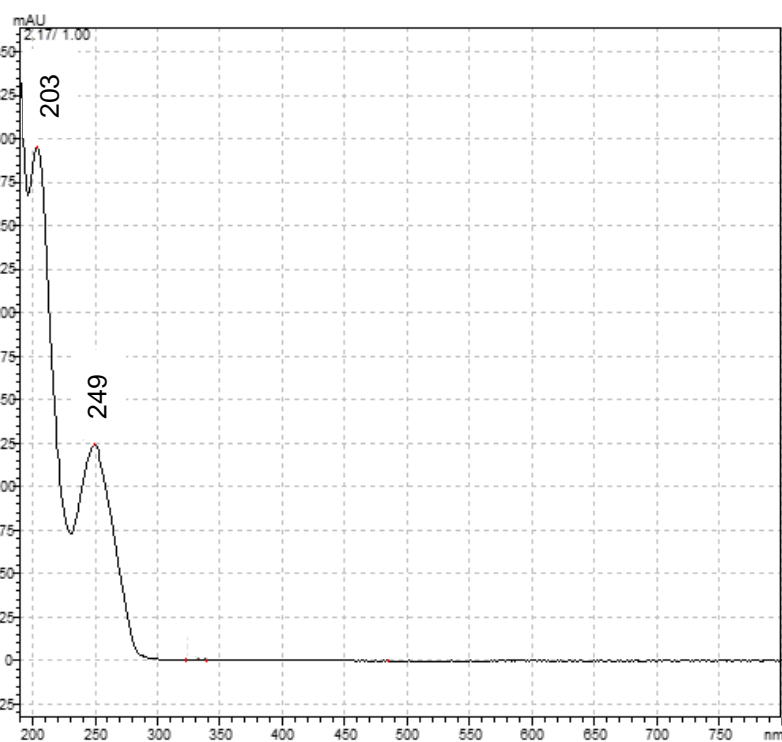
## 5.2 Desenvolvimento do método, empregando cromatografia líquida de alta eficiência, para quantificação do alopurinol em comprimidos

Para a seleção das condições cromatográficas inicialmente foram analisados os meios de solubilização do alopurinol. Dentre os meios de solubilização analisados, os que apresentaram melhores resultados para a determinação de alopurinol foram: HCl 0,1 mol L<sup>-1</sup> e etanol (Figura 10). Ao analisar os cromatogramas (Figura 11) oriundos das soluções padrão (1,0 µg mL<sup>-1</sup>), foi possível observar a presença de dois picos, nos comprimentos de onda de 203 e 249 nm, fato este também observado no desenvolvimento do método espectrofotométrico, conforme citado anteriormente. Por este motivo, os dois comprimentos de onda foram selecionados para a determinação dos parâmetros de exatidão e precisão, nos dois meios (HCl 0,1 mol L<sup>-1</sup> e etanol) e, da mesma forma que no método anterior, não foi possível estabelecer a precisão para o comprimento de onda 203 nm, sendo, então, selecionado o comprimento de onda 249 nm como comprimento de detecção do alopurinol e levando em consideração esta seleção, optou-se por utilizar o solvente HCl 0,1 mol L<sup>-1</sup>, respeitando os princípios da química verde.

**Figura 10-** Determinação do meio de solubilização de alopurinol comprimidos e substância química de referência. Condições experimentais: coluna C8 (150 mm X 4,6 mm X 5,0  $\mu\text{m}$ ); fase móvel metanol (50%) + água ultrapura (50%); fluxo: 0,9 mL  $\text{min}^{-1}$ ; temperatura 30  $^{\circ}\text{C}$ .



**Figura 11-** Espectrograma da solução padrão de alopurinol ( $1,0 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) em meio HCl  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ . Condições experimentais: coluna C8 (150 mm X 4,6 mm X 5,0  $\mu\text{m}$ ); fase móvel metanol (50%) + água ultrapura (50%); fluxo: 0,9 mL  $\text{min}^{-1}$ ; temperatura 30  $^{\circ}\text{C}$ .



A presença de dois picos no espectrograma, também, foi observada no estudo de Rajkumar, Bhavya e Kumar (2014), que desenvolveram e validaram um método para determinação simultânea de alopurinol e ácido lipóico em comprimidos empregando CLAE em fase reversa. Neste estudo, o comprimento de maior absorção foi 210 nm e foi

encontrado um pico cromatográfico de menor intensidade que o primeiro, na região de 250 nm. Como o objetivo deste estudo era a detecção simultânea e, tanto o alopurinol quanto o ácido lipoíco exibiram máximo de absorção em 210 nm, este foi utilizado para as determinações. Já Ammar e colaboradores (2011), em seu estudo no Cairo, Egito, utilizaram o comprimento de onda de 254 nm para quantificação de alopurinol e ácido salicílico, simultaneamente. Nas Farmacopeias Brasileira (2019) e Americana (2019), a determinação é realizada no comprimento de onda 230 nm. Insta salientar que, em todos os estudos apresentados, o meio de solubilização utilizado foi diferente no proposto neste estudo, sendo metanol (AMMAR, *et al.*, 2011) e acetonitrila (RAJKUMAR; BHAVYA; KUMAR, 2014).

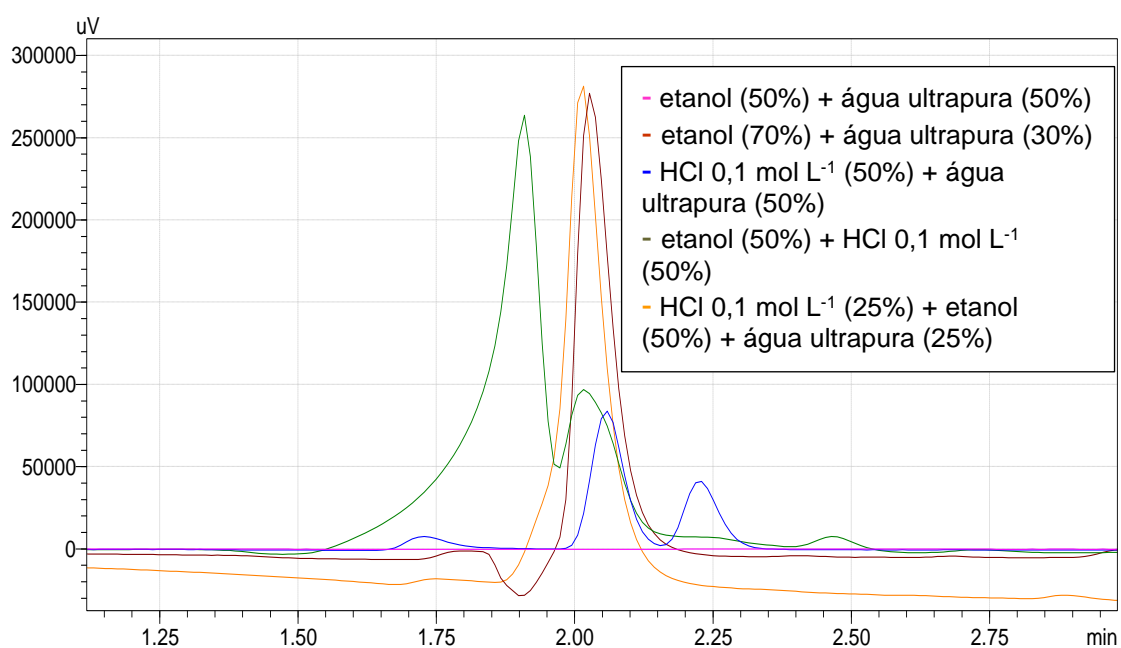
Na definição da fase móvel (Figura 12), as que apresentaram melhores resultados foram: etanol + HCl 0,1 mol L<sup>-1</sup> (50: 50: v v<sup>-1</sup>); etanol + água ultrapura (70:30: v v<sup>-1</sup>) e HCl 0,1 mol L<sup>-1</sup> + etanol + água ultrapura (25: 50: 25 v v<sup>-1</sup>v<sup>-1</sup>). Destas, foi selecionada a fase móvel HCl 0,1 mol L<sup>-1</sup> + etanol + água ultrapura (25: 50: 25 v v<sup>-1</sup>v<sup>-1</sup>), pois possui um menor consumo de solvente etanol puro, atendendo os princípios da sustentabilidade. Na literatura não foram encontrados trabalhos que relatam a utilização de fase móvel contendo uma mistura dos solventes mencionados acima para a determinação de alopurinol, sendo este fato, uma das inovações deste trabalho. Destaca-se que no estudo de Rajkumar, Bhavya e Kumar (2014) a fase móvel utilizada foi uma mistura de solução aquosa de tampão acetato pH 4,5 + acetonitrila (96: 4: v v<sup>-1</sup>); já, no estudo de Ammar e colaboradores (2011), a fase móvel foi uma mistura de acetonitrila + tampão acetato de amônio ajustado para 4,6 (50:50: v v<sup>-1</sup>). Conforme as informações das Farmacopeias Brasileira (2019) e Americana (2019) recomendam-se os meios: mistura de solução aquosa de fosfato de potássio monobásico 0,125% (p v<sup>-1</sup>) + metanol (70: 30 v v<sup>-1</sup>) e (50: 50 v v<sup>-1</sup>), respectivamente.

Os resultados obtidos evidenciaram um pico no comprimento de onda 203 nm. Cabe destacar que na região entre 200 e 210 nm, vários solventes, também, absorvem radiação e, por este motivo, optou-se por realizar as análises para validação do método no comprimento de onda 249 nm, comprimento este próximo ao comprimento preconizado pelas Farmacopeias Brasileira (2019) e Americana (2019).

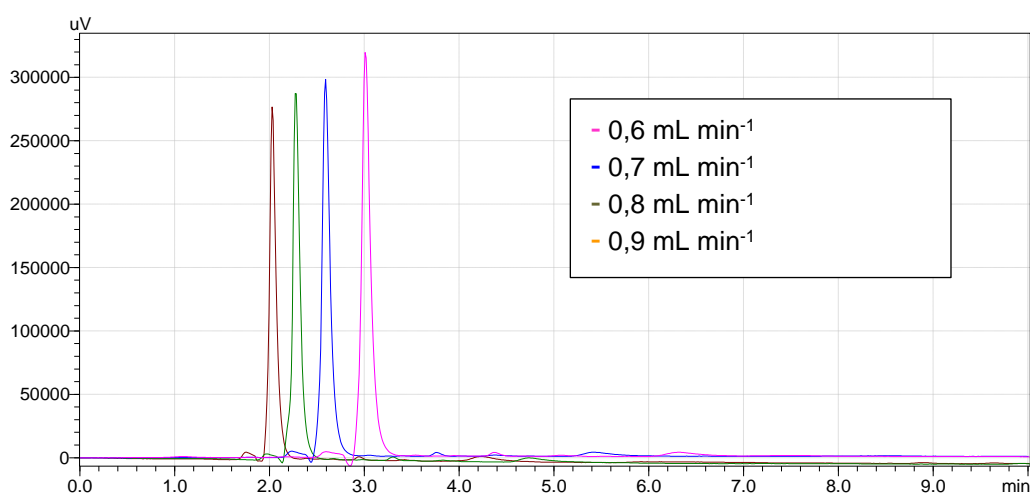
Após a definição da fase móvel, outro parâmetro avaliado foi o fluxo da fase móvel, sendo investigadas as vazões de 0,6 a 0,9 mL min<sup>-1</sup> (Figura 13). A seleção do fluxo da fase móvel foi baseada no princípio de uma vazão o mais reduzida possível, que exibe um menor

consumo de fase móvel e, conseqüentemente, uma menor quantidade de reagentes, atendendo, mais uma vez, ao preconizado pelos princípios da química verde. Com base nestes resultados, o fluxo selecionado foi  $0,6 \text{ mL min}^{-1}$ . Para Jahangirian e colaboradores (2017) o consumo de quantitativos de solventes em menor proporção, especialmente os tóxicos, deve ser um dos quesitos a serem avaliados no desenvolvimento de métodos, visando o mínimo impacto ambiental ao ecossistema.

**Figura 12-** Comparação das fases móveis para determinação de alopurinol em solvente HCl  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ . Condições experimentais: coluna C8 (150 mm X 4,6 mm X 5,0  $\mu\text{m}$ ); fluxo:  $0,9 \text{ mL min}^{-1}$ ; temperatura  $30 \text{ }^\circ\text{C}$ .



**Figura 13-** Seleção do fluxo da fase móvel da CLAE para a determinação de alopurinol (SQR e comprimidos) em solvente HCl  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ . Condições experimentais: coluna C8 (150 mm X 4,6 mm X 5,0  $\mu\text{m}$ ); fase móvel: HCl  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  (25%) + etanol (50%) + água ultrapura (25%); temperatura  $30^\circ\text{C}$ .



Definido estes parâmetros foi então calculado o tempo de retenção do alopurinol, o fator de retenção, o número de pratos teóricos e a resolução cromatográfica (Tabela 02).

**Tabela 02** – Determinação do tempo e fator de retenção, número de pratos teóricos e resolução cromatográfica, para o método de determinação de alopurinol em meio de HCl 0,1 mol L<sup>-1</sup>.

Parâmetros	Valores
Tempo de retenção (Tr, minutos)	3,01
Fator de retenção (k)	5,20
Número de pratos teóricos (N)	6.442
Resolução cromatográfica (R)	2,05

Após estas definições foi definido o tempo de corrida, avaliando o tempo do pico de alopurinol (3,01 minutos) e a não observação de outro pico após o pico do alopurinol (Figura 13), foi estabelecido como tempo de corrida 4,0 minutos. Cabe destacar que o tempo de corrida preconizado nas Farmacopeias Brasileira (2019) e Americana (2019) para as suas determinações são 30 e 35 minutos, respectivamente.

Com base nestes parâmetros estudados, foram estabelecidas as condições ótimas para a determinação de alopurinol (comprimidos) empregando a cromatografia líquida de alta eficiência (Tabela 03) e os cromatogramas relativos a SQR e os medicamentos são apresentados (Apêndice A, ver página 117).

**Tabela 03-** Condições ótimas para o método de determinação de alopurinol (comprimidos) empregando cromatografia líquida de alta eficiência

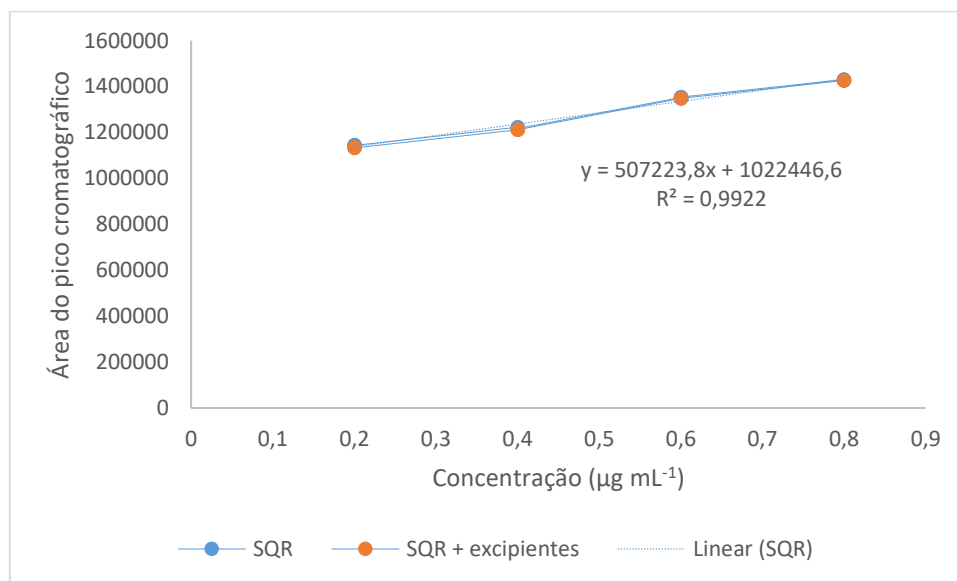
Cromatografia líquida de alta eficiência	
Parâmetros	Condições
Coluna	C8 (4,6 mm X 150 mm X 5,0 µm)
Fase móvel	HCl 0,1 mol L <sup>-1</sup> (25%) + etanol (50%) + água ultrapura (25%)
Fluxo (mL min <sup>-1</sup> )	0,6
Temperatura (°C)	30
Tempo de corrida (minutos)	4
Detector	DAD (249 nm)
Tempo de retenção (tr, minutos)	3,01

Os resultados obtidos atenderam aos requisitos de validação definidos para métodos analíticos, conforme Resolução- RDC nº 166/2017 e IUPAC (Tabela 04 e Figuras 14 e 15).

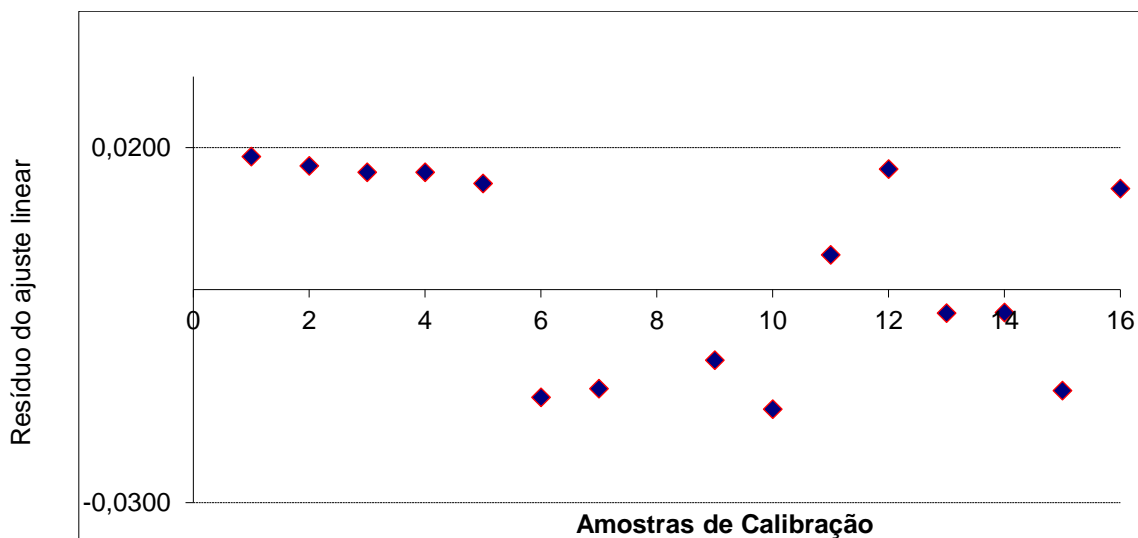
**Tabela 04-** Validação do método de determinação do alopurinol (comprimidos) empregando cromatografia líquida de alta eficiência

Figuras de mérito	Valores (ANVISA)	Valores (IUPAC)
Exatidão (%)	99,76-99,81	99,79- 99,82
Precisão (DPR, %)	< 0,50	< 0,50
Limite de detecção ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )	0,06	0,05
Limite de quantificação ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )	0,18	0,12
Equação da reta	$y = 507223,8x + 1022446,6$	$y = 538618,3x + 1022446,6$
Coeficiente de correlação (r)	0,9961	0,9976
Coeficiente de determinação ( $r^2$ )	0,9922	0,9952
Faixa de trabalho ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )	0,18 - 0,80	0,12 -0,80
Robustez	<1,90	<2,00

**Figura 14-** Equação da reta da curva analítica do alopurinol (SQR e SQR + excipientes) empregando cromatografia líquida de alta eficiência



**Figura 15** - Avaliação dos resíduos gerados no processo de construção da curva analítica para a determinação de alopurinol por cromatografia líquida de alta eficiência.

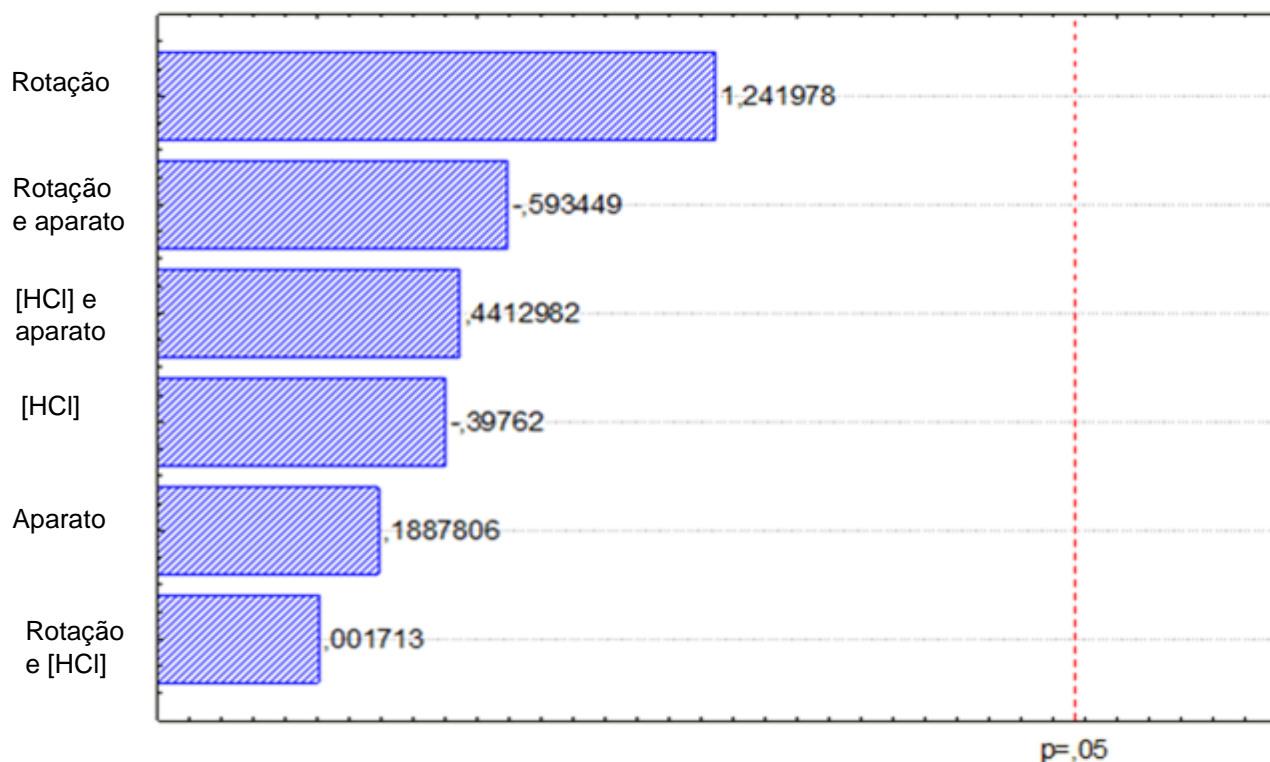


Diante dos resultados encontrados para a validação do método cromatográfico, sugere-se que o método proposto poder ser utilizado para quantificar alopurinol no produto acabado, respeitando os limites da faixa de trabalho.

### 5.3 Ensaios de dissolução de comprimidos de alopurinol 100 mg e 300 mg

Após o desenvolvimento e validação dos dois métodos propostos (UV e CLAE), ensaios de dissolução (teste e perfis de dissolução) foram planejados para avaliar a liberação (%) de alopurinol nos medicamentos adquiridos no mercado (Z1, Z2, M1, M2, S e P). A Farmacopeia Brasileira (2019) indica que, não menos que 75% do fármaco se dissolvida em 45 minutos. Após a realização do planejamento fatorial e avaliação pelo diagrama de Pareto, foi possível observar que não houve variável que apresentasse contribuição estatisticamente significativa na dissolução de alopurinol comprimidos, isoladamente ou, em combinação (Figura 16). Desta forma, foram selecionadas as seguintes condições: meio de dissolução – 900 mL de HCl 0,001 mol L<sup>-1</sup>, aparato: tipo 2 (pá) e rotação 75 rpm. Cabe destacar que na variável rotação poderia ser utilizada a de 50 rpm, mas foi adotada a de 75 rpm, pois é a mesma descrita nas Farmacopeias Americana (USP, 2019) e Brasileira (2019), sem causar prejuízos ao método, uma vez que esta mudança de rotação não exerceu interferências no resultado dos testes, conforme os resultados obtidos.

**Figura 16** - Diagrama de Pareto do planejamento experimental para a determinação das condições de execução do teste de dissolução de medicamentos contendo alopurinol



Estimativa de efeito padronizado (valor absoluto)

A análise multifatorial para a determinação das condições ótimas de um experimento é de grande importância, uma vez que é capaz de estabelecer as melhores condições para determinação de um analito, diminuir a quantidade de ensaios realizados e, especialmente, quando se necessita de uma grande quantidade de solvente e/ou o emprego de solventes tóxicos e nocivos ao meio ambiente (SAHU *et al.*, 2017). O uso de uma menor quantidade desses solventes é uma contribuição significativa para as condições ambientais e, cada vez mais, vem sendo explorado pelas empresas químicas, alimentícias, farmacêuticas e cosméticas (MARCO *et al.*, 2019; KOLLA *et al.*, 2019). O planejamento experimental, como modelo matemático, além de estabelecer as condições ótimas é capaz, por meio da estatística, de contribuir para o desenvolvimento de métodos mais exatos e precisos (OLIVIERI, 2015; ALLEGRINI; OLIVIERI, 2014; ORTIZ; SARABIA; SANCHEZ, 2010).

### 5.3.1 Teste de dissolução

Os comprimidos analisados (Z1, Z2, M1, M2, S e P) liberaram mais de 80% de alopurinol, em 45 minutos nos dois métodos desenvolvidos (Tabela 05) e, desta forma, atenderam os critérios definidos pelas Farmacopeias Brasileira (2019) e Americana (2019)

que preconizam, não menos que 80% da dose de alopurinol dissolvido no tempo de 45 minutos.

**Tabela 05** – Teste de dissolução de comprimidos de alopurinol empregando os dois métodos, até 45 minutos

Medicamento	Quantidade de alopurinol dissolvido (%)	
	Espectrofotometria UV	CLAE
Z1	100,41	99,92
Z2	101,44	99,11
M1	100,90	99,63
M2	99,67	99,93
S	99,52	99,62
P	99,91	99,44

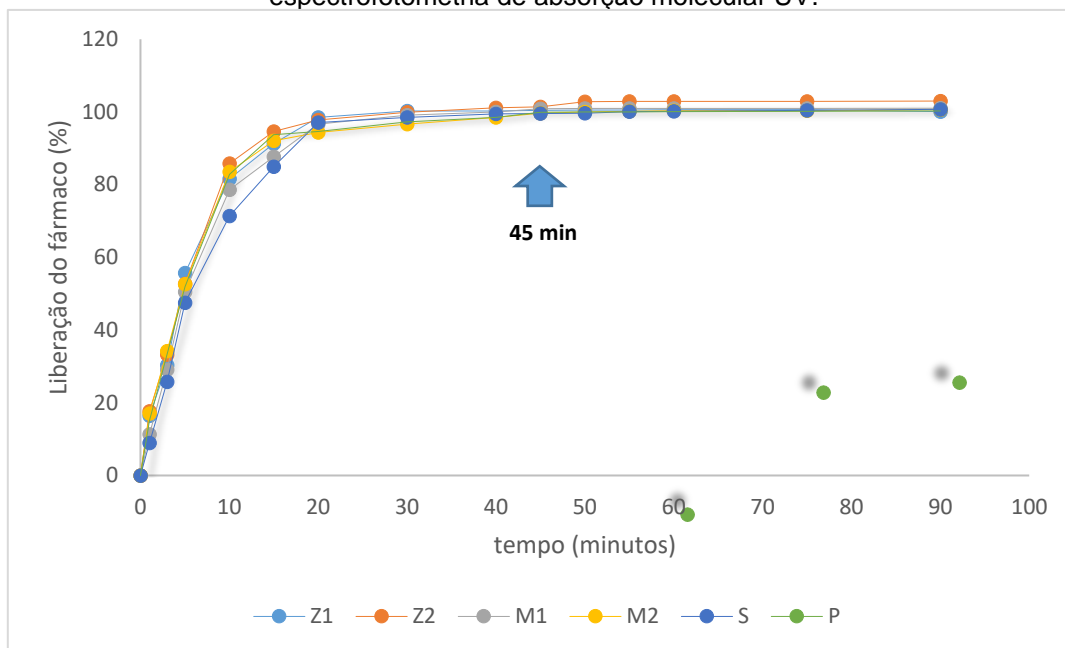
CLAE: Cromatografia líquida de alta eficiência

Este teste conseguiu informar, *in vitro*, o quantitativo de alopurinol dissolvido no meio de dissolução e, portanto, disponível para ser absorvido no trato gastrointestinal, sendo um importante teste a ser avaliado no momento do desenvolvimento de uma formulação (ZAMAN *et al.*, 2016). Cabe salientar que o uso de excipientes com funções desagregantes, auxiliam no processo de desagregação e posterior dissolução dos medicamentos, ensejando em dissoluções cada vez mais rápidas, deixando o insumo farmacêutico ativo apto para ser absorvido (BIANCHINI *et al.*, 2019). Apesar de ser um teste farmacopeico de grade valia, para a avaliação da equivalência terapêutica se faz necessária a realização do perfil de dissolução de medicamentos.

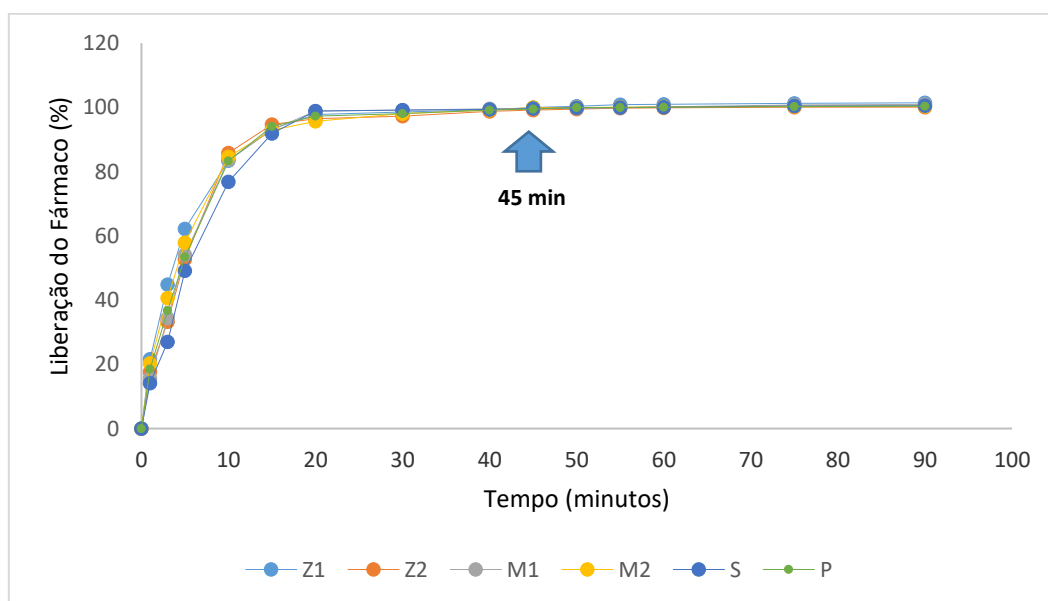
### 5.3.2. Perfil de dissolução de medicamentos

Os resultados obtidos (Figuras 17 e 18) demonstraram que os medicamentos (referência, genérico e similar), contendo alopurinol, exibiram perfis de dissolução semelhantes para o fármaco, quando avaliados utilizando a ANOVA e teste de Tukey (Tabelas 06, 07 e 08 e Figuras 19 e 20). Os medicamentos testados liberaram  $\geq 75\%$  do fármaco, após decorridos 10 minutos do teste, exceto o medicamento S que, por espectrofotometria, liberou 71,35% do fármaco, em 10 minutos. Porém, ao longo do tempo, esta diferença foi suplantada, sem interferir na análise global do teste.

**Figura 17-** Perfis de dissolução de alopurinol (comprimidos de 100 e 300 mg) empregando espectrofotometria de absorção molecular UV.



**Figura 18-** Perfis de dissolução de alopurinol (comprimidos de 100 e 300 mg) empregando cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).



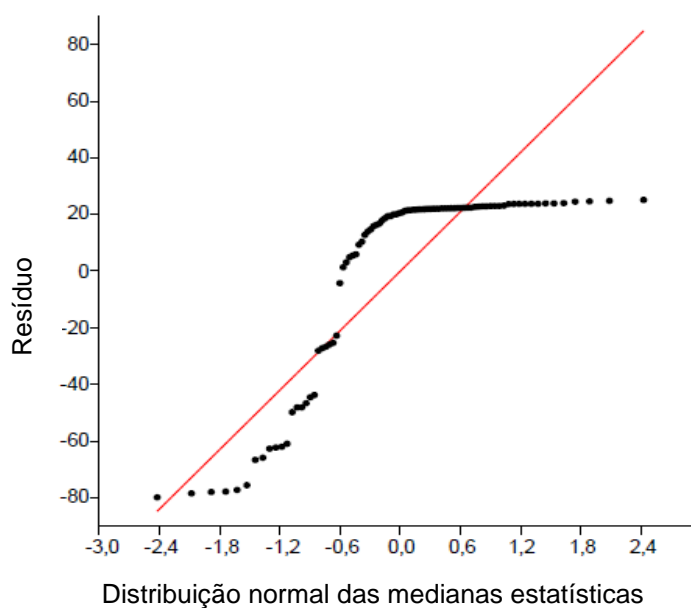
**Tabela 06-** Análise de variância (ANOVA) do perfil de dissolução de medicamentos contendo alopurinol empregando os métodos desenvolvidos

ANOVA					
Análise estatística	Variância entre grupos	Variância dentro do grupo	F (calculado)	F (crítico)	p-valor
Espectrofotometria	0,015134	10,542185	0,024117	2,323126	0,999732
CLAE	0,008747	9,877099	0,014878	2,323126	0,999918

**Tabela 07 –** Comparação pareada do teste de Tukey aplicados ao perfil de dissolução de comprimidos de alopurinol utilizando o método espectrofotométrico

Medicamento	Z1	Z2	M1	M2	S	P
Z1		1	1	1	0,9999	1
Z2	0,1581		1	1	0,9995	1
M1	0,1335	0,2916		1	1	1
M2	0,05153	0,2096	0,08196		1	1
S	0,3135	0,4716	0,18	0,262		1
P	0,06828	0,2264	0,06521	0,01675	0,2452	

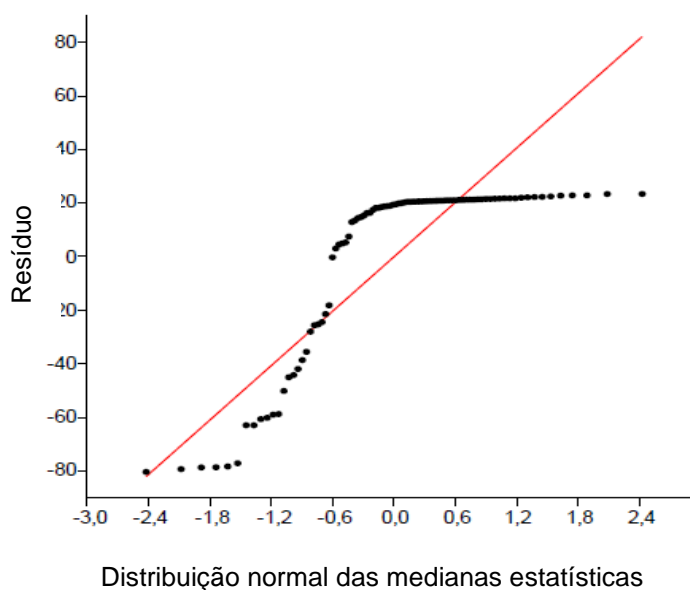
**Figura 19-** Análise dos resíduos de variância da comparação pareada do teste de Tukey aplicados ao perfil de dissolução de comprimidos de alopurinol utilizando o método espectrofotométrico.



**Tabela 08** – Comparação pareada do teste de Tukey aplicados ao perfil de dissolução de comprimidos de alopurinol utilizando o método cromatográfico.

Medicamento	Z1	Z2	M1	M2	S	P
Z1		1	1	1	0,9999	1
Z2	0,2318		1	1	1	1
M1	0,198	0,03377		1	1	1
M2	0,1181	0,1137	0,07995		1	1
S	0,3675	0,1357	0,1695	0,2494		1
P	0,1896	0,04226	0,008484	0,07146	0,178	

**Figura 20-** Análise dos resíduos de variância da comparação pareada do teste de Tukey aplicados ao perfil de dissolução de comprimidos de alopurinol utilizando o método cromatográfico.



Com base na análise dos resíduos oriundos do teste de Tukey, pode-se afirmar que todos os medicamentos apresentaram perfis semelhantes entre si, não existindo diferença estatisticamente significativa entre os medicamentos estudados, tanto para o método espectrofotométrico quanto para o cromatográfico.

Após a análise da ANOVA foi realizado o cálculo de fator de diferença ( $f_1$ ), entre pares, conforme determinação da ANVISA para a comparação dos perfis, não apresentado

valores fora do intervalo determinado por esta agência regulatória para o f1 (entre 0 e 15) para os dois métodos desenvolvidos, reforçando o que já fora apresentado na análise de variâncias, no teste de Tukey e análise dos resíduos (Tabela 09).

**Tabela 09** – Valores de f1 oriundos do perfil de dissolução comparativo de medicamentos contendo alopurinol empregando os métodos desenvolvidos (espectrofotometria de absorção molecular UV e CLAE)

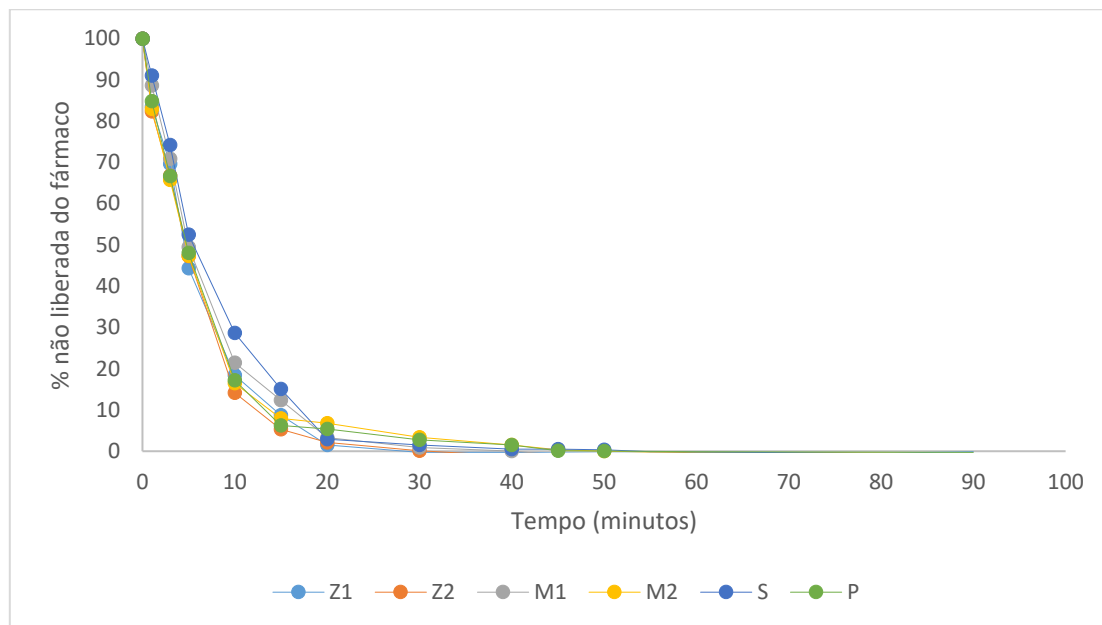
<b>Espectrofotometria</b>				
Medicamentos	Z1 x M1	Z1 x S	Z2 x M2	Z2 x P
f1	1,56	3,65	2,40	2,59
<b>Cromatografia líquida de alta eficiência</b>				
Medicamentos	Z1 x M1	Z1 x S	Z2 x M2	Z2 x P
f1	2,18	4,05	1,29	0,48

Não foi necessário o cálculo do f2 (fator de similaridade), pois segundo a Resolução RDC 31/2010, “quando o fármaco apresentar alta solubilidade e a formulação for de liberação imediata, apresentando dissolução muito rápida (dissolução de mais de 85% do fármaco em menos de 15 minutos) para ambos os medicamentos, o fator f2 perde o seu poder discriminativo e, portanto, não é necessário calculá-lo” (BRASIL, 2010).

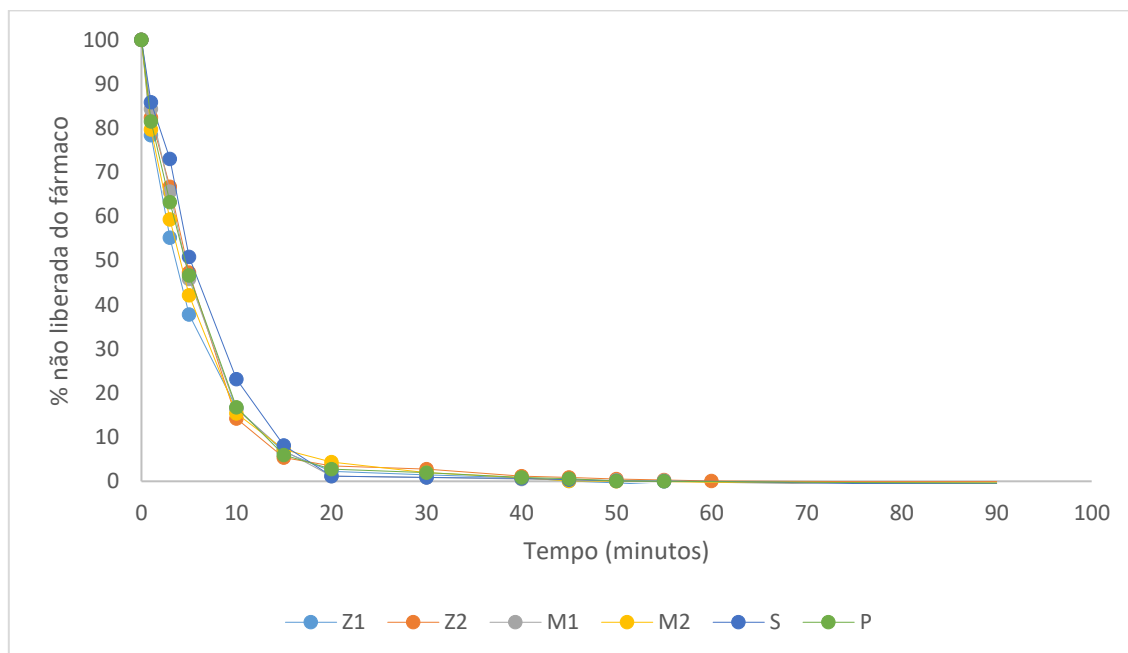
Adicionalmente, foram calculados os modelos cinéticos de ordem zero (Figuras 21 e 22) e primeira ordem (Figuras 23 e 24) para os dois métodos propostos, e o modelo cinético de dissolução que explica melhor este processo é o de **primeira ordem**, exibindo coeficientes de correlação mais próximos de 1, quando comparados ao de ordem zero (Tabela 10). A partir da definição do modelo foi possível determinar os parâmetros K, T50%, Q45, tanto para os ensaios empregando a espectrofotometria quanto a cromatografia (Tabela 11).

Pode-se observar que os valores encontrados para o tempo de meia-vida de dissolução dos medicamentos testados são muito próximos, com variação de 3,09 a 6,82 minutos, corroborando com os dados apontados da análise do perfil de dissolução apresentados anteriormente (ANOVA, Tukey e f1). Cabe-se destacar, também, que as constantes de velocidade calculadas para cada medicamento, nos dois métodos, também, apresentaram valores muito próximos entre si, variando de 0,10 a 0,22, reforçando que a dissolução destes medicamentos foi muito rápida.

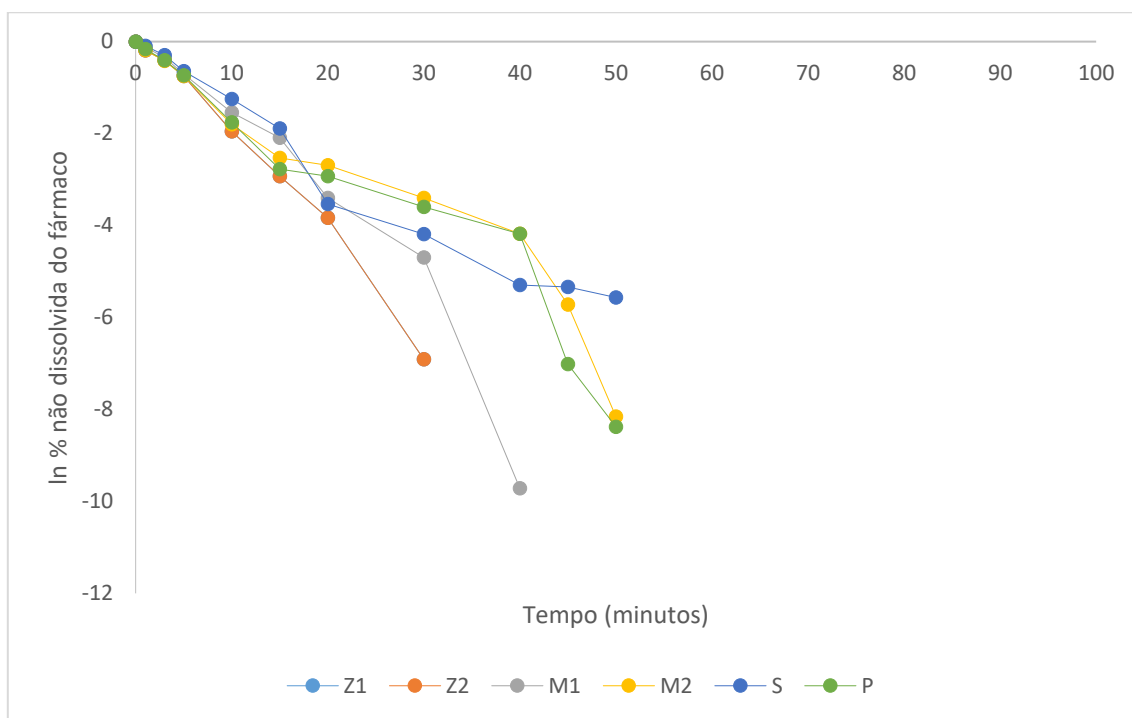
**Figura 21** – Porcentagem de alopurinol não dissolvido empregando espectrofotometria UV (aplicação do modelo de ordem zero).



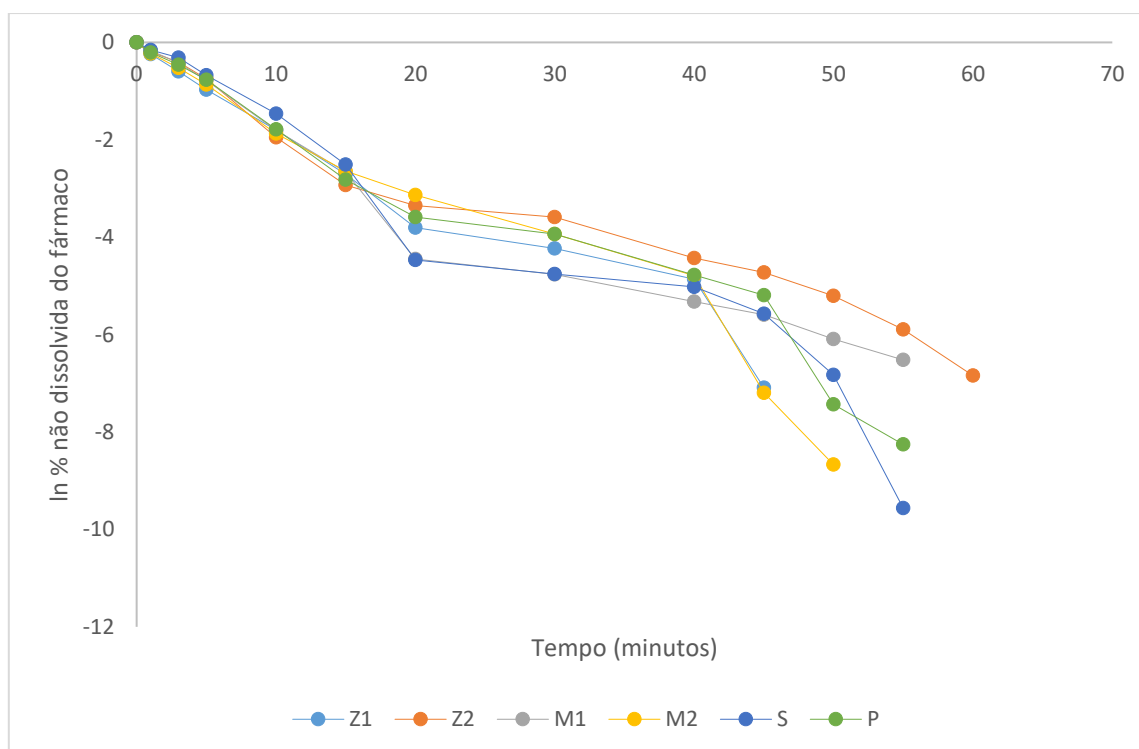
**Figura 22** – Porcentagem de alopurinol não dissolvido empregando CLAE (aplicação do modelo de ordem zero).



**Figura 23** – Transformação logarítmica da porcentagem de alopurinol não dissolvido empregando método espectrofotométrico UV (aplicação do modelo de primeira ordem).



**Figura 24** – Transformação logarítmica da porcentagem de alopurinol não dissolvido empregando método CLAE (aplicação do modelo de primeira ordem).



**Tabela 10-** Parâmetros estatístico dos estudos de regressão, aplicando modelo ordem zero e primeira ordem, derivados dos perfis de dissoluções de medicamentos contendo alopurinol (espectrofotometria UV e CLAE).

<b>Espectrofotometria UV</b>						
Medicamento	Z1 (r)	Z2 (r)	M1(r)	M2 (r)	S (r)	P (r)
Ordem zero	0,7132	0,7207	0,7368	0,7249	0,7513	0,7183
Primeira ordem	0,9870	0,9935	0,9664	0,9650	0,9825	0,9660
<b>Cromatografia líquida de alta eficiência</b>						
Medicamento	Z1 (r)	Z2 (r)	M1(r)	M2 (r)	S (r)	P (r)
Ordem zero	0,7041	0,7060	0,7094	0,7071	0,7270	0,7104
Primeira ordem	0,9782	0,9784	0,9682	0,9782	0,9669	0,9790

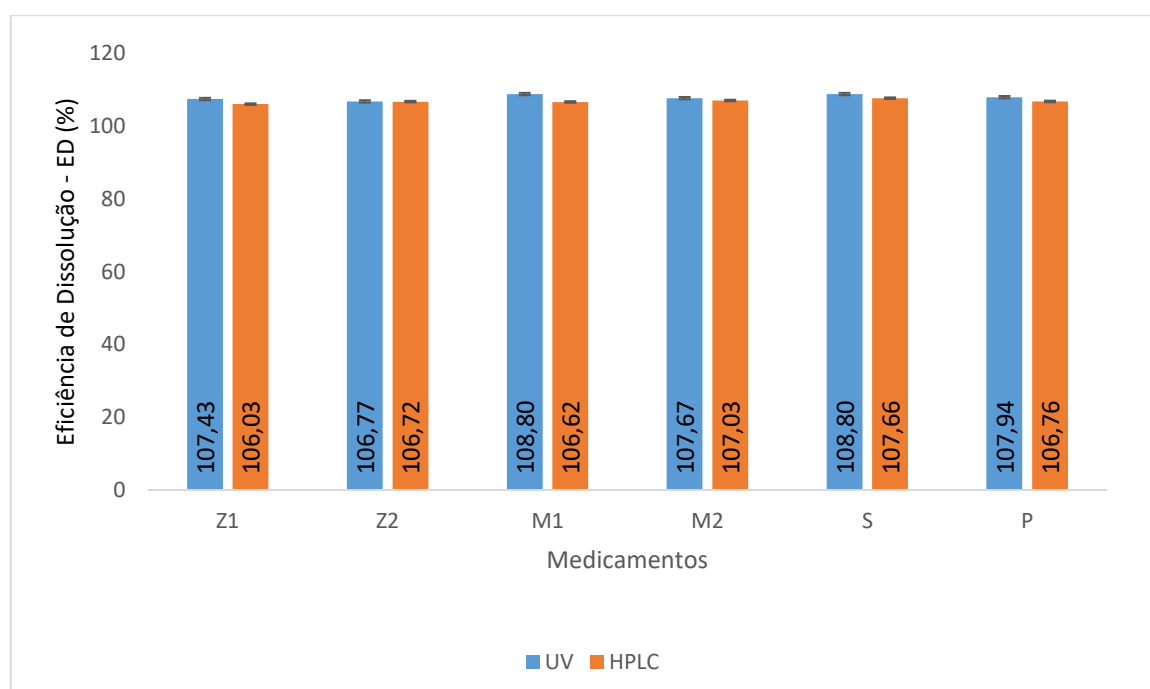
r: coeficiente de correlação

**Tabela 11** – Valores médios dos parâmetros cinéticos (desvios-padrão) a partir do modelo de cinética de primeira ordem, derivados dos perfis de dissolução dos medicamentos contendo alopurinol.

<b>Espectrofotometria UV</b>			
medicamentos	T <sub>50%</sub> (minutos)	Q 45 (%)	K (minutos <sup>-1</sup> )
Z1	3,50 (± 0,22)	100,02 (± 1,77)	0,20 (± 0,01)
Z2	3,09 (± 0,35)	101,30(± 1,98)	0,22 (± 0,01)
M1	3,19 (± 0,81)	100,06(± 4,69)	0,22 (± 0,02)
M2	5,21 (± 0,19)	99,57(± 3,20)	0,13 (± 0,01)
S	5,76 (± 0,27)	99,21(± 3,96)	0,12 (± 0,02)
P	4,78 (± 0,29)	99,85(± 2,39)	0,15 (± 0,02)
<b>Cromatografia líquida de alta eficiência</b>			
medicamentos	T <sub>50%</sub> (minutos)	Q 45 (%)	K (minutos <sup>-1</sup> )
Z1	4,99 (± 0,27)	99,82 (± 5,76)	0,14 (± 0,01)
Z2	6,81 (± 0,35)	99,07 (± 4,51)	0,10 (± 0,01)
M1	5,82 (± 0,49)	99,56 (± 9,77)	0,12 (± 0,02)
M2	4,56 (± 0,33)	99,86 (± 4,17)	0,15 (± 0,01)
S	4,75 (± 0,52)	99,49 (± 8,96)	0,15 (± 0,02)
P	5,17 (± 0,19)	99,41 (± 3,20)	0,13 (± 0,01)

Por fim, foi calculada o parâmetro eficiência de dissolução (ED,%) para os medicamentos analisados, por meio da regra dos trapezóides. A partir dos dados obtidos, os medicamentos apresentaram ED (%) iguais ou superiores a 75%, em 45 minutos, tanto nas medidas realizadas com a espectrofotometria, quanto com CLAE (Figura 25), estando de acordo com o critério estabelecido tanto na Farmacopeia Brasileira (2019) quanto na Farmacopeia Americana (2019).

**Figura 25** - Eficiência de dissolução de comprimidos contendo alopurinol empregando os dois métodos (UV e CLAE)



Alghadi e Hamedelneil (2017) estudaram a liberação imediata de alopurinol, em comprimidos comercializados no Sudão. Um dos meios empregados para a comparação do perfil de dissolução foi HCl 0,1 mol L<sup>-1</sup> (pH 1,2). Neste meio, dos 07 medicamentos estudados, apenas um teve a porcentagem de dissolução abaixo de 75% do fármaco, em 15 minutos de teste. Todos os outros medicamentos apresentaram liberação do fármaco superior a 90%, em 15 minutos.

Moghal e colaboradores (2016), avaliaram a liberação *in vitro* de alopurinol, nos comprimidos de liberação rápida, que eles desenvolveram, em Savar Dakar, Blangadesh, utilizando como excipientes a croscarmelose sódica, lactose, celulose microcristalina, crospovidona, talco e estearato de magnésio. Os resultados obtidos pelos autores, a partir

dos perfis de dissolução executados em meio de HCl 0,01 mol L<sup>-1</sup>, empregando espectrofotometria de absorção molecular com detecção em 250 nm, mostraram liberação do fármaco superiores a 80%, no tempo de 10 minutos. Estes excipientes, também, fazem parte dos medicamentos aqui estudados, podendo ser uma das explicações para a dissolução muito rápida destes medicamentos. Neste estudo, também foi determinado o modelo cinético de dissolução e, dos 09 medicamentos testados, 07 apresentaram o modelo de primeira ordem, como o que melhor explica a dissolução dos medicamentos formulados, corroborando com os achados deste trabalho. Os outros 02 medicamentos apresentaram como melhor modelo o Korsmeyer-Peppas, sendo atribuído pelo estudo a maior quantidade de glicolato de sódio, nestes comprimidos, quando comparado aos outros estudados.

Já, Ammar e colaboradores (2011), no Cairo, Egito, realizaram o teste de dissolução em 04 medicamentos empregando o meio HCl 0,1 mol L<sup>-1</sup> e estabeleceram, também a cinética de dissolução. Dos analisados, 02 apresentaram modelo de primeira ordem para a dissolução, sendo um deles o medicamento referência de 100 mg. O estudo de Kumar e colaboradores (2016) em Punjab, Índia, que formulou e avaliou, executando, dentre outros, estudos de perfil de dissolução de 09 formulações contendo alopurinol com os excipientes crospovidona, croscarmelose sódica, estearato de magnésio e talco (também, presente nas formulações aqui estudadas), utilizando a espectrofotometria com o meio de dissolução HCl 0,1 mol L<sup>-1</sup> e o mesmo comprimento de onda (250 nm), encontrou dissolução acima de 75% da dose em 08 formulações, em 45 minutos de teste. Os comprimidos que apresentavam uma maior quantidade de crospovidona, apresentaram uma dissolução do alopurinol em um tempo menor, fato este também observado no estudo de Moghal e colaboradores (2016), em Savar Dakar, Bangladesh. Cabe destacar que, todos os medicamentos genéricos aqui estudados, possuíam a crospovidona como excipiente, enquanto os medicamentos referência não possuíam, em suas formulações, esta substância, entretanto, este fator tecnológico, não interferiu na dissolução dos medicamentos de referência.

Com base nos resultados dos ensaios de dissolução (perfil, cinética e eficiência de dissolução), os medicamentos aqui avaliados cumpriram os requisitos determinados pela agência reguladora nacional. Como uma questão inovadora deste estudo, destaca-se o fato de que nenhum dos trabalhos encontrados na literatura científica realizaram os ensaios de

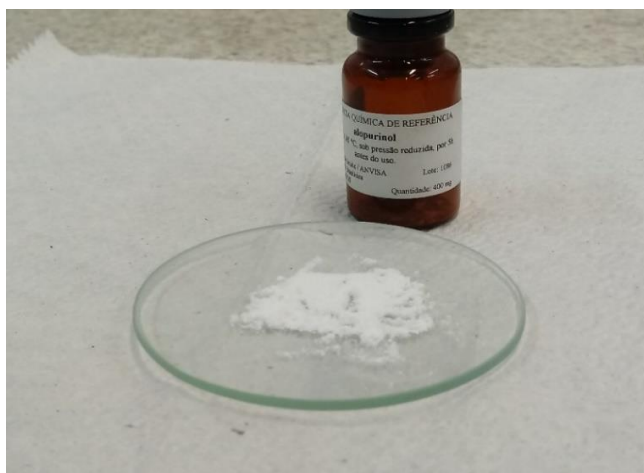
dissolução empregando a CLAE, apesar de existirem métodos para doseamento, tanto nos compêndios oficiais quanto na literatura científica, conforme mencionado neste trabalho.

## 5.4 Outros ensaios de controle de qualidade do alopurinol (substância química de referência e comprimidos)

### 5.4.1 Características organolépticas

A SQR alopurinol se apresentou como pó branco, em conformidade com o informe técnico emitido pelo INCQS/FIOCRUZ e com as farmacopeias Brasileira (BRASIL, 2019c) e Americana (USP, 2019) que descreve o alopurinol como cristais brancos a amarelos pálidos ou pó cristalino branco (Figura 26). Já, os comprimidos (Figura 27), foram analisados com base nas informações presentes na bula.

**Figura 26-** Pó da substância química de referência alopurinol



**Figura 27-** Comprimidos de alopurinol



Os resultados desta análise estão em conformidade com o preconizado nas suas instruções de uso (Tabela 12). Os medicamentos de referência apresentaram comprimidos circulares brancos com diâmetro de 0,71 cm para o 100 mg (Z1) e 1,11 cm para o de 300 mg (Z2). Para os medicamentos genéricos, os de 100 mg (M1) mostraram-se como comprimidos circulares, biconvexos, monossectados, na cor branca, com diâmetro de 0,84 cm; e, (S) eram comprimidos brancos, biconvexos e oblongos, medindo 0,96 cm de diâmetro; (M2) eram comprimidos circulares, biconvexos, sem vincos, na cor branca, com diâmetro de 1,16 cm e, finalmente, (P) apresentaram-se como comprimidos simples, circulares, brancos, não sulcados, com diâmetro de 1,15 cm. Estas informações estão descritas na Tabela 12.

**Tabela 12-** Descrição dos comprimidos de alopurinol (referência e genéricos) adquiridos para o estudo.

Medicamento	Descrição	Diâmetro (cm)
Z1	comprimidos circulares brancos	0,71 ( $\pm$ 0,01)
M1	comprimido circular, biconvexo, monossectado, na cor branca	0,84 ( $\pm$ 0,01)
S	comprimido branco, biconvexo e oblongo	0,96 ( $\pm$ 0,01)
Z2	comprimidos circulares brancos	1,11 ( $\pm$ 0,01)
M2	comprimido circular, biconvexo, sem vinco, na cor branca	1,16 ( $\pm$ 0,02)
P	comprimido simples, circular, branco, não sulcado	1,15 ( $\pm$ 0,01)

Insta salientar que este teste não é categórico em afirmar que se trata de alopurinol, haja vista que se trata de uma observação do produto relativo ao seu aspecto. Mas, este ensaio é de grande importância industrial, uma vez que, nesta análise, pode-se verificar a capacidade da indústria produzir lotes com as mesmas características (LAGO; PEREIRA; BERTOL, 2012).

O aspecto de um produto é uma das características observadas pelos clientes na realização de uma aquisição. Em se tratando de medicamentos, qualquer alteração no aspecto já é um indicativo de desvio de qualidade e deve ser tratado como tal. As bulas de medicamentos devem possuir alertas claros e diretos para que os usuários não utilizem os medicamentos caso estejam em desacordo com aspecto descrito. As alterações no aspecto podem revelar falhas na produção, distribuição e armazenamento de medicamentos e exigem uma investigação detalhada para elucidação do ocorrido (BRASIL, 2019a).

Dos estudos disponíveis na literatura, apenas Moghal e colaboradores (2016) realizaram a avaliação do diâmetro dos comprimidos contendo alopurinol, em Savar Dakar, Blangadesh. Os autores avaliaram 09 comprimidos e verificaram diâmetros médios de cerca de 0,8 cm, bem próximos dos diâmetros encontrados neste estudo brasileiro para os comprimidos contendo 100 mg de alopurinol. Como não foi especificado, no texto daquele estudo, a apresentação de cada medicamento pesquisado, não se podem fazer mais comparações acerca do assunto.

#### 5.4.2 Determinação de peso (peso médio) em comprimidos de alopurinol

Para os medicamentos contendo 100 mg de alopurinol, os lotes dos medicamentos testados cumpriram o teste. Todas as unidades testadas estavam dentro do limite de variação exigido ( $\pm 7,5\%$ ), conforme a Farmacopeia Brasileira (2019). Os dados dos testes para os medicamentos contendo 100 e 300 mg de alopurinol estão apresentados na Tabela 13.

**Tabela 13-** Resultado do teste de determinação de peso em comprimidos contendo alopurinol (100 e 300 mg).

<b>Medicamento (100 mg)</b>	<b>Peso médio (mg)</b>	<b>Desvio padrão relativo (%)</b>	<b>Limite superior (mg)</b>	<b>Limite inferior (mg)</b>
Referência (Z1)	179,7	1,26	193,2	166,2
Genérico (M1)	175,8	0,89	189,0	162,6
Genérico (S)	174,0	1,70	187,0	160,9
<b>Medicamento (300 mg)</b>	<b>Peso médio (mg)</b>	<b>Desvio padrão relativo (%)</b>	<b>Limite superior (mg)</b>	<b>Limite inferior (mg)</b>
Referência (Z2)	543,6	0,93	570,8	516,5
Genérico (M2)	513,6	0,29	539,2	487,9
Genérico (P)	537,8	1,06	564,6	510,9

Na literatura científica existem alguns estudos que realizaram a determinação de peso (peso médio) de formas farmacêuticas contendo diversos fármacos, como uma das avaliações de qualidade de medicamentos, podendo citar os estudos de Viana e

colaboradores (2016) e Conceição e colaboradores (2018), que determinaram o peso médio de cápsulas de fluoxetina e comprimidos de propranolol, comercializados no Brasil. Tendo como insumo farmacêutico ativo o alopurinol, os artigos científicos que relataram a execução deste ensaio foram: Kumar e colaboradores (2016), e Kumar e Basava Rao (2016), na Índia e Moghal e colaboradores (2016), em Bangladesh, tendo todos os comprimidos analisados, conformidade com os compêndios e órgãos sanitários, destes países.

#### 5.4.3 Determinação de friabilidade em comprimidos de alopurinol

Todos os comprimidos pertencentes aos lotes de medicamentos analisados apresentaram uma perda inferior a 1,5% do peso inicial, após serem submetidos a aparelhagem específica (Tabela 14).

**Tabela 14-** Resultados do teste de friabilidade dos medicamentos contendo alopurinol

Medicamento	Perda (%)	Especificação
Referência (Z1)	0,2	
Referência (Z2)	0,2	
Genérico (M1)	0,3	Perda de, no máximo, < 1,5%
Genérico (M2)	0,3	
Genérico (S)	0,2	
Genérico (P)	0,2	

Deste modo, os comprimidos analisados estão de acordo com o preconizado nas Farmacopeias Brasileira (2019) e Americana (2019). Os resultados obtidos corroboram com os achados de Kumar e colaboradores (2016) e Kumar e Basava Rao (2016), na Índia e Moghal e colaboradores (2016) em Bangladesh, que analisaram comprimidos contendo alopurinol.

#### 5.4.4 Determinação do tempo de desintegração em comprimidos de alopurinol

Todos os comprimidos testados se desintegraram antes dos 30 minutos (Tabela 15) e, portanto, cumpriram o teste, com destaque para os comprimidos dos genéricos (M1) e

(M2), que apresentaram os mais reduzidos tempos de desintegração, 1'50" e 1'10", respectivamente.

**Tabela 15** - Resultado do teste de desintegração em comprimidos de alopurinol

<b>Medicamento</b>	<b>Tempo de desintegração (em minutos e segundos)</b>	<b>Especificação</b>
Referência (Z1)	5' 35" ( $\pm 0,03$ )	
Referência (Z2)	4' 40" ( $\pm 0,05$ )	
Genérico (M1)	1' 50" ( $\pm 0,12$ )	Desintegração total até 30'
Genérico (M2)	1' 10" ( $\pm 0,07$ )	
Genérico (S)	4' 50" ( $\pm 0,13$ )	
Genérico (P)	3' 29" ( $\pm 0,11$ )	

Tempos de desintegração diferentes podem estar relacionados a diversos fatores tecnológicos da produção de medicamentos, tais como a dureza e a composição das formulações dos medicamentos, como por exemplo a utilização de agentes desintegrantes na formulação, que podem estar diretamente associados ao processo de descompactação do pó comprimido (ZAMAN *et al.*, 2016). Cabe ressaltar que quando mais rápida for a desintegração, mais rápido este fármaco poderá estar disponível para ser dissolvido no meio reacional e, posteriormente, absorvido no organismo, tornando-se biodisponível. Variações muito amplas nos tempos de desintegração podem induzir a uma diferença no perfil de dissolução de medicamentos e, portanto, devem ser levados em consideração no desenvolvimento de medicamentos genéricos (MARKL; ZEITLER, 2017). Os resultados desse estudo mostraram-se concordantes com os de Kumar e colaboradores (2016) e Kumar e Basava Rao (2016), na Índia e Moghal e colaboradores (2016), em Bangladesh.

#### **5.4.5 Uniformidade de doses unitárias em comprimidos de alopurinol**

Os medicamentos apresentaram uniformidade de doses quando avaliados pelo método de variação de peso, nos dois métodos desenvolvidos (Tabelas 16 e 17).

**Tabela 16** – Valores, média e critério de aceitação do teste de uniformidade de conteúdo (método de variação de peso) de comprimidos de alopurinol, empregando a espectrofotometria de absorção molecular na região do UV.

<b>Comprimidos</b>	<b>Z1 (%)</b>	<b>Z2 (%)</b>	<b>M1 (%)</b>	<b>M2 (%)</b>	<b>S (%)</b>	<b>P (%)</b>
1	99,79	99,89	99,92	99,99	98,21	99,78
2	100,12	97,80	99,58	99,06	98,67	99,85
3	100,34	100,05	99,69	99,39	99,93	99,26
4	100,40	98,25	99,80	100,25	99,01	99,41
5	100,12	99,62	99,35	99,45	97,64	99,89
6	99,95	97,24	99,46	99,12	99,07	99,98
7	98,79	98,40	99,40	99,80	98,84	99,00
8	99,51	98,74	99,86	98,96	100,28	99,50
9	100,01	99,18	99,12	99,94	101,54	99,94
10	100,45	98,36	99,29	99,41	98,61	99,37
Média	99,95	98,75	99,55	99,54	99,18	99,60
Desvio padrão	0,50	0,92	0,27	0,44	1,13	0,33
Valor de aceitação	1,20	2,21	0,64	1,05	2,70	0,80

**Tabela 17** – Valores, média e critério de aceitação do teste de uniformidade de conteúdo (método de variação de peso) de comprimidos de alopurinol, empregando a CLAE.

<b>Comprimidos</b>	<b>Z1 (%)</b>	<b>Z2 (%)</b>	<b>M1 (%)</b>	<b>M2 (%)</b>	<b>S (%)</b>	<b>P (%)</b>
1	99,74	99,87	100,35	100,31	98,36	100,10
2	100,07	97,78	100,01	99,37	98,82	100,18
3	100,29	100,03	100,12	99,70	100,09	99,59
4	100,35	98,23	100,24	100,56	99,17	99,73
5	100,07	99,60	99,78	99,76	97,78	100,21
6	99,90	97,22	99,89	99,43	99,22	100,31
7	98,74	98,38	99,84	100,11	98,99	99,33
8	99,46	98,72	100,29	99,27	100,43	99,83
9	99,96	99,16	99,55	100,25	101,70	100,27
10	100,40	98,34	99,72	99,72	98,76	99,70
Média	99,90	98,73	99,98	99,85	99,33	99,92
Desvio padrão	0,50	0,92	0,27	0,44	1,13	0,33
Valor de aceitação	1,20	2,21	0,64	1,05	2,71	0,80

Para a definição do valor de aceitação para o teste de uniformidade de conteúdo foi empregado o valor de  $k = 2,4$  (valor tabelado para determinações com 10 unidades de comprimido) multiplicado pelo desvio padrão (Equação 16). De acordo com a Farmacopeia Brasileira (2019), este valor calculado não pode ser maior que 15,0 (BRASIL, 2019c). A partir destes resultados foi possível afirmar que os medicamentos analisados possuíam uniformidade de doses na produção e, estes lotes produzidos, possuem a qualidade suficiente para serem comercializados, com base nesse critério.

#### 5.4.6 Doseamento de alopurinol (comprimidos)

Os medicamentos testados apresentaram resultado dentro da especificação (93,0 a 107,0 %), segundo a Farmacopeia Brasileira (2019) (Tabela 18).

**Tabela 18** – Doseamento de alopurinol (comprimidos) empregando os métodos desenvolvidos.

Produto	Espectrofotometria (%)	Cromatografia líquida de alta eficiência (%)
Z1	100,01 ( $\pm 0,12$ )	99,96 ( $\pm 0,15$ )
Z2	99,67 ( $\pm 0,25$ )	99,65 ( $\pm 0,20$ )
M1	99,12 ( $\pm 0,10$ )	99,55 ( $\pm 0,19$ )
M2	99,45 ( $\pm 0,14$ )	99,76 ( $\pm 0,23$ )
S	98,90 ( $\pm 0,19$ )	99,05 ( $\pm 0,13$ )
P	101,10 ( $\pm 0,16$ )	101,43 ( $\pm 0,15$ )

Este ensaio foi realizado, também, por Kumar e colaboradores (2016); Kumar e Basava Rao (2016), na Índia e Lago, Pereira e Bertol (2012), no Brasil. Os dados obtidos neste trabalho foram concordantes com os autores supracitados.

## 5.5 Estudos de Degradação

### 5.5.1 Hidrólise ácida

Os medicamentos (comprimidos) contendo alopurinol (100 e 300 mg) e substância química de referência apresentaram degradação inferiores a 10%, durante os 05 dias de teste (Tabela 19). Observou-se uma maior degradação do fármaco nos medicamentos P, M2 e M1, quando comparados aos outros medicamentos e SQR (Apêndice B, ver página 118).

**Tabela 19** – Teores de alopurinol (comprimidos e SQR) e degradação total encontrados no teste de degradação por hidrólise ácida (HCl 0,1 mol L<sup>-1</sup>, a 60 °C, por 5 dias).

Dia	SQR (%)	Z1 (%)	Z2 (%)	M1 (%)	M2 (%)	S (%)	P (%)
1	99,98	101,43	99,92	99,82	99,14	100,68	100,01
3	99,56	100,65	99,37	97,69	96,75	98,12	97,46
5	98,96	99,65	98,12	93,67	92,53	95,88	93,02
<b>Degradação (%)</b>	1,02	1,78	1,80	6,16	6,66	4,76	6,98

Os dados obtidos diferiram do estudo de Kharia; Vishwakarma e Singour (2018) que realizaram o estudo de degradação em comprimidos contendo alopurinol (100 mg) comercializados na Índia e detectaram degradação de 0,18% nas suas amostras. Também, diferiram do estudo de Singh e Gadhawala (2013), também na Índia, que encontraram uma degradação de 14,7%, nas suas amostras. Cabe destacar que nos dois estudos indianos, o meio utilizado para a hidrólise foi HCl 5,0 mol L<sup>-1</sup>, por 2 horas, tendo o primeiro sido executado a 80 °C e, o segundo estudo a temperatura foi de 100 °C. Enquanto, neste estudo o meio utilizado foi HCl 0,1 mol L<sup>-1</sup>, a 60 °C, por 5 dias. Desta forma, este estudo foi realizado numa condição mais branda que os estudos indianos, no aspecto concentração ácida, porém a exposição foi prolongada. Esta condição mais branda pode ter ocasionado uma menor perda do quantitativo de alopurinol quando comparado com de Singh e Gadhawala (2013).

Outra variável que diferiu, entre os estudos, foi a temperatura que, neste caso, não pode explicar, sozinha, as divergências de resultados. Pois, o presente estudo ao empregar uma temperatura inferior (60 °C), exibiu uma degradação de alopurinol mais elevada, que a obtida no estudo de Singh e Gadhawala (2013), que usaram uma temperatura de 80 °C. Ainda, o presente estudo apresentou uma degradação inferior que a encontrada pelo

estudo de Kharia; Vishwakarma e Singour (2018), que utilizaram uma temperatura mais elevada (100 °C). Sugere-se que esta degradação, encontrada neste estudo, possa estar associada aos processos de fabricação dos medicamentos (comprimidos) que podem ter utilizado diferentes lotes/fabricantes de IFAs. Discussões mais detalhadas não podem ser apresentadas, pois estas informações não estavam disponíveis nos produtos aqui pesquisados.

### 5.5.2 Hidrólise básica

Todas as amostras estudadas exibiram resultado abaixo de 10% de degradação ao longo dos 05 dias, em meio básico (Tabela 20 e Apêndice C, ver página 119).

**Tabela 20** – Teores de alopurinol (comprimidos e SQR) e degradação total encontrados no teste de degradação por hidrólise básica (NaOH 0,1 mol L<sup>-1</sup>, a 60 °C, por 5 dias).

Dia	SQR (%)	Z1 (%)	Z2 (%)	M1 (%)	M2 (%)	S (%)	P (%)
1	99,16	99,91	100,68	101,06	98,43	99,22	100,73
3	98,08	98,00	97,83	98,14	97,06	97,54	96,96
5	96,31	95,22	95,98	95,27	92,75	93,04	93,61
<b>Degradação (%)</b>	2,87	4,69	4,66	5,73	5,77	6,22	7,06

Em comparação com outros estudos publicados na literatura científica, que realizaram a degradação forçada por hidrólise básica em medicamentos contendo alopurinol, observou-se que exibem o mesmo comportamento apresentado na hidrólise básica. Entretanto, o presente estudo verificou uma porcentagem de degradação inferior àquelas encontradas por Singh e Gadhawala (2013), cerca de 13,1% e, Kharia; Vishwakarma e Singour (2018), cerca de 0,30%. Destaca-se que, nos estudos de Singh e Gadhawala (2013) houve uma maior degradação em meio ácido, quando comparado com o meio básico. Já, nos estudos de Kharia; Vishwakarma e Singour (2018), existiu uma degradação, mesmo que reduzida em meio básico, superior à hidrólise ácida; fato, também, observado no presente estudo. Este fato pode ser explicado pelo pH do meio, durante a hidrólise, uma vez que, segundo Venkataraman e Manasa (2018), esta variável influencia diretamente na formação de produtos de degradação.

### 5.5.3 Degradação por oxidação

No processo de degradação oxidativa, 03 produtos (M1, M2 e P) apresentaram degradação maior que 10% de alopurinol, durante os 05 dias de teste (Tabela 21). Observou-se que, neste o meio, ocorreram as maiores taxas de degradação de alopurinol, neste estudo (Apêndice D, ver página 120).

**Tabela 21** – Teores de alopurinol (comprimidos e SQR) e degradação total encontrados no teste de degradação oxidativa (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 3%, a 60 °C, por 5 dias)

Dia	SQR (%)	Z1 (%)	Z2 (%)	M1 (%)	M2 (%)	S (%)	P (%)
1	100,51	102,84	99,17	99,09	98,36	99,98	98,65
3	98,54	95,79	94,21	89,56	91,75	94,12	90,46
5	94,86	94,46	91,03	87,72	86,99	90,00	88,47
<b>Degradação (%)</b>	5,62	8,14	8,20	11,47	11,59	9,98	10,32

O estudo de Kharia; Vishwakarma e Singour (2018) apontou para uma maior degradação do alopurinol em meio oxidativo, apresentando 4,70% de degradação em meio de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 10%, em duas horas de ensaio a 60 °C. Singh e Gadhawala (2013) evidenciaram uma degradação de 13,8% de alopurinol, no mesmo meio oxidativo e concentração, em três horas e a 100 °C. Os achados deste estudo estão concordantes com os estudos supracitados.

### 5.5.4 Degradação térmica

Os medicamentos testados exibiram uma degradação reduzida (< 0,50%), com a exposição a temperatura de 80 °C, durante 5 dias (Tabela 22 e Apêndice E, ver página 121). Singh e Gadhawala (2013) encontraram degradação de 0,09%, enquanto a degradação, nos estudos de Kharia; Vishwakarma e Singour (2018) não foi detalhada. Desta forma, os achados deste estudo, foram similares aos dados descritos na literatura científica.

**Tabela 22** – Teores de alopurinol (comprimidos e SQR) e degradação total encontrados no teste de degradação térmica a 80 °C, por 5 dias).

<b>Dia</b>	<b>SQR (%)</b>	<b>Z1 (%)</b>	<b>Z2 (%)</b>	<b>M1 (%)</b>	<b>M2 (%)</b>	<b>S (%)</b>	<b>P (%)</b>
1	99,85	98,63	99,06	99,87	100,34	98,18	100,55
3	99,83	98,57	98,82	99,81	100,20	97,99	100,51
5	99,79	98,33	98,76	99,70	100,17	97,92	100,45
<b>Degradação (%)</b>	0,06	0,30	0,30	0,17	0,16	0,26	0,09

Insta salientar que além destas condições para a execução do teste de degradação forçada, existe a condição de estudo em fotólise, que neste estudo não foi possível realizar devido à falta de equipamento disponível para a execução do teste.

## 6 Conclusões

O desenvolvimento de estudos que visam a inovação em tecnologia, ofertando métodos que são ambientalmente sustentáveis é uma premissa da ciência deste milênio. Neste contexto, buscam-se processos que sejam capazes de atingir os resultados esperados com o menor impacto ambiental. Este estudo foi concebido com a premissa de ofertar inovações tecnológicas capazes de avaliar a qualidade dos medicamentos (comprimidos) contendo (100 e 300 mg) de alopurinol, pensando sempre no menor consumo de produtos tóxicos aos seres humanos e ao ambiente, em geral. Desta forma, destaca-se neste estudo, que:

- Foi possível desenvolver um método analítico para quantificação de alopurinol em comprimidos empregando a espectrofotometria de absorção molecular, na região do UV, aplicando-o nos ensaios de dissolução e doseamento de medicamentos comercializados na Bahia.
- Foi possível desenvolver um método analítico para quantificação de alopurinol em comprimidos empregando a cromatografia líquida de alta eficiência, aplicando-o nos ensaios de dissolução e doseamento de medicamentos comercializados na Bahia.
- Nas análises qualitativas todos os medicamentos analisados cumpriram os testes e, neste quesito, estão aptos para a comercialização.
- Foi possível otimizar o método de dissolução de alopurinol (comprimidos), reduzindo (em 10 vezes) a concentração de HCl de  $0,01 \text{ mol L}^{-1}$  para  $0,001 \text{ mol L}^{-1}$ , diminuindo a quantidade de solventes e, portanto, contribuindo com os princípios da química verde.
- Os medicamentos genéricos (comprimidos contendo 100 mg e 300 mg) apresentaram perfis de dissolução semelhantes aos medicamentos referência, nas mesmas dosagens.
- Os medicamentos (genéricos e referência) apresentaram cinética de dissolução de primeira ordem, sendo possível o estabelecimento, também, da meia vida de dissolução, a constante da velocidade de dissolução, a quantidade de alopurinol dissolvida em 45 minutos e a eficiência de dissolução, nas condições determinadas no ensaio.
- Foi possível estimar o perfil de degradação dos medicamentos em meio ácido, básico, oxidante e térmico.

- Os métodos desenvolvidos para a quantificação de alopurinol em comprimidos poderão ser utilizados pela indústria farmacêutica, comunidade científica e agências regulatórias de saúde para avaliação da qualidade dos medicamentos comercializados no país, contribuindo para o acesso e utilização racional destes medicamentos.
- Destaca-se como produto desta dissertação de Mestrado, o trabalho intitulado “*Development and Validation of Quality Control Analytical Methods for Allopurinol Tablets*”, que foi apresentado no 12<sup>th</sup> *International Congress of Pharmaceutical Sciences* (CIFARP) de 2019 e a confecção de artigos científicos estão em fase de redação final para submissão a periódicos qualificados.

## REFERÊNCIAS

- ALGHADI, R. Y.; HAMADELNIEL, E. I. Biowaiver studies of seven generic brands of allopurinol (100 mg) tablets available in Sudanese Market. **Saudi Journal of Medical and Pharmaceutical Sciences**, Dubai, v. 3, n.11B, p. 1230-1236, Nov, 2017.
- ALLEGRI, F.; OLIVIERI, A. C. IUPAC-Consistent Approach to the Limit of Detection in Partial Least-Squares Calibration. **Analytical Chemistry**, EUA, v. 15, n 86, p. 7858-7866, jul. 2014.
- AMIN, A. S.; AL-MALAH, Z. Colorimetric assay of tobramycin sulfate in bulks and in dosage forms, **Journal of Applied Chemical Science International**, v. 8, n. 1, p. 32-39, jul. 2017.
- AMMAR, A. A.; SAMY, A. M.; MARZOUK, M.A.; AHMED, M. K. Formulation, characterization and biopharmaceutical evaluation of allopurinol tablets. **International Journal of Biopharmaceutics**, v. 2, n. 2, p. 63-71, 2011.
- AZEVEDO, Valderilio Feijó et al. Critical revision of the medical treatment of gout in Brazil. **Revista Brasileira Reumatologia**, São Paulo, v. 57, n. 4, p. 346-355, 2017.
- BARACHE, U. B.; SHAIKH, A. B.; LOKHANDE, T. N.; ANUSE, M. A.; KAMBLE, G. S.; GURAME, V. M.; GAIKWAD, S.H. Acid switched efficient, cost effective, selective separation and determination of selenium (IV). **Journal of Environmental Chemical Engineering**, v. 5, n. 5, p. 4828-4840, 2017.
- BARDIN, T.; RICHETTE, P. Definition of hyperuricemia and gouty conditions. **Current Opinion in Rheumatology**, v. 26, n. 2, p. 186-191, 2014.
- BARTOLI, F.; COCRANO, C.; CLERICI, M.; CARRÀ, G. Allopurinol as add-on treatment for mania symptoms in bipolar disorder: systematic review and meta-analysis of randomised controlled trials. **The British Journal of Psychiatry**, v. 210, p. 10-15, 2017
- BIANCHINI, A. E.; GARLET, Q. I.; RODRIGUES, P.; SOUZA, C. F.; SILVA, L. L.; DOS SANTOS, A. C.; HEINZMANN, B. M.; BALDISSEROTTO, B. Pharmacokinetics of S-(+)-linalool in silver catfish (*Rhamdia quelen*) after immersion bath: An anesthetic for aquaculture. **Aquaculture**, v. 506, n. 15, p. 302-307, mai. 2019.
- BLESSY, M.; PATEL, R. D.; PRAJAPATI, P. N.; AGRAWAL, Y. K. Development of forced degradation and stability indicating studies of drugs – a review. **Journal of Pharmaceutical Analysis**, v. 4, n. 3, p. 159-165, 2014.
- BOADU, R. F.; AGYARE, C.; ADARKWA-YIADOM, M.; ADU, F.; BOAMAH, V.E.; BOAKYE, Y. D. In vitro Activity and Evaluation of Quality of Some Selected Penicillins on the Ghanaian Market using Developed HPLC Methods. **Medicinal Chemistry**. v. 5, n. 1, p. 1-14, 2015.
- BONFILIO, R.; CAZEDEY, E. C. L.; DE ARAÚJO, M. B.; SALGADO, H. R. N. Analytical Validation of Quantitative High-Performance Liquid Chromatographic Methods in Pharmaceutical Analysis: A Practical Approach. **Analytical Chemistry**. EUA, v. 42, n. 1, p. 87-100, 2012.
- BRASIL. Lei Federal nº 9.787, de 10 de fevereiro de 1999. **Altera a Lei no 6.360, de 23 de setembro de 1976, que dispõe sobre a vigilância sanitária, estabelece o medicamento genérico, dispõe sobre a utilização de nomes genéricos em produtos farmacêuticos e dá**

**outras providências.** Diário Oficial da Republica Federativa do Brasil. Brasília. p. 1, 11 de fevereiro de 1999.

BRASIL. Resolução-RDC Nº 134, de 29 de maio de 2003. Dispõe sobre a adequação dos medicamentos já registrados. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil.** Brasília. Nº 104. p. 27-29, 2 de junho de 2003.

BRASIL, Resolução-RDC Nº 37, de 06 de julho de 2009. Trata da admissibilidade das Farmacopeias estrangeiras. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil.** Brasília, p. 1, 07 de julho de 2009.

BRASIL. Resolução-RDC Nº 31, de 11 de agosto de 2010. Dispõe sobre a realização dos Estudos de Equivalência Farmacêutica e de Perfil de Dissolução Comparativo. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil.** Brasília. 11 de agosto de 2010.

BRASIL. Resolução-RDC Nº 58, de 10 de outubro de 2014. Dispõe sobre as medidas a serem adotadas junto à Anvisa pelos titulares de registro de medicamentos para a intercambialidade de medicamentos similares com o medicamento de referência. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil.** Brasília. 10 de outubro de 2014.

BRASIL. Resolução-RDC Nº 53, de 04 de dezembro de 2015. Estabelece parâmetros para a notificação, identificação e qualificação de produtos de degradação em medicamentos com substâncias ativas sintéticas e semissintéticas, classificados como novos, genéricos e similares, e dá outras providências. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil.** Brasília. Nº 234. p. 53, 08 de dezembro de 2015.

BRASIL. Resolução-RDC Nº 80, de 30 de maio de 2016. Dispõe sobre oficialização de novos lotes de substâncias químicas de referência da Farmacopeia Brasileira. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil.** Brasília. Nº 102. p. 39, 31 de maio de 2016.

BRASIL. Resolução-RDC Nº 171, de 22 de agosto de 2017. Revisa a aplicabilidade da Resolução da Diretoria Colegiada - RDC nº 53, de 4 de dezembro de 2015, para alterações pós-registro e os prazos desta Resolução para produtos já registrados. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil.** Brasília. Nº 163. p. 51, 24 de agosto de 2017.

BRASIL. Resolução-RDC Nº 200, de 26 de dezembro de 2017. Dispõe sobre os critérios para a concessão e renovação do registro de medicamentos com princípios ativos sintéticos e semissintéticos, classificados como novos, genéricos e similares e dá outras providências. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil.** Brasília. Nº 20. p. 63-71, 29 de janeiro de 2018b.

BRASIL. Resolução-RDC Nº 166, de 24 de julho de 2017. Dispõe sobre a validação de métodos analíticos e dá outras providências. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil.** Brasília. Nº 141. p. 87, 25 de julho de 2017c.

BRASIL, Boletim informativo da Câmara de Regulação do mercado de medicamentos da Agência Nacional de Vigilância Sanitária 1º Trimestre 2017. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/documents/374947/3413536/Boletim+Informativo+CMED+-+1%C2%BA+trimestre+de+2017/c8f1c3d3-7dc7-4eb6-a9fd-c1164e14f519>. Acessado em 23 de dezembro de 2019.

- BRASIL. **Registro de medicamentos alopurinol**. Brasília: ANVISA, 2019. <https://consultas.anvisa.gov.br/#/medicamentos/q/?substancia=624&situacaoRegistro=V>. acessado em 23 de dezembro 2019a.
- BRASIL. Resolução-RDC Nº 301, de 21 de agosto de 2019. Dispõe sobre as Diretrizes Gerais de Boas Práticas de Fabricação de Medicamentos. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**. Brasília. Nº 162. p. 64, 22 de agosto de 2019b
- BRASIL. **Farmacopeia Brasileira**. 6ª edição, Brasília: ANVISA, 2019c.
- BRASIL. Resolução-RDC Nº 308, de 27 de setembro de 2019. Altera a Resolução da Diretoria Colegiada - RDC nº 255, de 10 de dezembro de 2018. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**. Brasília. 30 de setembro de 2019d.
- BRASIL, **Bulário da Anvisa: bula do Zyloric®**. Brasília: ANVISA, 2019e. Disponível em: <[http://www.anvisa.gov.br/datavisa/fila\\_bula/frmVisualizarBula.asp](http://www.anvisa.gov.br/datavisa/fila_bula/frmVisualizarBula.asp)>. Acessado em 24 de dezembro de 2019e.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Ciência, Tecnologia, Inovação e Insumos Estratégicos em Saúde. Departamento de Assistência Farmacêutica e Insumos Estratégicos. Relação Nacional de Medicamentos Essenciais: **Rename 2020** [recurso eletrônico] / Ministério da Saúde, Secretaria de Ciência, Tecnologia, Inovação e Insumos Estratégicos em Saúde, Departamento de Assistência Farmacêutica e Insumos Estratégicos. – Brasília: Ministério da Saúde, 2020. 217 p.
- CABRAL, C. R. N. S.; LOPES, B. G. N.; GRANGEIRO JUNIOR, S.; MONTEIRO, D. B.; DOS SANTOS, B. A.; SANTANA, A. K. M. Development method of dissolution of the tablet pharmaceutical form of Benznidazole 12.5 mg Lafepe. **Brazilian Journal of health Review**. Curitiba, v.2, n. 2, p. 2185-2194, mar./apr. 2019.
- CAZEDEY, E. C. L.; SALGADO, H. R. N. Development and validation of UV spectrophotometric method for orbifloxacin assay and dissolution studies. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**. v. 50, n. 3, p. 457-466, 2014.
- CHEMICALIZE, **Allopurinol**, United States of America, 2019. Disponível em: <<https://chemicalize.com/app/calculation/O%3DC1N%3DCN%3DC2NNC%3DC12>> acessado em 23 de dezembro de 2019.
- COELHO, E. R. C.; LEAL, W. P.; DE SOUZA, K. B.; DO ROZÁRIO, A.; ANTUNES, P. W. P. Development and validation of analytical method for analysis of 2,4-D, 2,4-DCP and 2,4,5-T for monitoring of public water supply. **Engenharia Sanitária e Ambiental**, v. 23, n. 6, p. 1043-1051, 2018.
- CONCEIÇÃO, J.; PITA, J. R.; CABRAL-MARQUES, H. M.; LOBO, J. M. S. The European Pharmacopoeia: an official book with fifty years. **Acta Farmacêutica Portuguesa**, v. 8, n. 1, p. 17-38, 2019.
- CONCEIÇÃO, A. P.; SÁ, R. R.; DA SILVA, V. C.; FERREIRA, M. S.; CAZEDEY, E. C. L.; MAGALHÃES, H. I. F.; SANTOS JÚNIOR, A. F. A Comparative Study of Propranolol Release by In Vitro Dissolution Profiles in Pharmaceutical Formulations. **Dissolution Technologies**, v. 25, p. 54-61, 2018.

DA SILVA, C. G. A.; COLLINS, C. H. Aplicações de cromatografia líquida de alta eficiência para o estudo de poluentes orgânicos emergentes. **Química nova**, v. 34, n. 4, p. 665-676, 2011.

DDFINT, **Classificação biofarmacêutica do alopurinol**. United States of America, 2019, Disponível em: <<http://www.ddfint.net/results.cfm>> acessado em 25 de dezembro de 2019.

DE BRUM, T. F.; LAPORTA, L. V.; PONS JÚNIOR, F. R.; GONÇALVES, C. A.; DOS SANTOS, M.R. Equivalência farmacêutica e estudo comparativo dos perfis de dissolução de medicamentos genéricos contendo paracetamol. **Journal of Basic and Applied Pharmaceutical Sciences**, v. 33, n. 3, p. 373-378, 2012.

DRUG BANK, **Allopurinol**, Canadá, 2019. Disponível em: <<https://www.drugbank.ca/drugs/DB00437>>. Acessado em 23 de dezembro de 2019.

FERREIRA, S. L. C.; CAIRES, A. O.; BORGES, T. S.; LIMA, A. M. D. S.; SILVA, L. O. B.; DOS SANTOS, W. N. L. Robustness evaluation in analytical methods optimized using experimental designs. **Microchemical Journal**, v. 131, p. 163-169, 2016.

GOICOECHEA, M.; GARCIA, V. S.; VERDALLES, U.; VERDE, E.; MACIAS, N.; SANTOS, A.; PÉREZ, J. A.; CEDEÑO, S.; LINHARES, T.; LUÑO, J. Allopurinol and progression of CKD and cardiovascular events: long-term follow-up of a randomized clinical trial. **American Journal Kidney Diseases**, v. 65, n. 4, p. 543-549, 2015.

HENRÍQUEZ, L. C.; REDONDO, G. M.; ZÚÑIGA, R. V.; BERROCAL, G. C. Design of Experiments for the Establishment of the Dissolution Test Conditions of Rupatadine Fumarate 10 mg tablets. **Journal of Drug Delivery and Therapeutics**, v. 9, n. 1-s, p. 331-336, 2019

JAGDALE, S. C.; KUCHEKAR, B. S.; CHABUKSWAR, A. R.; MUSALE, V. P.; JADHAO, M.A. Preparation and in vitro evaluation of Allopurinol-Gelucire 50/13 solid dispersions. **International Journal of Advances in Pharmaceutical Sciences**. v. 1, p. 60-67, 2010.

JAHANGIRIAN, H.; LEMRASKI, E. G.; WEBSTER, T. J.; RAFIEE-MOGHADDAM, R.; ABDOLLAHI, Y. A review of drug delivery systems based on nanotechnology and green chemistry: green nanomedicine. **International Journal of Nanomedicine**, v. 12, p. 2957-2978, 2017.

JP. **Japanese Pharmacopeia**, 17, 2019.

KHARIA, M.; VISHWAKAMA, K.; SINGOUR, P. K. forced degradation study for estimation of related substances and degradants in alopurinol tablet and its method validation using RP-HPLC. **Indo American Journal of Pharmaceutical Research**. v. 8. n. 6. p. 1367-73, 2018.

KOLLA, S. B.; VALLABHANENI, M. R.; PUTTAGUNTA, S. B.; VENKATA, M. S. Design of Experiments Approach to Discriminatory Dissolution Method Development of Poorly Soluble Drug in Immediate Release Dosage Form. **Indian Journal of Pharmaceutical Education and Research**, v. 53, n.3, p. 436-445, 2019.

KUMAR, G. V. BASAVA RAO, V. V. Design development and in vitro characterization of alopurinol fast dissolving tablets by using various super disintegrants. **Journal of Global Trends in Pharmaceutical Sciences**. v. 7. n.4. p. 3529-3535, 2016.

KUMAR, R.; NAIN, P.; KAUR, J.; SAINI, V.; SONI, V. Formulation and Evaluation of Immediate Release Tablets of Allopurinol. **International Journal Pharmacy & Pharmaceutical Research**, v. 6, n. 2, p. 238-248, 2016.

LAGO, V. V.; PEREIRA, R. N.; BERTOL, C. D. Propriedades micromeríticas e análise físico-química de matérias-primas de alopurinol. **Journal of Basic and Applied Pharmaceutical Sciences**, v. 33, n. 3, p. 385-393, 2012.

LI, P.; HUR, J. Utilization of UV-vis spectroscopy and related data analyses for dissolved organic matter (DOM) studies: review. **Critical Reviews in Environmental Science and Technology**, v. 47, n. 3, p. 131-154, 2017.

LIU, X.; NI, X. J.; SHANG, D. W.; ZHANG, M.; HU, J. Q.; QIU, C.; LUO, F. T.; WEN, Y. G. Determination of allopurinol and oxypurinol in human plasma and urine by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography B**, v. 941, p. 10-16, 2013.

LOMBARDO, M.; ESERIAN, J. K., A análise da qualidade de medicamentos e o papel do laboratório oficial no contexto da saúde pública. **Revista Administração em Saúde**, v.17, n. 67, 2017.

MARCO, B. A.; RECHELO, B. S.; TÓTOLI, E. G.; KOGAWA, A. C.; SALGADO, H. R. N. Evolution of green chemistry and its multidimensional impacts: review. **Saudi Pharmaceutical Journal**, v. 27, n.1, p. 1-8, 2019.

MARKL, D.; ZEITLER, A. A Review of Disintegration Mechanisms and Measurement Techniques. **Pharmaceutical Research**, v. 34, p. 890-917, 2017.

MARQUITO, A. B.; FERNANDES, N. M. S.; COLUGNATI, F. A. B.; PAULA, R. B. Identifying potential drug interactions in chronic kidney disease patients. **Jornal Brasileiro de Nefrologia**, v. 36, n. 1, p. 26-34, 2014.

MEHTA, F. A.; PATELIA, E. M.; BHOYA, P. N. Simultaneous Estimation of Ambroxol Hydrochloride and Doxofylline in Pharmaceutical Formulation by HPTLC-Desitometric Method. **Journal Chromatography Separation Techniques**, v. 4, n. 2, p. 1-4, 2013.

MOGHAL, M.R.; MAZUNDER, S. C.; LIRA, D. N.; ROUF, A. S. S. Fabrication and in vitro Evaluation of Allopurinol Fast Dissolving Tablets Using Croscarmellose Sodium, Sodium Starch Glycolate and Crospovidone as Superdisintegrants. **J. Pharm. Sci.** v. 15, n. 1, p. 73-81, 2016.

NOVAES, G. C.; BEZERRA, M. A.; DA SILVA, E. G. P.; DOS SANTOS, A. M. P.; ROMÃO, I. L. S.; SANTOS NETO, J. H.; A review of multivariate designs applied to the optimization of methods based on inductively coupled plasma optical emission spectrometry (ICP OES). **Microchemical Journal**, v. 128, p. 331-346, 2016.

OLIVIERI, A. C. Practical guidelines for reporting results in single- and multi-component analytical calibration: A tutorial. **Analytica Chimica Acta**, v. 868, p. 10-22, 2015.

OLIVIERI, A. C. Analytical figures of merit: from univariate multiway calibration. **American Chemical Society**, v. 114, n. 10, p. 5358-5378, 2014.

ORTIZ, M. C.; SARABIA, L. A.; SANCHEZ, M.S. Tutorial on evaluation of type I and type II errors in chemical analyses: from the analytical detection to authentication of products and process control. **Analytica Chimica Acta**, v. 674, n. 2, p. 123-142, 2010.

PESSANHA, A. F. V.; ROLIM, L. A.; PEIXOTO, M.S.; DA SILVA, R. M. F.; ROLIM NETO, P. J. Influence of functional excipients on the performance of drugs in dosage forms. **Brazilian Journal of Pharmacy**, v. 93, n. 2, p. 136-145, 2012.

POLLITIS, S. N.; COLOMBO, P.; COLOMBO, G.; REKKAS, D. M. Design of experiments (DoE) in pharmaceutical development. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, v. 43, n. 6, p. 889-901, 2017.

PUBCHEM, **Allopurinol**, United States of America, 2019. Disponível em: <<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Allopurinol>>. Acessado em 23 de dezembro de 2019.

RAJKUMAR, B.; BHAVYA, T.; ASHOK KUMAR A. Reverse phase HPLC method development and validation for the simultaneous quantitative estimation of alpha lipoic acid and alopurinol in tablets. **International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**. v. 6. n.1. p. 307-12, 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. **Journal of Pharmaceutical Analysis**. v. 7. p. 56-62, 2017.

REDASANI, V. K.; PATEL, P. R.; MARATHE, D. Y.; CHAUDHARI, S. R.; SHIRKHEDKAR, A. A.; SURANA, S. J. A review on derivative uv-spectrophotometry analysis of drugs in pharmaceutical formulations and biological samples review. **Journal of the Chilean Chemical Society**, v. 63, n. 3, p. 1-22, 2018.

REZENDE, H. P.; COSTA, B. E. S.; TAVARES, L. Q.; COELHO, L. M.; COELHO, N. M. M.; SOUSA, P. A. R.; NÉRI, T. S. **Application on flow-injection spectrophotometry to pharmaceutical and biomedical analyses**. Janesa, Croácia, 1 ed. 2017. Disponível em: <https://books.google.com.br/books?hl=pt-BR&lr=&id=l-mPDwAAQBAJ&oi=fnd&pg=PA193&dq=spectrophotometry+AND+pharmaceutical+analysis+AND+review+paper&ots=Gwtp1f9Us8&sig=9H2jxZiJCajqmisPg38LvD-JpKQ#v=onepage&q=spectrophotometry%20AND%20pharmaceutical%20analysis%20AND%20review%20paper&f=false>. Acessado em: 04 de janeiro de 2020.

ROCHA, F. A. C.; LANDIM, J. I. V. D.; ROCHA, L. M. Advances in Rheumatology Practice in Brazil. **Rheumatology International**, v. 39, p. 1125-1134, 2018.

RODRIGUES, V. C. **Desenvolvimento e validação de metodologia analítica para a determinação de fármacos em amostras de água, superficial e tratada, utilizando a cromatografia de ultra performance acoplada a espectrometria de massas Tandem (UPLCMMMS/MS)**. 91f. Dissertação de mestrado (Ciências na Área de Tecnologia Nuclear–Materiais) Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, São Paulo, 2011.

SABIR, A. M.; MOLOY, M.; PARMINDER, B. S. Hplc Method Development and Validaton: a Review. **International Research Journal of Pharmacy**, v. 4, n. 4, p. 39-46, 2013.

SAHU, P. K.; RAO, R. N.; CECCHI, T.; SWAIN, S.; PATRO, C. S.; PANDA, J. An Overview of Experimental Designs in HPLC Method Development and Validation. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 147, p. 590-611, 2017.

SANTOS, A. B. V.; PELOQUIM, C. E.; ZHANG, Y.; NEOGI, T. Association of Chronic Kidney Disease With Allopurinol Use in Gout Treatment. **JAMA Internal Medicine**, v. 178, n. 11, p. 1526-1533, 2018.

SANTOS, W. N. L.; SANTOS JUNIOR, A. F.; SILVA, L. O. B.; SANTOS, B. R. S.; DA SILVA, D. L. V. Multivariate optimization of a digestion procedure for bismuth determination in urine using continuous flow hydride generation and atomic fluorescence spectrometry. **Microchemical Journal**, v.130, p. 147-152, 2017.

SANTOS JUNIOR, A. F.; BARBOSA, I. S.; SANTOS, V. L.; SILVA, R. L.; CAETITE JUNIOR, Test of dissolution and comparison of in vitro dissolution profiles of coated ranitidine tablets marketed in Bahia, Brazil. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 50, p. 83-89, 2014.

SATTUI, S. E.; GAFFO, A. L. Treatment of hyperuricemia in gout: current therapeutic options, latest developments and clinical implications. **Therapeutic Advances in Musculoskeletal Disease**, v. 8, n. 4, p. 145-159, 2016.

SIDDIQUI, M. R.; ALOTHMAM, Z. A.; RAHMAN, N.; Analytical techniques in pharmaceutical analysis: A review. **Arabian Journal of Chemistry**, v. 10, n. 1, p. 1409-1421, 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.

SIRCAR, D.; CHATTERJEE, S.; WAIKHOM, R.; GOLAY, V. RAYCHAUDHURY, A.; CHATTERJEE, S.; PANDEY, R. Efficacy of Febuxostat for Slowing the GFR Decline in Patients With CKD and Asymptomatic Hyperuricemia: A 6-Month, Double-Blind, Randomized, Placebo-Controlled Trial. **American Journal of Kidney Diseases**, v. 66, n. 6, p. 945-950, 2015.

SIVERA, F.; ANDRÉS, M.; QUILIS, N. Gout: Diagnosis and treatment. **Medicina clínica**, v. 148, n. 6, p. 271-276, 2016.

SMETISKOVA, J.; MILJANIC, S. Dissolution assessment of allopurinol immediate release tablets by near infrared spectroscopy. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**. v. 145. p. 322-330, 2017.

STACK, A. G.; HANLEY, A.; CASSERLY, L. F.; CRONIN, C. J.; ABDALLA, A. A.; KIERNAN, T.J.; MURTHY, B. V.; HEGARTY, A. HANNIGAN, A.; NGUYEN, H. T. Independent and conjoint associations of gout and hyperuricaemia with total and cardiovascular mortality. **QJM**, v. 106, n. 7, p. 647-658, 2013.

TADA, H.; FUJISAKI, A.; ITOH, K.; SUZUKI, T. Facile and rapid high-performance liquid chromatography method for simultaneous determination of allopurinol and oxypurinol in

human sérum. **Journal of Clinical Pharmacy and Therapeutics**, v. 28, p. 229–234, 2003.

THAMMANA, M. A Review on High Performance Liquid Chromatography (HPLC). **Research & Reviews: Journal of Pharmaceutical Analysis**, v. 5, n. 2, p. 22-28, 2016.

IP. **The Internacional Pharmacopeia**, 9, 2019.

THOMSEN, S.B.; ALLIN, K. H.; BURISCH, J.; JENSEN, C. B.; HANSEN, S.; GLUUD, L. L.; THEEDE, K.; KISZKA-KANOWITZ, M.; NIELSEN, A. M.; JESS, T. Outcome of concomitant treatment with thiopurines and allopurinol in patients with inflammatory bowel disease: A Nationwide Danish cohort study. **United European Gastroenterology Journal**, v. 8, n. 1, p. 68-76, 2019.

USP. **United States Pharmacopeia**, 42, 2019.

VENKATARAMAN, S.; MANASA, M. Forced degradation studies: Regulatory guidance, characterization of drugs, and their degradation products - a review. **Drug Invention Today**, v. 10, n. 2, p. 137-146, 2018.

VIANA, L. C. M. G.; FERREIRA, M. S.; MATOS, R. A.; SILVA, V. C.; MOTA, M. D.; GUEDES, A. S.; MAGALHAES, H. Y. F.; SANTOS JÚNIOR, A. F. Comparison of in vitro dissolution profiles of Fluoxetine capsules marketed in Bahia, Brazil, using UV-spectrophotometric method. **Latin American Journal of Pharmacy**, v. 35, p.1503-1508, 2016.

VIGIACCESS, allopurinol, Suiça, 2019, disponível em: < <http://www.vigiaccess.org/>>. Acessado em 23 de dezembro de 2019.

WRIGHT, D. F. B.; DUFFULL, S. B.; MERRIMAN, T. R.; DALBETH, N.; BARCLAY, M. L.; STAMP, L. K. Predicting allopurinol response in patients with gout. **British Journal of Clinical Pharmacology**, v. 81, n. 2, p. 277-289, 2015.

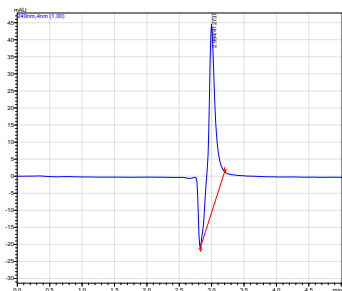
YI, L.; DONG, N.; YUN, Y.; DENG, B.; REN, D.; LIU, S.; LIANG, Y. Chemometric methods in data processing of mass spectrometry-based metabolomics: a review. **Analytica Chimica Acta**, v. 914, n. 31, p. 17-34, 2016.

ZAMAN, M.; QURESHI, J.; IJAZ, H.; SARFRAZ, R. M.; KHAN, H. U.; CHUGHTAI, F. R. S.; RAHMAN, M. S. U. Oral controlled release drug delivery system and Characterization of oral tablets; A review. **Pakistan Journal of Pharmaceutical Research**, v. 2, n.1, p. 67-76, 2016.

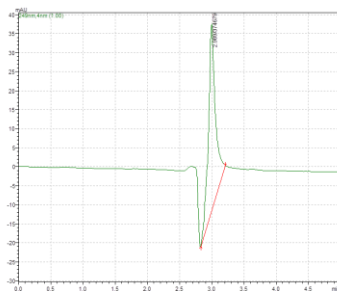
ZHANG, Y.; DENG, L.; WU, C.; ZHENG, L.; ZHONG G. Konjac glucomannan improves hyperuricemia through regulating xanthine oxidase, adenosine deaminase and urate transporters in rats. **Journal of Functional Foods**, v. 48, p. 566-575, 2018.

**APÊNDICE A.** Cromatogramas da SQR e medicamentos (comprimidos contendo alopurinol 100 e 300 mg), em HCl 0,1 mol L<sup>-1</sup>, nas condições ótimas do método CLAE desenvolvido.

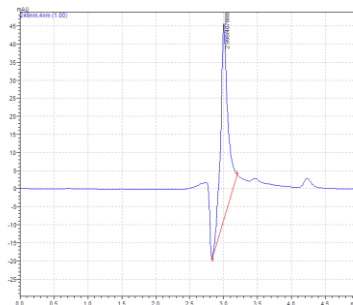
Substância química de referência (SQR)



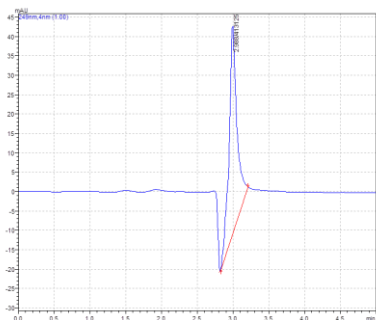
Medicamento Z1



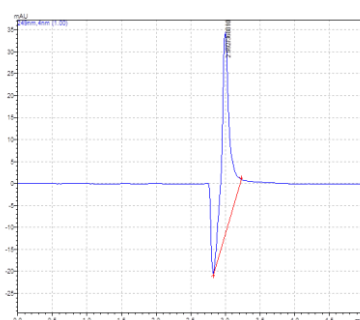
Medicamento Z2



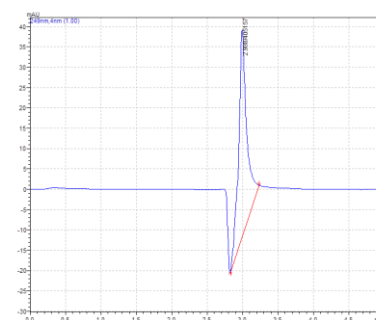
Medicamento M1



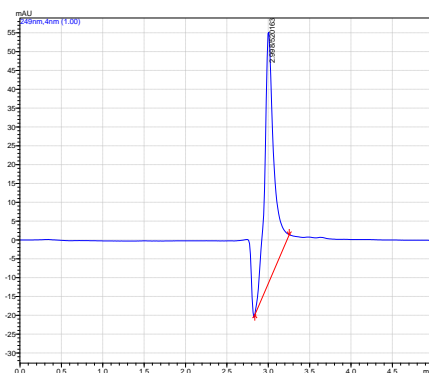
Medicamento M2



Medicamento S



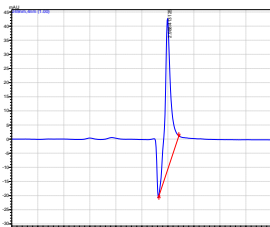
Medicamento P



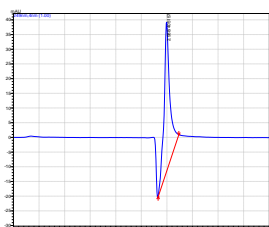
**APÊNDICE B.** Cromatogramas da degradação forçada por hidrólise ácida de medicamentos contendo alopurinol (comprimidos 100 e 300 mg) e SQR.

Substância química de referência

Dia 01

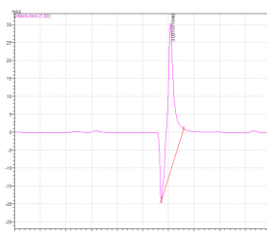


Dia 05

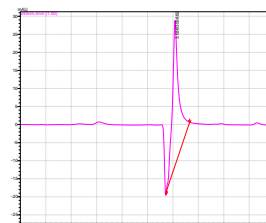


Medicamento Z1

Dia 01

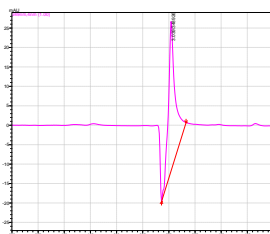


Dia 05

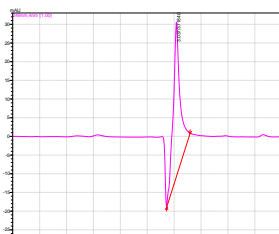


Medicamento Z2

Dia 01

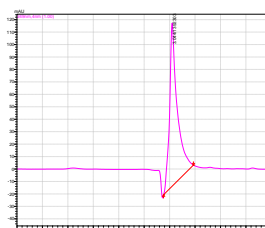


Dia 05

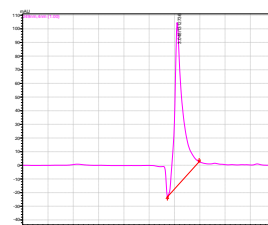


Medicamento M1

Dia 01

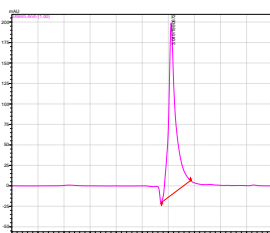


Dia 05

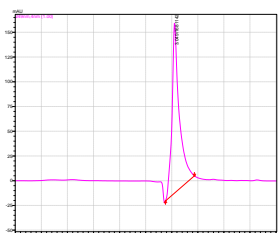


Medicamento M2

Dia 01

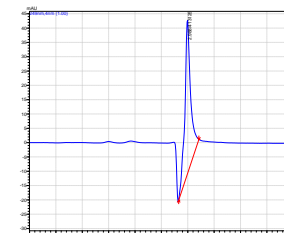


Dia 05

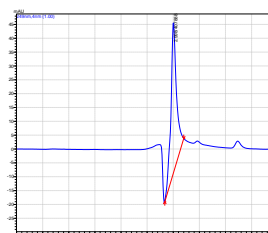


Medicamento S

Dia 01

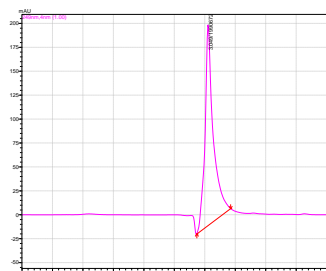


Dia 05

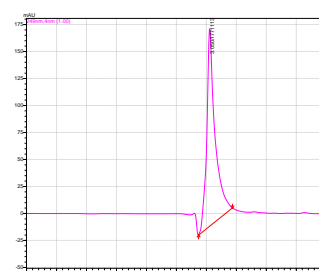


Medicamento P

Dia 01



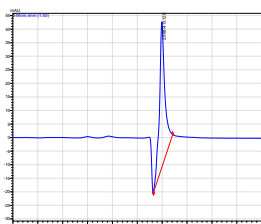
Dia 05



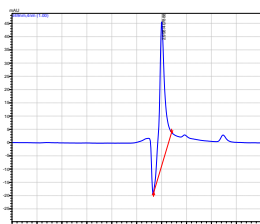
**APÊNDICE C.** Cromatogramas da degradação forçada por hidrólise básica de medicamentos contendo alopurinol (comprimidos 100 e 300 mg) e SQR.

Substância química de referência (SQR)

Dia 01

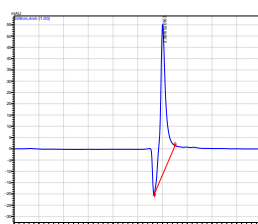


Dia 05

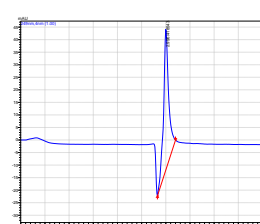


Medicamento Z1

Dia 01

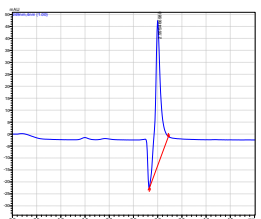


Dia 05

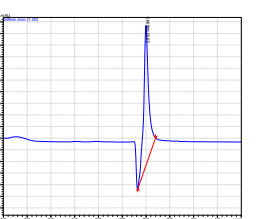


Medicamento Z2

Dia 01



Dia 05

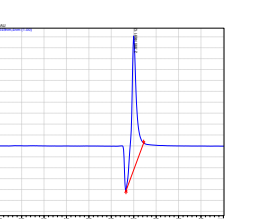


Medicamento M1

Dia 01

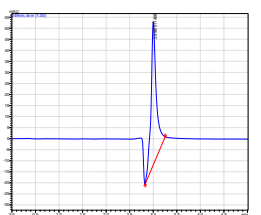


Dia 05

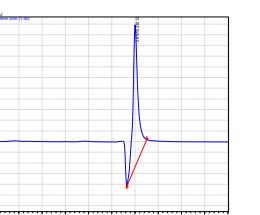


Medicamento M2

Dia 01

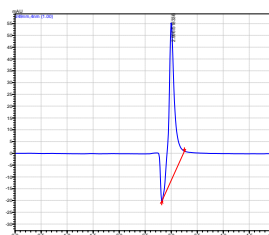


Dia 05

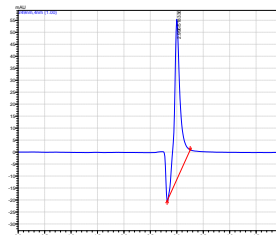


Medicamento S

Dia 01

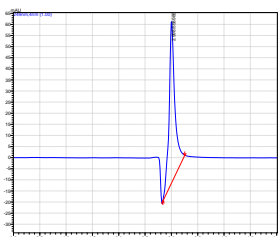


Dia 05

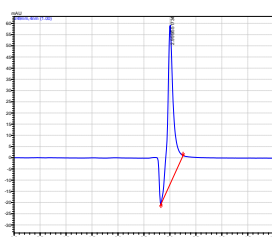


Medicamento P

Dia 01



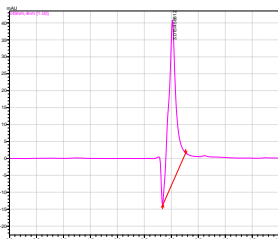
Dia 05



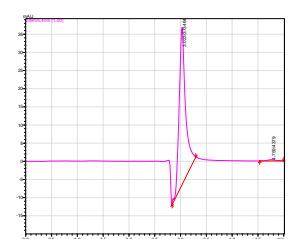
**APÊNDICE D.** Cromatogramas da degradação forçada por oxidação de medicamentos contendo alopurinol (comprimidos 100 e 300 mg) e SQR.

Substância química de referência (SQR)

Dia 01

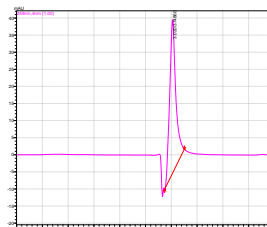


Dia 05

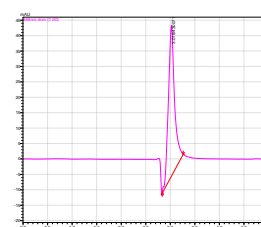


Medicamento Z1

Dia 01

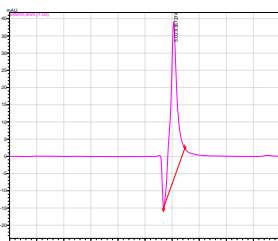


Dia 05

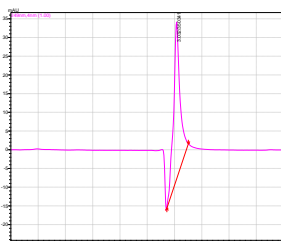


Medicamento Z2

Dia 01

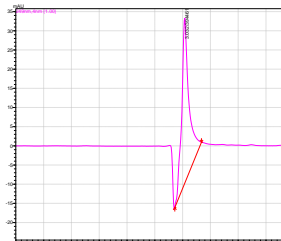


Dia 05

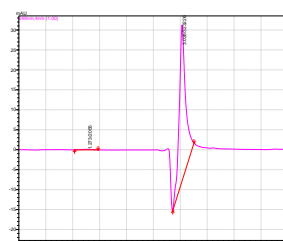


Medicamento M1

Dia 01

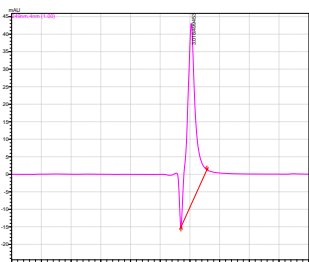


Dia 05

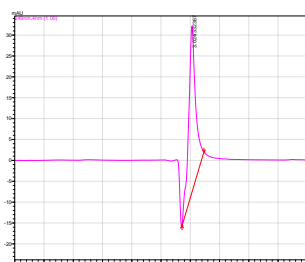


Medicamento M2

Dia 01

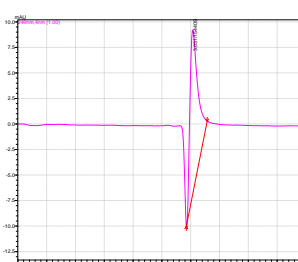


Dia 05

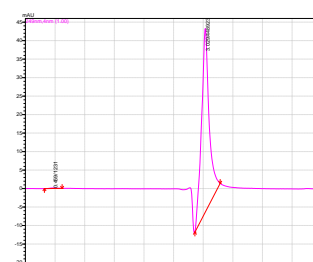


Medicamento S

Dia 01

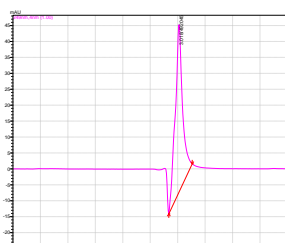


Dia 05



Medicamento P

Dia 01



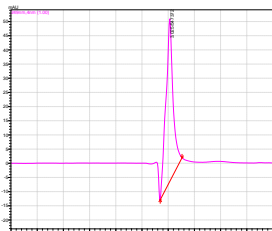
Dia 05



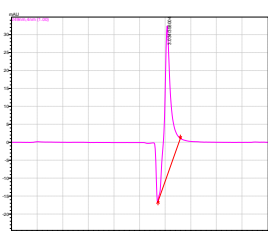
**APÊNDICE E.** Cromatogramas da degradação forçada térmica de medicamentos contendo alopurinol (comprimidos 100 e 300 mg) e SQR.

Substância química de referência (SQR)

Dia 01

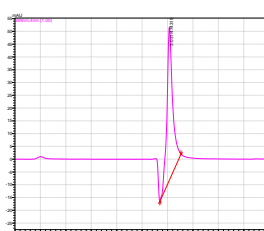


Dia 05

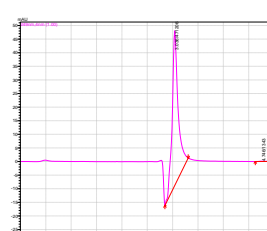


Medicamento Z1

Dia 01

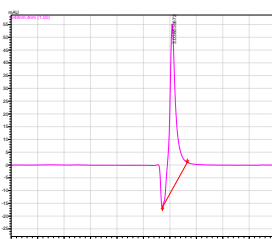


Dia 05

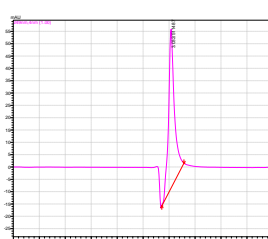


Medicamento Z2

Dia 01

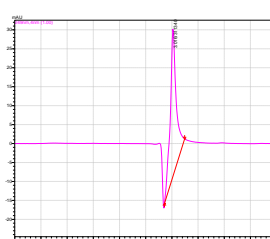


Dia 05

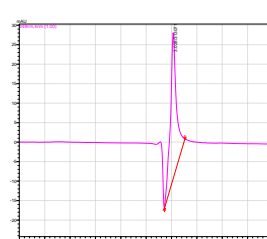


Medicamento M1

Dia 01

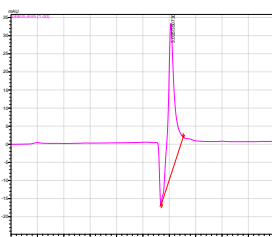


Dia 05

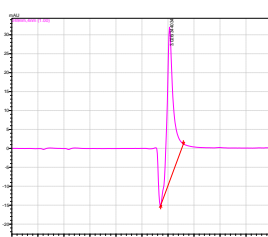


Medicamento M2

Dia 01

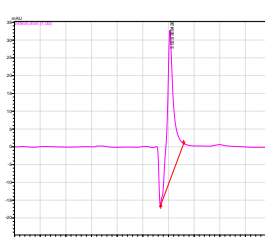


Dia 05

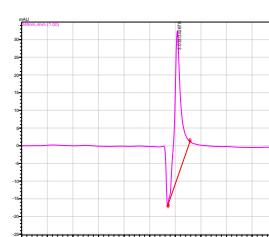


Medicamento S

Dia 01

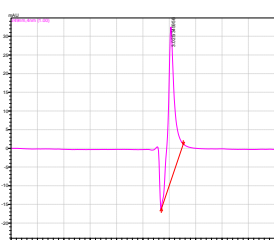


Dia 05



Medicamento P

Dia 01



Dia 05

