

Cristina Isabel da Cunha Silvestre

Licenciada em Bioquímica pela Universidade da Beira Interior

Metodologias automáticas para controlo de qualidade de formulações com alopurinol baseadas em biocatalisadores

Trabalho de Dissertação apresentada à
Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto
para a obtenção do grau de Mestre em Ciências da Farmácia
na área de especialização de Análises Farmacéuticas

FACULDADE DE FARMACIA
U. P.
BIBLIOTECA
Data 06/03/2007
Reg. 4799
Cota

6V707
SILVICI
L
4799

Faculdade de Farmácia
Universidade do Porto

Porto, 2006

Trabalho de Dissertação apresentado à
Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto
para a obtenção do grau de Mestre
em Controlo de Qualidade
na área de especialização de Ambiente

Trabalho realizado no serviço de Química - Física
da Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto

Índice

Agradecimentos	V
Resumo	VI
Abstract	VII
Lista de Abreviaturas	VIII
Organização Geral da Dissertação	IX
1. INTRODUÇÃO	1
1.1. Xantina Oxidase	2
1.2. Alopurinol	7
1.2.1. Indicações terapêuticas e mecanismo de acção	7
1.2.2. Metodologias utilizadas na determinação do alopurinol	10
1.3. Análise por injeção sequencial (SIA)	12
1.4. Enquadramento e objectivos do trabalho	20
2. PARTE EXPERIMENTAL	22
2.1. Reagentes e Soluções	23
2.2. Instrumentação e componentes do sistema SIA	26
2.3. Funcionamento do sistema SIA	28
2.4. Estudo das variáveis e avaliação das características de funcionamento do método	31
2.5. Metodologia utilizada como referência	33
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	34
3.1. Metodologia SIA para determinação a tempo fixo	35
3.1.1. Estudo dos parâmetros físico-químicos	36
3.1.2. Parâmetros de calibração do sistema	47
3.1.3. Estudo de interferentes	49
3.2. Metodologia SIA para determinação cinética	51
3.2.1. Estudo dos parâmetros físico-químicos	53
3.2.2. Parâmetros de calibração do sistema	65
3.3. Aplicação às amostras	66
4. CONCLUSÕES	69
REFERÊNCIAS	73

Agradecimentos

Agradeço a Deus por ser uma constante presença na minha vida.

*“Quando o estudante está preparado, o professor aparece, nem um momento antes,
nem um momento depois.”*

Gostaria de agradecer ao Professor Doutor José Luís Fontes da Costa Lima, à Doutora Lúcia Saraiva e à Doutora Marcela Segundo pela atenção, paciência e amizade, bem como, pelo tempo disponibilizado e por tudo aquilo que me ensinaram, não só no âmbito profissional mas também a nível pessoal. Todos contribuíram de forma imprescindível para a realização deste trabalho, através de um apoio pedagógico e científico excelente. Espero sinceramente ter correspondido às vossas expectativas.

Quero agradecer à Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto e, em especial ao Serviço de Química-Física, por me ter admitido como aluna de Mestrado.

Gostaria também de agradecer e, sem menos importância:

A toda a minha família, em especial, aos meus pais e irmão pelo inesgotável carinho, pela força e coragem que sempre me deram e pelo apoio incondicional.

Ao Ricardo pelo carinho, compreensão e por todo o incentivo e apoio incondicional.

Ao Rodrigo, à Marieta, ao Hugo, ao Matias, ao André e a todos os colegas do Departamento de Química-Física pelo excelente ambiente de trabalho, pela amizade, pelo companheirismo, pela ajuda prestada sempre que necessário e pela partilha de bons momentos.

A todos os que contribuíram, de alguma forma, para a realização deste trabalho.

Dedico este trabalho ao meu querido avô que, muito embora já não esteja presente entre nós, fará sempre parte de mim e estará sempre no meu coração.

Cristina Isabel da Cunha Silvestre

Resumo

No âmbito desta dissertação, desenvolveram-se duas metodologias de análise por injeção sequencial para a determinação de alopurinol em preparações farmacêuticas.

A determinação baseia-se na detecção espectrofotométrica a 295 nm do ácido úrico formado a partir da catálise enzimática da xantina pela xantina oxidase. Na presença de alopurinol, esta reacção é inibida. Assim, o alopurinol foi determinado em preparações farmacêuticas pela sua capacidade de inibição da reacção mencionada.

As metodologias desenvolvidas denominaram-se de tempo fixo e cinética e permitiram a determinação de alopurinol com uma boa repetibilidade (DPR = <2,4% e <2,2%, respectivamente) e com uma frequência de 15 e 34 determinações por hora, respectivamente. Estas metodologias forneceram resultados estatisticamente comparáveis com os obtidos recorrendo ao método de referência.

Ambas as metodologias propostas permitem a rápida quantificação de alopurinol pelo que podem ser aplicadas no controlo de qualidade diário em larga escala, para além de utilizarem baixas quantidades de reagentes e produzirem volumes reduzidos de efluentes, o que as torna ainda mais atractivas em termos ambientais.

Abstract

In the present work, two methodologies based in sequential injection analysis were developed for the determination of allopurinol in pharmaceutical formulations.

The determination is based on the spectrophotometric detection at 295 nm of the uric acid formed in the enzymatic catalysis of xanthine by xanthine oxidase. In the presence of allopurinol this reaction is inhibited. Therefore, allopurinol was quantified based on its ability to inhibit the mentioned reaction.

The proposed methodologies, named "fixed-time" and "kinetic", allowed the determination of allopurinol with a good precision (RSD = <2,4% e <2,2%, respectively) and with a determination frequency of 15 h⁻¹ and 34 h⁻¹, respectively. The results obtained by the developed methodologies were statistically comparable to those provided by the reference method.

Both proposed methodologies allow the rapid quantification of allopurinol, which makes them useful in diary quality control in large scale. For more over, they spend low quantities of reagents and produce reduced volumes of effluents, turning them more attractive for the environment.

Lista de Abreviaturas

ATP - adenosina trifosfato

DPR - desvio padrão relativo

DR - desvio relativo

EDTA - ácido etilenodinitrilotetracético

FAD - flavina adenina dinucleótido

FIA - análise por injeção em fluxo

LD - limite de detecção

NAD - nicotinamida adenina dinucleótido

PTFE - politetrafluoroetileno

PVC - poli(cloreto de vinilo)

SIA - análise por injeção sequencial

XDH - xantina desidrogenase

XO - xantina oxidase

XOR - xantina oxidoreductase

Organização Geral da Dissertação

A presente dissertação encontra-se organizada em quatro capítulos.

No capítulo 1, designado *Introdução*, é feita uma abordagem às características e função biológica da xantina oxidase. É contextualizada a importância da utilização de alopurinol quando ocorrem disfunções como hiperuricemia, assim como o seu mecanismo de acção. São referidas as metodologias utilizadas na determinação de alopurinol em preparações farmacêuticas, visando o seu controlo de qualidade. Apresenta-se a análise por injeção sequencial, técnica utilizada neste trabalho. Na parte final deste capítulo é dado a conhecer o enquadramento e as motivações para a realização deste trabalho.

O capítulo 2, *Parte Experimental*, compreende os aspectos de natureza experimental, nomeadamente, a preparação de soluções utilizadas na execução das metodologias analíticas, o equipamento e material de laboratório utilizado na concepção e desenvolvimento das montagens. É ainda descrito o método de referência utilizado e os parâmetros que permitiram caracterizar as metodologias propostas.

No capítulo 3, *Resultados e Discussão*, faz-se a descrição e discussão detalhada das diferentes etapas do desenvolvimento e optimização das metodologias propostas. Apresenta-se os resultados da sua aplicação na determinação de alopurinol em preparações farmacêuticas e a sua comparação com os resultados obtidos com o método de referência.

No capítulo 4, *Conclusões*, são mencionados os aspectos que se consideraram mais relevantes no trabalho efectuado. Compararam-se as duas metodologias propostas entre si e com o método de referência. São ainda mencionadas algumas limitações e potencialidades das metodologias propostas e a sua aplicação em determinações de rotina.

1. INTRODUÇÃO

1.1. Xantina Oxidase

A xantina oxidase (XO; EC 1.1.3.22) e a xantina desidrogenase (XDH; 1.1.1.204) são formas interconvertíveis do mesmo produto genético, conhecido como xantina oxidoreductase (XOR) [Ichida *et al*, 1993].

Estas enzimas são flavoproteínas complexas constituídas por duas subunidades idênticas e cataliticamente independentes de aproximadamente 145 kDa. Cada subunidade contém um centro de molibdénio, dois centros de ferro-enxofre (Fe-S) e uma flavina adenina dinucleótido (FAD).

Em mamíferos a XDH é a enzima predominante. No entanto, esta é facilmente convertida em XO por proteólise ou por oxidação reversível das cisteínas em cistinas, ocorrendo alterações conformacionais significativas ao nível da FAD, resultando em mudanças na reactividade da flavina, assim como, a perda do local de ligação da NAD (figura 1.1) [Borges *et al*, 2002].

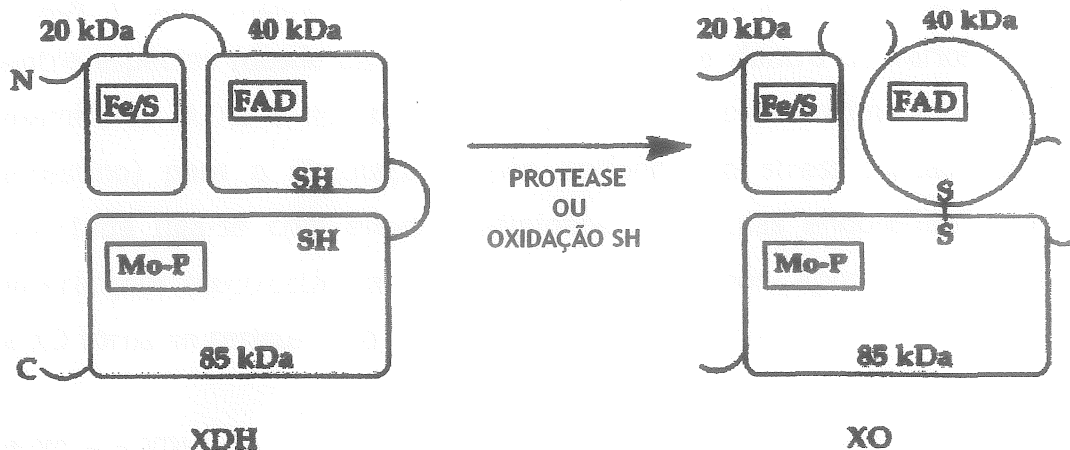


Figura 1.1 - Modelo estrutural da XDH e XO. Apenas uma subunidade da proteína dimérica está representada. (Adaptada de Borges *et al*, 2002)

A hidroxilação oxidativa de uma variedade de compostos heterocíclicos aromáticos e aldeídos, em especial, a hidroxilação da xantina a ácido úrico ocorre no centro de molibdénio da enzima, que é reduzido de Mo^{VI} a Mo^{IV} . Assim, nesta primeira semi-reacção da catálise enzimática (semi-reacção de redução), dois electrões são transferidos da xantina para o centro de molibdénio, sendo subsequentemente transferidos por via intramolecular para a FAD através dos centros Fe-S. Na FAD ocorre a semi-reacção de oxidação com a redução da NAD^+ ou do oxigénio molecular [Xia *et al*, 1999].

Ambas as enzimas podem reduzir o oxigénio a radicais superóxido e a peróxido de hidrogénio (H_2O_2), muito embora, a XDH seja caracterizada por uma elevada reactividade ao NAD^+ e baixa reactividade ao oxigénio, enquanto que com a XO se verifica o oposto.

A formação de radicais superóxido e de H_2O_2 pela XDH é inibida quase por completo pela NAD^+ . Assim, o significado fisiológico deste efeito encontra-se diminuído em células que contêm normalmente elevadas quantidades de NAD^+ e baixas quantidades de XO [Hille e Nishino, 1995].

A XOR é uma enzima citosólica que apresenta uma distribuição ubiqüitária entre espécies (desde bactérias até humanos) e dentro de vários tecidos de mamíferos. A XO é libertada por órgãos ricos nesta enzima (como fígado e intestino) para a circulação, após períodos de stress metabólico. A XO libertada liga-se com elevada afinidade às células endoteliais através de interacções electrostáticas com glicosaminoglicanos. Após esta imobilização, a XO torna-se resistente à inactivação [Radi *et al*, 1997].

A XO e a XDH exibem uma vasta especificidade para a redução de substratos. Estas enzimas conseguem hidroxilar uma grande variedade de purinas, pteridinas e compostos aromáticos heterocíclicos, bem como, aldeídos alifáticos e aromáticos, pelo que podem participar em processos de detoxificação ou activação de compostos endógenos e xenobióticos.

Para além disso, encontra-se bem estabelecido que a degradação de ATP pode originar uma acumulação de nucleótidos (adenina e iosina), assim como, de nucleopurinas (hipoxantina e xantina) (figura 1.2). A XOR participa na conversão da hipoxantina em xantina e da xantina em ácido úrico [Borges *et al*, 2002].

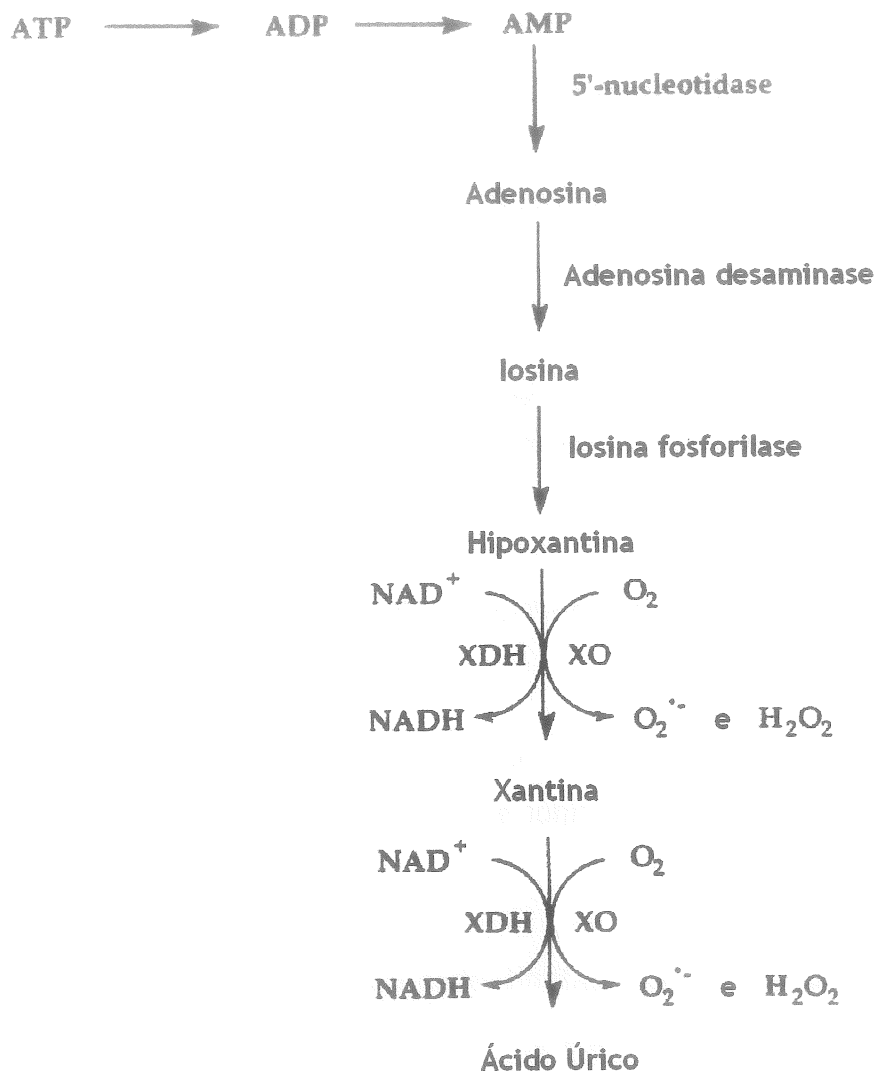


Figura 1.2 - Esquema representativo da via pela qual os nucleótidos são metabolizados, formando ácido úrico como produto final. (Adaptada de Borges *et al*, 2002)

Convém ainda salientar que a produção de NADH pela XDH pode representar um papel importante na protecção celular contra o stress oxidativo.

O ácido úrico é o produto final do catabolismo das purinas, sejam elas de origem endógena ou exógena. Em várias espécies, outra enzima - urato oxidase - converte o ácido úrico em alantoína que é, posteriormente, convertida em alantoato e, finalmente, em glioxilato e ureia (figura 1.3).

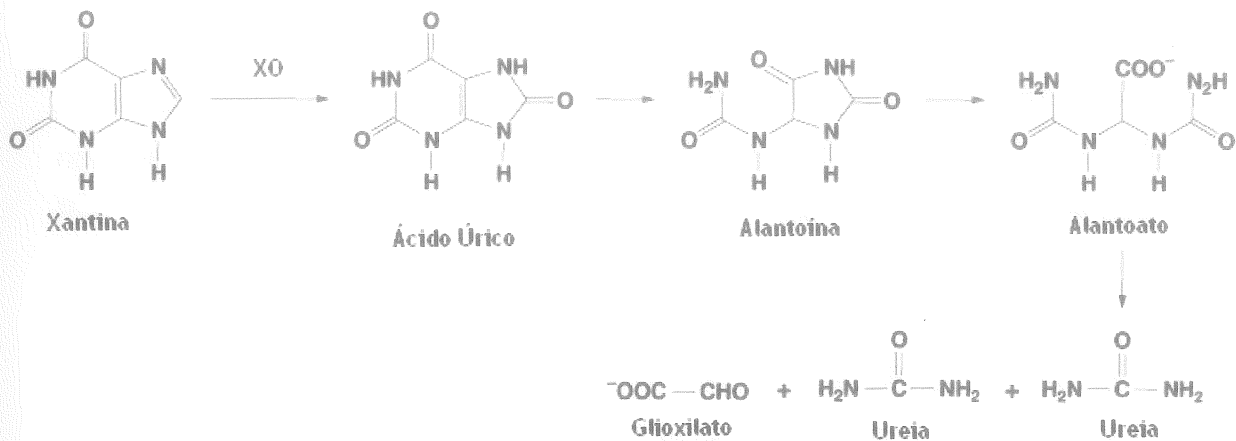


Figura 1.3 - Esquema representativo do metabolismo do ácido úrico em glioxilato e ureia.

No entanto, em humanos a urato oxidase não está presente. A pH fisiológico, a maior parte do ácido úrico formado é ionizado a urato, uma vez que, o pK_a do ácido úrico é cerca de 5,4.

O urato apresenta uma solubilidade limitada em água: o excesso da sua produção *in vivo* pode originar a sua cristalização devido à formação de soluções sobressaturadas. Devido a este facto, os cristais de ácido úrico podem depositar-se em vários locais, nomeadamente, nas articulações, tecidos conectivos e rins [Many *et al*, 1996].

Quando ocorrem disfunções, principalmente na excreção de ácido úrico pelos rins e/ou na produção endógena de purinas, desenvolve-se hiperuricémia. Esta é caracterizada por um nível sérico de ácido úrico superior a 7,5 mg/100mL em homens e 6,6 mg/100mL em mulheres [Gennaro *et al*, 1990].

A hiperuricemia é geralmente responsável pelo aparecimento da doença conhecida como gota. Esta ocorre quando cristais de urato de monossódio monohidratado, formados quer no fluido sobressaturado com ácido úrico, quer libertados de depósitos existentes em tecidos, induzem uma resposta inflamatória.

Para aliviar os sintomas da gota, a terapia anti-hiperuricêmica surge com o objectivo de reduzir os níveis séricos de ácido úrico abaixo do limite requerido para a sobressaturação do fluido extracelular, prevenindo ou revertendo a danificação dos tecidos resultante da deposição de ácido úrico. Para tal, têm vindo a ser utilizados agentes como drogas uricosúricas e inibidores da XO [Gennaro *et al*, 1990].

No entanto, a forma mais eficaz de aliviar os sintomas da gota é administrar um composto que iniba a biossíntese de ácido úrico. Neste contexto, surge o alopurinol, usado amplamente para o tratamento da hiperuricemia, que previne episódios de gota aguda e os danos causados pelos depósitos de ácido úrico [Borges *et al*, 2002].

1.2. Alopurinol

1.2.1. Indicações terapêuticas e mecanismo de acção

O alopurinol (1,5-dihidro-4*H*-pirazolo[3,4-*d*]pirimidina-4-ona) foi inicialmente sintetizado numa tentativa de produzir novos agentes antineoplásicos. No entanto, descobriu-se que possuía uma actividade inibitória da xantina oxidase, reduzindo os níveis séricos e urinários de ácido úrico [Massey *et al*, 1970].

O alopurinol e o oxipurinol, o seu principal metabolito, inibem a xantina oxidase (figura 1.4), limitando a biossíntese de ácido úrico, o que permite a diminuição do seu nível sérico e da sua excreção urinária, e promove a excreção renal da hipoxantina e xantina [Borges *et al*, 2002].

Massey e seus colaboradores (1970) determinaram o mecanismo da inactivação da XO pelo alopurinol. Estes autores demonstraram que o alopurinol é um substrato para esta enzima e que se liga fortemente ao seu centro activo reduzindo Mo^{VI} a Mo^{IV} .

O alopurinol é um inibidor competitivo da XO, sendo oxidado pela própria enzima a oxipurinol, um inibidor à qual se liga fortemente. Demonstrou-se que a ligação do oxipurinol ao local de molibdénio reduzido da XO é reversível e que este é libertado após reoxidação da enzima.

Para além disso, é necessário manter uma concentração efectiva do inibidor no órgão-alvo, porque o inibidor dissocia-se da enzima por oxidação espontânea de Mo^{IV} a Mo^{VI} , com recuperação concomitante da actividade enzimática. Estes efeitos sugerem o seu potencial uso no tratamento da gota [Massey *et al*, 1970].

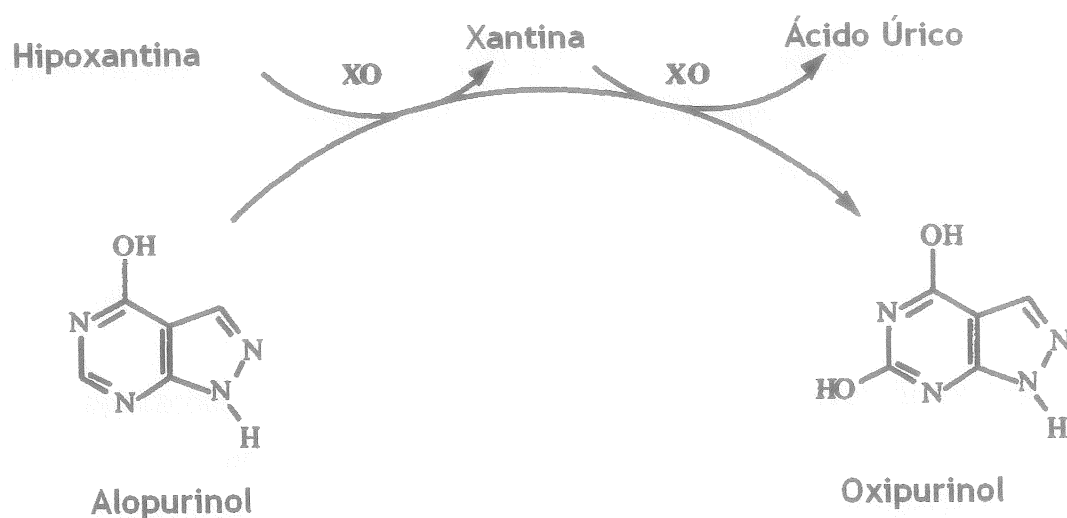


Figura 1.4 - Inibição da biossíntese de ácido úrico pelo alopurinol

Relativamente à farmacocinética, o alopurinol é rapidamente absorvido, apresentando um pico de concentração no soro dentro de 30 a 60 minutos após administração oral. O alopurinol é rapidamente e completamente absorvido exibindo um tempo de semi-vida no plasma de 2 a 3 horas.

Embora o alopurinol apresente um tempo de semi-vida pequeno no soro, o seu produto de oxidação, oxipurinol (também conhecido como aloxantina), é excretado lentamente na urina, tendo um tempo de semi-vida de 16 a 30 horas em doentes com uma função renal normal.

O oxipurinol é reabsorvido no túbulo proximal renal, de uma forma semelhante ao ácido úrico, razão pela qual tem um tempo de semi-vida superior. Assim sendo, a inibição enzimática é prolongada e a preparação farmacêutica só necessita de ser administrado uma vez por dia [Borges *et al*, 2002].

O alopurinol apresenta uma aplicação clínica no tratamento da gota e de doenças metabólicas relacionadas. As preparações orais de alopurinol encontram-se disponíveis comercialmente e têm a finalidade de reduzir as concentrações séricas e urinárias de ácido úrico em doentes com gota ou que estejam a realizar determinadas terapias anti-cancerígenas, e para tratar cálculos renais recorrentes. Está a ser clinicamente estudada uma preparação injectável de alopurinol de sódio para ser aplicada na prevenção de falhas renais agudas após um transplante renal.

Novas aplicações terapêuticas do alopurinol incluem: prevenção de isquémia-reperfusão, tratamento de doenças originadas por protozoários e prevenção do desenvolvimento de cálculos no tracto urinário e na uropatia obstrutiva (induzida por uratos) [Borges *et al*, 2002].

1.2.2. Metodologias utilizadas na determinação do alopurinol

A determinação de alopurinol em preparações farmacêuticas orais, visando o controlo de qualidade das mesmas, foi proposta por alguns autores. Algumas das características relevantes dos métodos desenvolvidos encontram-se na tabela 1.1.

Tabela 1.1 - Métodos utilizados na determinação de alopurinol em preparações orais.

Método	Deteção	Linearidade (μM)	LD (μM)	Referência
FIA	Electroquímica	até 300	1,8	Cataldi <i>et al</i> , 1989
FIA	Electroquímica	até 150	0,5	Zen <i>et al</i> , 2002
Fosforimetria	UV	5 - 705	0,6	Ruiz <i>et al</i> , 2003a
Electroforese Capilar	UV	1,8 - 51,4	0,1	Ruiz <i>et al</i> , 2003b

Cataldi *et al* (1989) propuseram a determinação electroquímica do alopurinol através da formação de um complexo de mercúrio-alopurinol fracamente solúvel em solução alcalina. Apesar da utilização de um sistema FIA, que proporcionava um ritmo de determinação de 90 amostras h^{-1} , o facto de se utilizar mercúrio levanta questões de índole regulamentar e de saúde ocupacional, limitando a sua aplicação a amostras reais.

Zen *et al* (2002) sugeriram um método electroquímico que utiliza um eléctrodo de carbono vítreo, e não recorre a enzimas. Assim, a XO foi substituída pelo ácido ascórbico e o alopurinol foi quantificado através da sua actividade de inibição sobre a oxidação do ascorbato, quando aplicado um potencial de 0,4 V a pH fisiológico.

Ruiz *et al* (2003a) desenvolveram um método baseado na fosforescência do alopurinol, à temperatura ambiente, em micelas de dodecilsulfato de sódio utilizando tálio (I). Estes autores propuseram outro método (2003b) para a

determinação do alopurinol que se baseia numa electroforese capilar. Ambos os métodos propostos são bastante morosos. O primeiro envolvia uma preparação de soluções padrão para o traçado das curvas de calibração bastante minuciosa, com a utilização de vários reagentes, nomeadamente tálio, que é altamente tóxico. O segundo trabalho englobava procedimentos de lavagem dos capilares bastantes exaustivos, demorando cerca de 15 minutos sempre que se inicia uma sessão de trabalho, cerca de 2 minutos entre ensaios e, cerca de uma hora quando se trocava o capilar por um novo. Tendo em conta a metodologia em si, a electroforese é vastamente utilizada para efectuar separações analíticas e, portanto, torna-se limitativa quando se pretende efectuar o controlo de qualidade de apenas um composto em várias formulações.

Convém salientar que estes métodos não permitem, na sua maioria, a rápida quantificação do alopurinol, para além de levantarem, em alguns casos, questões de saúde ocupacional.

Neste contexto, surge o presente trabalho, na tentativa de colmatar algumas destas dificuldades, utilizando para tal enzimas, em substituição de reagentes tóxicos (conceito de “Química Verde”), e aplicando a metodologia SIA (análise por injeção sequencial) que será abordada na secção seguinte.

1.3. Análise por injeção sequencial (SIA)

As técnicas de fluxo não segmentado são amplamente utilizadas na automatização de métodos analíticos nas mais diversas áreas. A sua importância crescente deve-se ao facto de permitirem um aumento da eficiência analítica, bem como um aumento do ritmo de amostragem, sendo a intervenção do operador menos relevante.

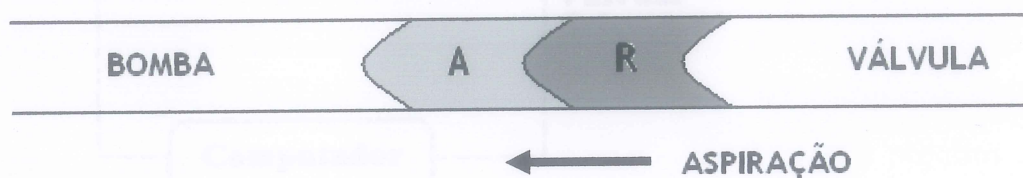
A análise por injeção sequencial (SIA, do inglês “Sequential Injection Analysis”) é uma técnica de injeção em fluxo que surgiu em 1990 [Ruzicka e Marshall, 1990]. O aparecimento desta nova técnica decorreu da necessidade de colmatar as dificuldades existentes na aplicação da análise por injeção em fluxo (FIA, do inglês “Flow Injection Analysis”). A técnica FIA é utilizada na automatização de métodos analíticos devido à sua simplicidade, versatilidade e baixo custo. Com a utilização destas técnicas, as medições podem ser efectuadas sem atingir o estado de equilíbrio físico e químico, permitindo assim montagens mais simples, o que possibilitou o aumento do ritmo de amostragem com a diminuição do consumo de amostra, em comparação com os métodos convencionais.

No entanto, a aplicação da técnica FIA implica um elevado consumo de reagentes, originado pela circulação contínua dos mesmos nas montagens, bem como, a necessidade de reconfigurar fisicamente o sistema de forma a adaptá-lo a diferentes determinações, o que torna esta técnica limitativa.

Assim, a análise por injeção sequencial surge na tentativa de simplificar os sistemas, com o objectivo de aumentar a sua versatilidade analítica, permitindo, deste modo, a análise de diferentes amostras, a determinação de diferentes analitos e a sua utilização para diferentes reacções químicas, sem reconfiguração física da montagem. Para além disso, esta técnica possibilitou um aumento de robustez, fiabilidade, estabilidade a longo prazo e diminuição da frequência de manutenção dos sistemas [Gübeli *et al*, 1991].

Na sua forma mais simples, a análise por injeção sequencial baseia-se na aspiração sequencial de volumes precisos de amostra e reagente para um tubo de armazenamento (fig. 1.5a). Esta aspiração é realizada após a selecção do canal de acesso às respectivas soluções a partir de uma válvula selectora de fluidos. De seguida, promove-se a inversão do sentido do fluxo (fig. 1.5b), originando uma zona composta pela sobreposição reproduzível de zonas de amostra e de reagente, para a qual contribuem igualmente os processos de transporte convecional e difusão molecular. Esta zona composta resultante da penetração mútua das duas zonas é encaminhada para o detector, sendo neste local medida uma grandeza relacionável com a concentração a determinar.

(a)



(b)

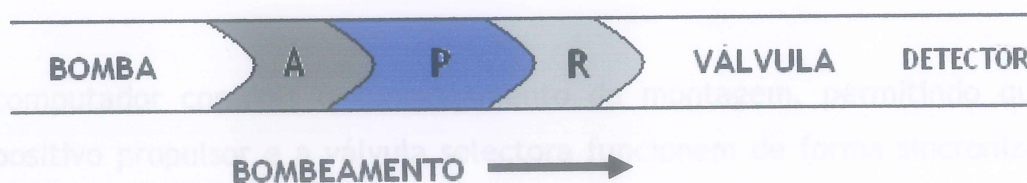


Figura 1.5 - a) Aspiração sequencial de amostra (A) e reagente (R) para o tubo de armazenamento; (b) Formação de uma zona composta (P) após inversão do fluxo, seguida de propulsão para o detector. As setas indicam a direcção do fluxo.

Desta forma, um ciclo analítico para a obtenção de uma medição pode ser constituído apenas pelas três etapas mencionadas: aspiração da amostra, do reagente e o seu encaminhamento para o detector. O número de etapas a utilizar pode ser superior, de acordo com o tipo de operações que se pretende efectuar.

Esquema básico de uma montagem

Um sistema SIA típico (fig. 1.6) é constituído por três componentes principais: dispositivo propulsor, válvula selectora de fluidos e detector, conectados entre si por tubagem de diâmetro interno reduzido e controlados por um computador.

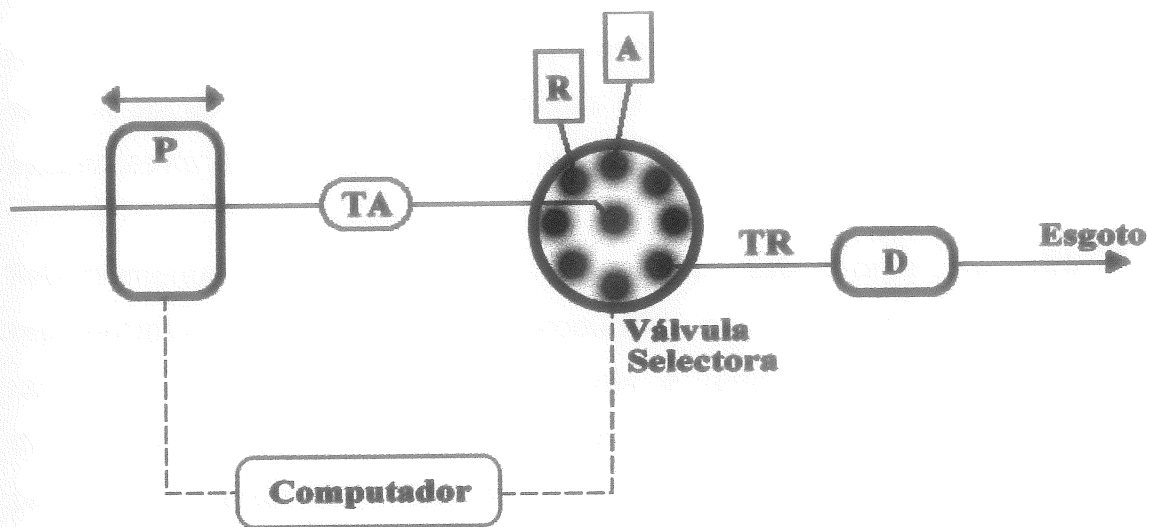


Figura 1.6 - Esquema básico de uma montagem SIA. P: dispositivo de propulsão/aspiração; TA: tubo de armazenamento; R: reagente; A: amostra; T: tubo de acesso ao detector; D: detector.

O computador controla o funcionamento da montagem, permitindo que o dispositivo propulsor e a válvula selectora funcionem de forma sincronizada. Isto possibilita definir o volume, o sentido e a velocidade de escoamento das diferentes soluções. Assim, pode inferir-se que é possível aplicar a mesma montagem a diferentes condições e determinações, sem necessidade de reconfigurar fisicamente o sistema, bastando para tal efeito alterar o comando informático.

De uma maneira geral, a elevada versatilidade destes sistemas associada à eficiente utilização das soluções, permitindo uma diminuição do consumo de amostra e reagentes (e, conseqüentemente, uma minimização de resíduos) encontram-se entre as principais vantagens da técnica SIA.

Dos três componentes principais mencionados, é fácil compreender a razão pela qual se considera como unidade central de um sistema SIA, a **válvula selectora de fluidos**. Esta funciona como um local de ligação de todos os componentes da montagem e das soluções relativas à determinação.

Através do orifício central da válvula selectora, que se encontra ligado ao tubo de armazenamento e que se pode ligar igualmente a todos os outros canais periféricos, é possível a circulação dos fluidos através do sistema. Assim, o número de soluções e de operações que se pretende efectuar num sistema SIA encontra-se limitado apenas pelo número de orifícios periféricos existentes na válvula selectora.

Relativamente ao **dispositivo propulsor**, este deve permitir a reprodutibilidade das aspirações e propulsões, na medida em que os volumes utilizados são determinados pelo caudal e tempo de funcionamento do dispositivo. Isto significa que todos os movimentos deste dispositivo (início, paragem e inversão do sentido do fluxo) têm que ser bastante precisos para garantir a reprodutibilidade supramencionada.

Existem vários tipos de dispositivos propulsores passíveis de utilização, sendo a bomba de pistão e a bomba peristáltica os mais populares.

A bomba de pistão apresenta uma elevada repetibilidade durante períodos de tempo prolongados [Christian e Ruzicka, 1992] e a possibilidade de utilizar solventes orgânicos [Cladera *et al*, 1995]. No entanto, proporciona ritmos de amostragem bastantes baixos, pois além de ser necessário evitar a contaminação do conteúdo da seringa, a sua capacidade é limitada. Por isso, são necessários reenchimentos constantes entre os ciclos analíticos.

A bomba peristáltica é a mais frequentemente utilizada nos sistemas SIA. Ao contrário da anterior, esta permite o acesso directo ao transportador não sofrendo os constrangimentos inerentes à capacidade limitada da seringa. Também pode fornecer um escoamento micropulsado regular [Christian e Ruzicka, 1992; Ivaska e Ruzicka, 1993]. Embora extremamente versáteis, a

tubagem deste tipo de dispositivo sofre um desgaste considerável quando utilizada por longos períodos de tempo ou com solventes orgânicos.

No que concerne ao tipo de detector utilizado, considera-se que qualquer que seja o detector, este só é apropriado se o seu acoplamento ao sistema SIA for fisicamente viável.

Em relação ao tubo de armazenamento (que permite a ligação da válvula selectora ao dispositivo propulsor), é necessário garantir que o seu comprimento seja suficiente para impedir que as amostras ou reagentes aspirados contaminem a solução transportadora [Marshall e van Staden, 1992]. Assume-se que o tubo de armazenamento deve conseguir armazenar um volume pelo menos duas vezes superior ao volume correspondente às diversas zonas aspiradas [Gübeli *et al*, 1991].

Fundamentos e Características

Tal como ocorre em FIA, o transporte conveccional, que ocorre com o escoamento, e o processo de difusão molecular nas interfaces de contacto de soluções de diferente natureza, são os factores responsáveis pela dispersão e, consequentemente, pela mistura das soluções num sistema SIA.

Partindo do pressuposto de que o escoamento é laminar, ao introduzir no sistema uma certa porção de amostra, ela estará sujeita inicialmente a um perfil parabólico de velocidades. Isto permite o aumento dos gradientes de concentração responsáveis pela difusão molecular, que se manifestam no sentido axial e radial (fig. 1.7).

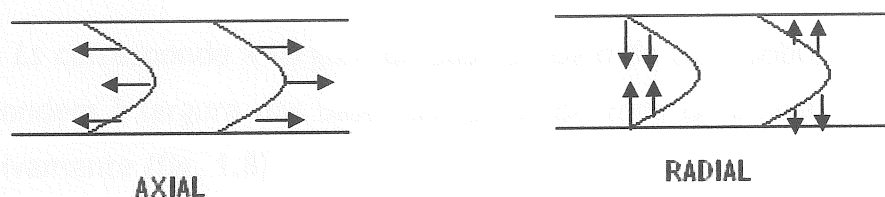


Figura 1.7 - Representação esquemática da difusão molecular no sentido radial e axial.

A inversão do sentido do fluxo permite que a dispersão axial seja minimizada, possibilitando a formação de um perfil de concentrações aproximadamente simétrico, e que na passagem pelo detector irá corresponder a um pico aproximadamente gaussiano.

A quantificação do valor da dispersão foi proposta por Ruzicka e Hansen em 1978 e baseia-se na determinação de um coeficiente de dispersão (D), que é definido como a razão das concentrações da zona a intercalar, antes (C°) e depois (C) do processo de dispersão ter ocorrido.

$$D = \frac{C^{\circ}}{C}$$

Uma vez que a dispersão representa o grau de diluição da amostra após a sua introdução no sistema, pode depreender-se que o valor de D afecta directamente a sensibilidade.

Por outro lado, num sistema SIA, é essencial o estabelecimento de um parâmetro que descreva o grau de penetração (sobreposição) mútua de zonas, de forma a identificar um intervalo de tempo em que é possível obter uma medida significativa, como altura ou área do pico [Gübeli *et al*, 1991].

Em analogia com a definição de resolução usada em cromatografia, a quantificação do grau de sobreposição é enunciada da seguinte forma:

$$P = \frac{2L_s}{(L_a + L_r)}$$

em que L_s corresponde à largura da base do pico da zona sobreposta, L_a e L_r correspondem à largura das bases dos picos da zona de amostra e reagente, respectivamente (fig. 1.8).

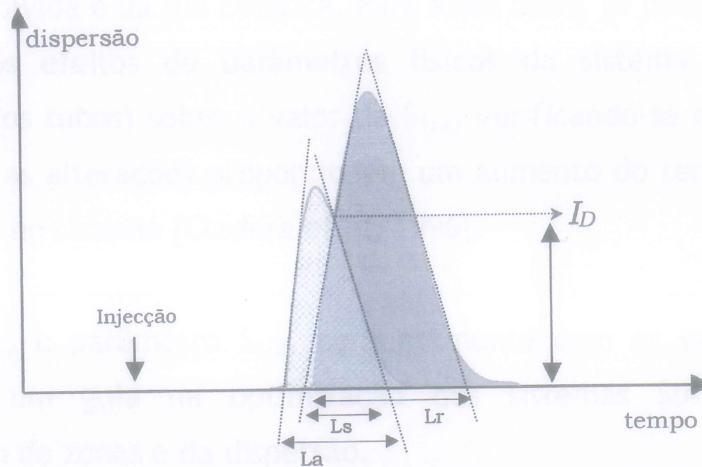


Figura 1.8: Representação da sobreposição de zonas. L_s : largura da base do pico da zona sobreposta; L_a : largura da base do pico de amostra; L_r : largura da base do pico de reagente; I_D : ponto de isodispersão.

O valor de P varia entre 0 e 1. Assim sendo, uma sobreposição total de zonas é obtida para $P = 1$, enquanto que a ausência de sobreposição é alcançada para $P = 0$ [Marshall e van Staden, 1992].

Outro conceito importante é o de ponto de isodispersão (I_D). Nada mais é do que um ponto em que a dispersão sofrida pelas zonas de amostra e reagente é igual (fig. 1.8). Ou seja, no elemento de fluido que corresponde a I_D , a razão entre as concentrações de amostra e reagentes, antes e depois da sua introdução no sistema, é a mesma, uma vez que se encontram igualmente dispersas [Gübeli *et al*, 1991].

Gübeli *et al* [1991] propuseram uma nova forma de medir a dispersão em sistemas SIA, independentemente da sua geometria e tipo de fluxo, sendo específico para cada montagem. O parâmetro proposto designa-se por $S_{1/2}$, sendo definido como o volume de solução que origina no detector um sinal analítico com uma intensidade correspondente à metade do valor obtido para a mesma solução na ausência de qualquer diluição.

Convém salientar que estes estudos basearam-se apenas em fenómenos de dispersão física, não tendo em consideração os potenciais efeitos da reacção química envolvida e da sua cinética. Para além disso, só posteriormente foram estudados os efeitos de parâmetros físicos do sistema (como caudal e dimensões dos tubos) sobre o valor de $S_{1/2}$, verificando-se que este aumenta sempre que as alterações proporcionem um aumento do tempo de residência das soluções no sistema [Cladera *et al*, 1996].

Actualmente, o parâmetro $S_{1/2}$, conjuntamente com os valores de D e I_D , constituem um guia na optimização dos sistemas SIA, no estudo da sobreposição de zonas e da dispersão.

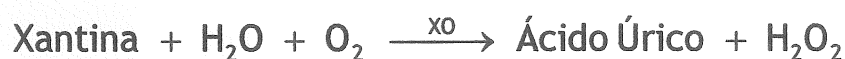
1.4. Enquadramento e objectivos do trabalho

Cada vez mais se torna proeminente a necessidade de metodologias mais rápidas e sensíveis ao nível do controlo de qualidade de preparações farmacêuticas, não só por questões de índole económica mas também por razões de segurança do consumidor.

O alopurinol tem sido amplamente associado a tratamentos de doenças como a gota e outras relacionadas e de distúrbios hematológicos e, também, a terapias antineoplásicas. Dada a sua importância têm sido propostas algumas metodologias para a determinação de alopurinol em preparações farmacêuticas visando o seu controlo de qualidade, no entanto, na sua maioria, não permitem a rápida quantificação do alopurinol, para além de levantar, em alguns casos, questões de saúde ocupacional, limitando, desta forma, a sua aplicação a amostras reais.

Neste âmbito, o presente trabalho tem como finalidade criar uma alternativa, simples e versátil, face aos métodos existentes para a determinação de alopurinol em preparações farmacêuticas, mais adaptada às necessidades actuais, quer em termos de automatização das metodologias analíticas, quer em termos de consumo de reagentes e quantidade de efluentes gerados.

Assim, durante o trabalho experimental que deu origem a esta dissertação, objectivou-se desenvolver, pela primeira vez, dois sistemas de análise por injeção sequencial aplicados à determinação de alopurinol em preparações farmacêuticas. Ambos os sistemas propostos visaram a obtenção de um método rápido, económico, sensível, preciso e exacto. Os sistemas assentam numa determinação espectrofotométrica a um comprimento de onda de 295 nm, baseada numa reacção de formação de ácido úrico a partir de xantina, catalisada pela xantina oxidase.



Quando em presença de alopurinol, esta reacção é inibida. Assim, o alopurinol foi determinado em preparações farmacêuticas pela sua capacidade de inibição da reacção mencionada.

A metodologia para determinação a tempo fixo foi a primeira a ser desenvolvida. Designa-se desta forma por utilizar como sinal analítico o valor máximo de absorvância registado a partir do sinal transiente originado pela passagem do segmento do produto reaccional pelo detector.

De seguida, desenvolveu-se uma metodologia para determinação cinética, com a finalidade de aumentar o ritmo de determinação e reduzir o consumo de reagentes e a produção de efluentes relativamente à metodologia para determinação a tempo fixo.

Na metodologia para determinação cinética, a quantificação de alopurinol foi efectuada baseando-se na velocidade de formação de ácido úrico. Esta foi avaliada através da monitorização da absorvância, após paragem de fluxo, durante um período de tempo pré-definido.

2. PARTE EXPERIMENTAL

2.1. Reagentes e Soluções

Durante o trabalho experimental foi utilizada água ultra-pura com resistividade superior a 18 MΩ cm, obtida a partir de um sistema MilliQ (Millipore). Todos os reagentes usados possuíam qualidade analítica ou semelhante, não tendo sido submetidos a qualquer tratamento para purificação adicional.

Para a preparação de soluções de concentração rigorosa foi utilizado material de vidro de classe A. A medição de volumes rigorosos inferiores a 1000 µL foi efectuada recorrendo a pipetas de volumes reguláveis, com pontas de plástico descartáveis (LM100 e LM1000, LabMate+, HTL).

A solução tampão foi preparada por dissolução de 8,9 g de hidrogenofosfato de disódio dihidratado ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$; $M = 177,99$ g/mol; referência 71638, Fluka, Sigma) em 100 mL de EDTA 1 mM. De seguida, completava-se o volume com água a 1L e ajustava-se o pH a 7,8.

A solução de EDTA (ácido etilenodinitrilotetracético) 1 mM foi obtida por dissolução do respectivo sólido ($\text{C}_{10}\text{H}_{14}\text{N}_2\text{Na}_2\text{O}_6 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$; $M = 372,24$ g/mol; referência 108418, Merck) em água.

O ajuste do pH da solução tampão foi efectuada com uma solução de ácido clorídrico 2M, preparada por diluição apropriada de uma solução comercial concentrada (HCl; $d=1,16$; 32% (m/m); referência 100319, Merck) em água.

Diariamente era preparada uma solução concentrada de alopurinol 1500 µM, que era obtida através da pesagem do composto ($\text{C}_5\text{H}_4\text{N}_4\text{O}$; $M = 136,11$ g/mol; referência A8003-5G, Sigma) e respectiva dissolução em solução tampão. De seguida, era preparada uma solução de concentração intermédia a partir da qual eram obtidas as soluções padrão de alopurinol envolvidas no traçado das curvas de calibração por diluição rigorosa em solução tampão.

A solução de xantina oxidase foi preparada diariamente por diluição apropriada em solução tampão de um determinado volume de uma solução comercial de xantina oxidase (EC 1.1.3.22, referência X-1875, 50 unidades, Sigma).

A solução de xantina de concentração 75 μM foi obtida por dissolução de 4,13 mg de xantina ($\text{C}_5\text{H}_4\text{N}_4\text{O}_2$; $M = 152,11$ g/mol; referência XO626-5G, Sigma), inicialmente em 250 μL de hidróxido de sódio 0,1 M, adicionando de seguida 750 μL de água. Posteriormente, pipetava-se 690 μL desta solução e diluía-se com solução tampão a 250 mL.

A partir desta solução de 75 μM de xantina foram preparadas, por diluição apropriada em solução tampão, as soluções de xantina de concentrações 50 e 25 μM .

A solução de hidróxido de sódio 0,1 M utilizada foi preparada por dissolução do respectivo sólido (NaOH ; $M = 40,00$ g/mol; referência 106498, Merck) em água.

Para a realização do método de referência utilizaram-se hidróxido de sódio 0,05 M e ácido clorídrico 0,1 M.

A primeira etapa na preparação das amostras de comprimidos a analisar foi realizar a pesagem de 20 comprimidos de cada formulação e sua posterior trituração em almofariz. Depois deste passo, as amostras eram preparadas dissolvendo uma determinada quantidade de pó, contendo 100 mg de alopurinol, em 250 mL de solução tampão. De seguida, procedia-se à sua filtração com papel de filtro e diluía-se uma alíquota do filtrado, com solução tampão, 60 vezes (no caso do método SIA para determinação a tempo fixo) ou 200 vezes (no caso do método SIA para determinação cinética).

Para testar possíveis interferências causadas pelos excipientes contidos nos comprimidos, preparou-se uma solução padrão de alopurinol de concentração 1000 μM e:

- Soluções com a concentração de 25000 μM para os excipientes aerosil 200 (SiO_2), lactose, talco e estereato de magnésio;
- Soluções com a concentração de 3400 mg/L para os excipientes amido, celulose monocristalina, glicolato de amido sódico e povidona.

Estas soluções concentradas dos excipientes potencialmente interferentes foram obtidas por dissolução de uma quantidade apropriada do respectivo excipiente, em solução tampão, sendo posteriormente filtradas com papel de filtro. De seguida, preparava-se uma solução contendo 1,25 mL de solução 1000 μM de alopurinol e 5 mL de solução concentrada do excipiente, completando o volume, com solução tampão, a 25 mL. Desta forma, obtinha-se uma solução final com a concentração de 50 μM de alopurinol e 5000 μM ou 680 mg/L de interferente, de acordo com o tipo de excipiente. Assim, as soluções analisadas apresentavam uma concentração em composto interferente 100 vezes superior à concentração de alopurinol.

2.2. Instrumentação e componentes do sistema SIA

Todas as pesagens de reagentes sólidos foram efectuadas numa balança analítica (modelo AG 285, Mettler, Toledo).

O ajuste do pH da solução tampão foi realizado utilizando um milivoltímetro (modelo GLP 22, Crison) equipado com um eléctrodo combinado de vidro (modelo 52-02, Crison).

O sistema SIA compreendeu como componentes básicos uma bomba peristáltica, uma válvula selectora de fluidos e um detector espectrofotométrico.

A bomba peristáltica (modelo Miniplus 3, Gilson), utilizada como dispositivo de aspiração/propulsão das soluções, foi equipada com um tubo de impulsão de poli(cloreto de vinilo) (PVC) da mesma marca, com diâmetro interno de:

- 1,30 mm - no caso do sistema SIA para determinação a tempo fixo;
- 1,02 mm - no caso do sistema SIA para determinação cinética.

A válvula multiposição selectora de fluidos representava o centro do sistema, já que era este o componente ao qual estavam ligados os outros elementos do sistema. A válvula que integrou a montagem era de oito portas e de rotação unidireccional, da marca VICI Valco Instruments Co Inc, modelo C15-3118 E.

Como sistema de detecção, foi utilizado um espectrofotómetro UV/Vis (modelo Helios γ , ThermoUvicam), equipado com um suporte de célula termostático e uma célula de fluxo (referência 178.710-QS, Hellma) com um volume interno de 80 μ L e um percurso óptico de 10 mm. As leituras foram efectuadas a um comprimento de onda de 295 nm.

As ligações dos diferentes componentes do sistema foram efectuadas através de tubos com um diâmetro interno de 0,8 mm, constituídos por PTFE, da marca Omnifit.

À excepção do tubo de reacção (ou reactor), toda a tubagem possuía uma configuração linear. No caso do reactor, a tubagem apresentava uma configuração em figuras de oito. Estas eram obtidas entrelaçando o tubo em formas sucessivas de oitos, numa rede plástica de 2 cm de largura.

Para o estudo e manutenção da temperatura, bem como, para promover a circulação de água através do suporte da célula de fluxo, foi utilizado um banho termostático modelo S-543 da marca Selecta.

Os sinais analíticos foram registados em papel num registador (BD 111, Kipp & Zonen) acoplado ao sistema de detecção. Foi também efectuada a aquisição do sinal analítico através da conversão do sinal analógico proveniente do espectrofotómetro, recorrendo a uma placa PCL-818L (Advantech) a uma frequência de 4 Hz. Os valores de absorvância registados em função do tempo eram obtidos após tratamento dos dados adquiridos na aplicação informática Excel®.

O controlo do equipamento envolvido na montagem foi realizado utilizando um computador baseado num chip Intel 80486 e equipado com a placa supramencionada. Utilizou-se um software elaborado em Microsoft QuickBasic 4.5, de forma a permitir o controlo dos dispositivos, bem como, a aquisição do sinal analítico. Este programa possibilitou controlar a posição da válvula selectora de fluidos, a direcção do escoamento e a velocidade de rotação da bomba peristáltica.

2.3. Funcionamento do sistema SIA

As duas montagens desenvolvidas para a determinação de alopurinol em preparações farmacêuticas são semelhantes (fig. 2.1), apenas diferindo no tubo de reacção (reactor).

Enquanto que o sistema para determinação a tempo fixo engloba um reactor de 150 cm sujeito a aquecimento em banho termostático, o sistema para determinação cinética apresenta um reactor de 60 cm não sujeito a aquecimento.

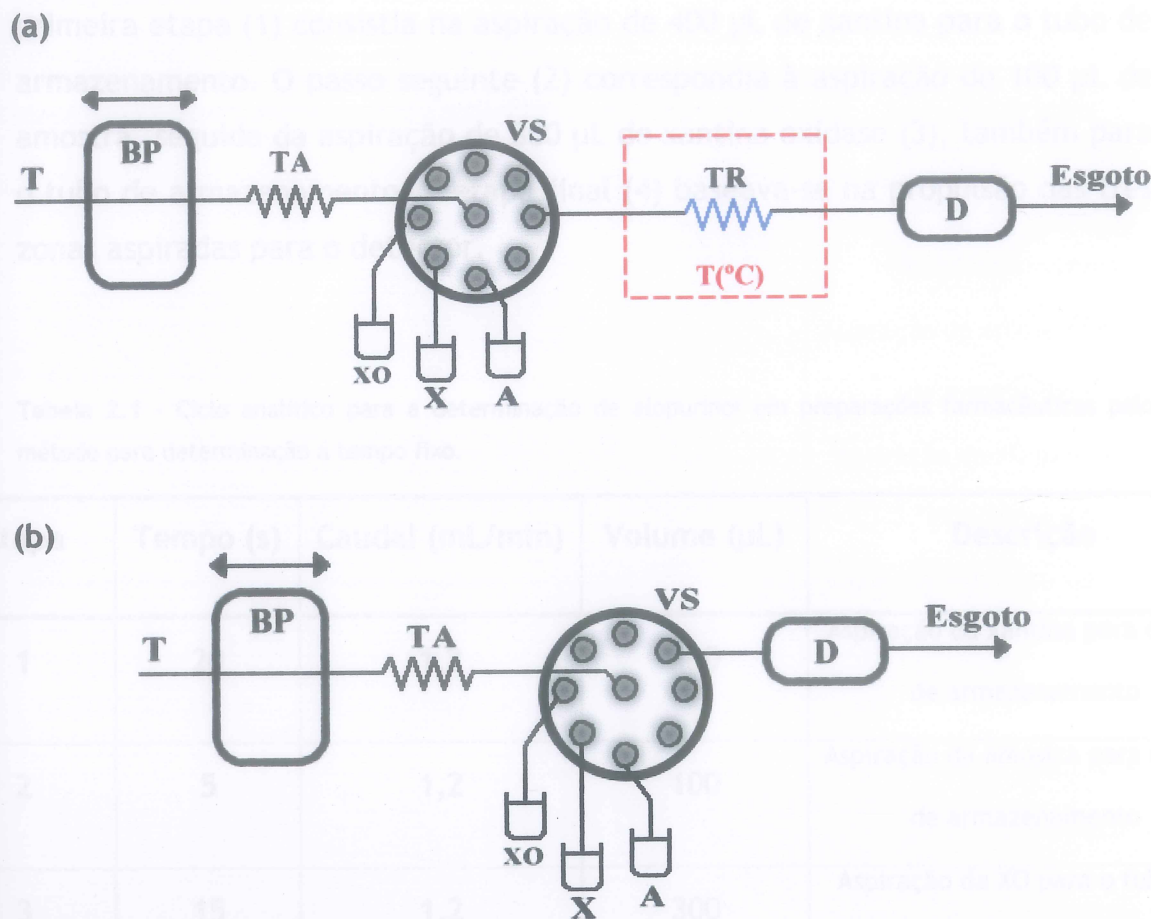


Figura 2.1 - Representação esquemática da montagem analítica para a determinação de alopurinol para determinação a tempo fixo (a) e para determinação cinética (b). T: transportador, BP: bomba peristáltica; TA: tubo de armazenamento; VS: válvula selectora de fluidos; TR: tubo de reacção ou reactor; D: detector espectrofotométrico, E: esgoto, X: xantina, A: amostra, XO: xantina oxidase.

Após a montagem, foi necessário realizar o estudo de características físicas do sistema e de parâmetros da reacção química, visando a obtenção de um método rápido, económico, sensível, preciso e exacto. Para além disso, o método para determinação cinética teve ainda como finalidade aumentar o ritmo de determinação e reduzir o consumo de reagentes e a produção de resíduos, face ao método para determinação a tempo fixo.

Muito embora os dois sistemas sejam semelhantes, o ciclo analítico desenvolvido para cada um apresenta algumas diferenças.

O ciclo analítico relativo ao método para determinação a tempo fixo (tabela 2.1) compreendeu 4 etapas executadas num período de tempo de 240 s. A primeira etapa (1) consistia na aspiração de 400 μL de xantina para o tubo de armazenamento. O passo seguinte (2) correspondia à aspiração de 100 μL de amostra, seguida da aspiração de 300 μL de xantina oxidase (3), também para o tubo de armazenamento. A etapa final (4) baseava-se na propulsão das três zonas aspiradas para o detector.

Tabela 2.1 - Ciclo analítico para a determinação de alopurinol em preparações farmacêuticas pelo método para determinação a tempo fixo.

Etapa	Tempo (s)	Caudal (mL/min)	Volume (μL)	Descrição
1	20	1,2	400	Aspiração da xantina para o tubo de armazenamento
2	5	1,2	100	Aspiração da amostra para o tubo de armazenamento
3	15	1,2	300	Aspiração da XO para o tubo de armazenamento
4	200	0,9	3000	Propulsão do conteúdo do tubo de armazenamento para o detector

O ciclo analítico respectivo ao método para determinação cinética (tabela 2.2) englobou 6 etapas executadas num período de tempo de 106 s. A etapa inicial (1) baseava-se na aspiração de 400 μL de xantina, seguida da aspiração de 50 μL de amostra (2) e, posteriormente de 100 μL de xantina oxidase (3), para o tubo de armazenamento. O passo seguinte (4) consistia na propulsão das três zonas aspiradas para a célula de fluxo, seguindo-se um período de paragem de 45 s (5) no qual ocorria a aquisição do sinal analítico. A etapa final (6) correspondia à lavagem do detector com transportador.

Tabela 2.2 - Ciclo analítico para a determinação de alopurinol em preparações farmacêuticas pelo método para determinação cinética.

Etapa	Tempo (s)	Caudal (mL/min)	Volume (μL)	Descrição
1	12,81	1,9	400	Aspiração da xantina para o tubo de armazenamento
2	1,57	1,9	50	Aspiração da amostra para o tubo de armazenamento
3	3,18	1,9	100	Aspiração da XO para o tubo de armazenamento
4	11,5	3,8	720	Propulsão do conteúdo do tubo de armazenamento para o detector
5	45	-	-	Período de paragem. Aquisição do sinal analítico
6	32	3,8	2000	Lavagem do sistema

2.4. Estudo das variáveis e avaliação das características de funcionamento do método

No decurso do desenvolvimento das duas metodologias automáticas propostas foram realizados diversos estudos, visando a melhoria das características dos sistemas, ao nível da amplitude do sinal, da sensibilidade, da exactidão, da precisão e do ritmo de amostragem. Estas características influenciaram as escolhas efectuadas durante a optimização de cada um dos sistemas, a qual foi efectuada pelo método univariante. Este baseia-se em variar, num determinado intervalo, cada um dos parâmetros independentemente, mantendo fixos todos os restantes.

No caso do método para determinação a tempo fixo, utilizou-se como sinal analítico o valor máximo de absorvância registado a partir do sinal transiente originado pela passagem do segmento do produto reaccional pelo detector. O traçado da curva de calibração foi efectuado usando o valor máximo de absorvância obtido em função das concentrações de alopurinol presentes nas soluções padrão.

No caso do método para determinação cinética, a quantificação de alopurinol foi efectuada através da velocidade de formação de ácido úrico. Esta foi avaliada através da monitorização da absorvância a 295 nm após paragem de fluxo, durante um período de 45 s. De seguida, realizava-se o traçado gráfico dos valores de absorvância obtidos em função do tempo. Caso esta função fosse linear, utilizava-se o valor do declive (que reflecte a velocidade de formação de ácido úrico) para traçar as curvas de calibração. Assim, o traçado da curva de calibração foi efectuado usando o valor do declive obtido (linearmente proporcional à velocidade reaccional) em função das concentrações de alopurinol presentes nas soluções padrão.

Nos dois métodos, para o estabelecimento do intervalo de linearidade consideraram-se apenas as concentrações que originavam rectas de calibração com um valor de coeficiente de correlação superior a 0,995.

Em ambas as metodologias propostas, considerou-se o limite de detecção como o valor mínimo de concentração (C_{LD}) para o qual se consegue obter uma resposta analítica (Y_{LD}) significativamente diferente do ruído de fundo ou do valor de um branco [IUPAC, 1976; IUPAC, 1995]. O valor de Y_{LD} foi calculado através da equação $Y_{LD} = b + 3 S_{y/x}$, onde b corresponde à ordenada na origem e $S_{y/x}$ representa o desvio padrão da regressão. Este foi obtido através da equação $S_{y/x} = [\sum(y_i - \hat{y}_i)^2 / (n-2)]^{1/2}$, em que y_i refere-se aos valores obtidos experimentalmente, \hat{y}_i corresponde aos pontos calculados através da equação da recta para cada valor de x e n representa o número de pontos. A concentração mínima detectável C_{LD} foi determinada através da substituição do valor de Y_{LD} na equação da recta $Y_{LD} = \text{declive } C_{LD} + b$ [Miller e Miller, 1993]. Relativamente ao limite de quantificação, este foi determinado substituindo o valor de Y_{LQ} na equação da recta $Y_{LQ} = \text{declive } C_{LQ} + b$, em que Y_{LQ} é fornecido pela equação $Y_{LQ} = b + 10 S_{y/x}$ [Miller e Miller, 1993].

Para avaliar a precisão das metodologias recorreu-se à determinação de valores de desvio padrão relativo (DPR), expresso em percentagem.

Para avaliar a exactidão entre os resultados obtidos pelos métodos propostos e pelo método de referência, determinou-se o desvio relativo e realizou-se o teste estatístico de t de Student emparelhado [Miller e Miller, 1993].

O ritmo de determinação, expresso como o número de determinações por hora, foi estimado através do tempo necessário para a execução de um ciclo analítico completo. Assim, este cálculo foi efectuado tendo em consideração o período de tempo necessário para a realização de todas as etapas da sequência analítica, resultando na soma do tempo gasto em cada passo do ciclo acrescido do tempo requerido para a comunicação de instruções entre o computador e os restantes dispositivos do sistema.

No que respeita ao estudo de interferentes, para uma espécie ser considerada interferente teria que provocar um desvio relativo superior a 3% no valor do sinal analítico.

2.5. Metodologia utilizada como referência

Para avaliar a exactidão dos resultados fornecidos pelas metodologias desenvolvidas, determinou-se a quantidade de alopurinol nas formulações farmacêuticas segundo o método de referência descrito pela British Pharmacopoeia (2005).

O procedimento analítico baseava-se numa determinação espectrofotométrica à qual antecediam as seguintes etapas:

- a) Pesagem de 20 comprimidos e sua trituração;
- b) Pesagem de uma certa quantidade de pó resultante da trituração, contendo 100 mg de alopurinol;
- c) Adição de 20 mL de hidróxido de sódio 0,05 M;
- d) Agitação durante 20 minutos numa placa de agitação;
- e) Adição de 80 mL de ácido clorídrico 0,1 M;
- f) Agitação durante 10 minutos numa placa de agitação;
- g) Preparação de uma solução a partir da mistura anterior, por diluição a 250 mL, com ácido clorídrico 0,1 M;
- h) Filtração (em papel de filtro) da solução obtida e diluição de 10 mL de filtrado a 250 mL, utilizando ácido clorídrico 0,1 M.

Após todos estes passos efectuava-se a medição da absorvância da solução resultante a um comprimento de onda de 250 nm, usando como branco uma solução de ácido clorídrico 0,1 M. Posteriormente calculava-se a concentração de alopurinol na solução através da seguinte fórmula: $A = \varepsilon c b$, em que A correspondia à absorvância, ε representava a absortividade molar, c referia-se à concentração molar e b ao percurso óptico. O valor de ε era fornecido e o valor de b correspondia a 1 cm.

Por fim, calculava-se o conteúdo em alopurinol na respectiva formulação farmacêutica.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Metodologia SIA para determinação a tempo fixo

A montagem SIA utilizada para iniciar os estudos de otimização do sistema a desenvolver apresentava um banho termostático a 30°C visando o aquecimento do suporte da célula de fluxo e do reactor.

Como reactor colocou-se um com 1,5 m de comprimento e optou-se por uma configuração em figuras de oito para favorecer a mistura sem aumentar a dispersão, conseguida devido à intensificação do transporte radial e à limitação do transporte ao longo do eixo de escoamento [Marshall e van Staden, 1992].

Como caudal de aspiração a utilizar 1,2 mL/min e, para o caudal de propulsão 0,69 mL/min.

O ciclo analítico baseou-se na aspiração sequencial de:

- 400 µL de uma solução de xantina de concentração 50 µM;
- 100 µL de amostra ou padrão de alopurinol (preparados por diluição em água). No caso do branco, aspirava-se 100 µL de água;
- 100 µL de solução de XO de concentração 0,148 U/mL (preparada por diluição em EDTA). Esta solução era aspirada por último com a finalidade de evitar a sua diluição devido à dispersão.

Posteriormente, ocorria a propulsão destas três zonas aspiradas para o detector, utilizando como transportador água.

3.1.1. Estudo dos parâmetros físico-químicos

Reactor

Os estudos iniciais foram realizados com o sinal analítico do branco, que representa o sinal máximo que se pode obter com o sistema, visando a maximização da amplitude do sinal analítico.

Foram então testados reactores com comprimentos de 1; 1,5 e 2 metros. Verificou-se um aumento de 17,1% com o aumento do tamanho do reactor de 1 m para 1,5 m e, um aumento de 5,5% com o aumento do reactor de 1,5 m para 2 m.

Optou-se pelo reactor de comprimento 1,5 m, tendo em consideração o compromisso entre a amplitude do sinal obtida e o tempo que decorria até à completa passagem do segmento do produto reaccional pelo detector, face ao caudal utilizado.

Reagentes e Amostra

A solução de xantina oxidase de concentração 0,148 U/mL (preparada por diluição em EDTA) foi ensaiada em três condições físicas diferentes: mergulhada em banho de gelo, à temperatura ambiente e em banho termostático a 30°C.

Verificou-se que o sinal analítico do branco diminuiu em cerca de 3% quando a enzima foi colocada à temperatura ambiente comparativamente ao sinal analítico obtido com a enzima mergulhada em banho de gelo. Relativamente ao sinal analítico que se obteve quando a solução de xantina oxidase foi colocada à temperatura ambiente e em banho termostático a 30°C, constatou-se que este ia diminuindo ao longo do tempo embora de uma forma mais pronunciada quando se aqueceu a

solução, indicando a perda progressiva da actividade enzimática. Desta forma, optou-se por utilizar a solução enzimática mergulhada em banho de gelo.

Avaliou-se também o efeito sobre a actividade enzimática do meio em que esta era diluída. Para isso compararam-se os sinais obtidos quando se utilizava solução de EDTA e solução tampão de fosfato e EDTA (pH = 7,8). Verificou-se que o sinal analítico do branco aumentou em cerca de 57% quando se utilizou a solução tampão para preparar a solução de xantina oxidase. Optou-se então pela utilização de solução tampão para a preparação da solução de xantina oxidase.

Face a este resultado colocou-se a possibilidade de substituir a água utilizada como transportador e como dissolvente das amostras também por solução tampão. Estes estudos foram efectuados sequencialmente e verificou-se um aumento gradual de repetibilidade quando se substituiu o transportador por solução tampão e seguidamente quando os padrões e amostras passaram a ser preparados em solução tampão. Desta forma, todas as soluções introduzidas no sistema passaram a ter em comum a mesma solução tampão garantindo-se assim um valor de pH constante para a actividade da enzima e o desenrolar da reacção.

De seguida avaliou-se a concentração de xantina oxidase paralelamente à concentração de xantina. No caso da xantina oxidase, as concentrações testadas foram 0,148 e 0,296 U/mL; no caso da xantina avaliaram-se concentrações de 25, 50 e 75 μM (para uma concentração de 100 μM não foi possível uma dissolução completa). Este estudo foi efectuado em duas situações distintas: numa o transportador utilizado era a solução tampão e o ciclo analítico processava-se sem alterações (tabela 2.1); noutra, o transportador foi substituído pela solução de xantina, pelo que, no ciclo analítico, a etapa de aspiração desta solução não se realizava (etapa 1 - tabela 2.1). A figura 3.1 permite visualizar os resultados obtidos neste estudo.

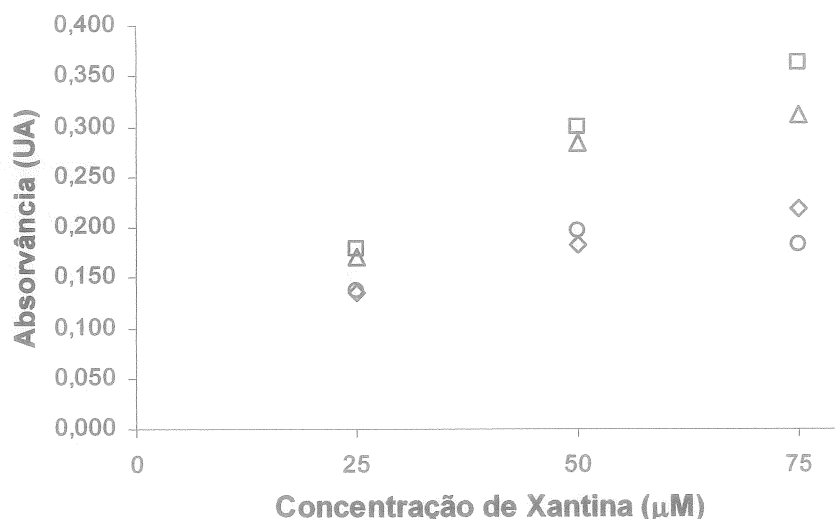


Figura 3.1 - Estudo das concentrações da solução de xantina e da solução de xantina oxidase. Ensaio efectuado com aspiração de uma alíquota da solução de xantina e com aspiração de uma solução de enzima de concentração 0,148 U/mL (\diamond) e 0,296 U/mL (\square). Ensaio efectuado com a solução de xantina em transportador e com aspiração de uma solução de enzima de concentração 0,148 U/mL (\circ) e 0,296 U/mL (\triangle).

Como se pode constatar pela observação da figura 3.1, os resultados obtidos quer para a aspiração de xantina, quer para a utilização de xantina como transportador, para as mesmas concentrações de xantina oxidase, são bastante semelhantes. Isto permitiu optar por aspirar solução de xantina (400 μL) em vez de utilizá-la como transportador, evitando assim um consumo superior deste reagente.

Pela análise dos resultados, ainda se pode definir dois parâmetros com a finalidade de maximizar a amplitude do sinal analítico: a concentração da solução de xantina ser de 75 μM e a de xantina oxidase ser de 0,296 U/mL. Desta forma obtinha-se um sinal inicial (na ausência do alopurinol) com intensidade suficiente para que se avaliasse a sua diminuição na presença de diversas concentrações de composto inibidor.

Convém ainda salientar que não foram avaliadas concentrações de xantina oxidase superiores porque originaria um consumo excessivo de enzima.

Uma vez definidas as concentrações das soluções de xantina e de xantina oxidase, procedeu-se ao estudo dos volumes a aspirar destes reagentes.

Começou-se por avaliar o volume da solução de xantina mais apropriado (figura 3.2). Verificou-se que dos volumes estudados (100, 200, 300 e 400 μL), o sinal analítico era superior quando se aspirava um volume de 400 μL de solução de xantina, pelo que se optou por este volume para os estudos posteriores. É importante realçar o facto de não se terem estudado volumes superiores, dado que os resultados com a aspiração de 400 μL equivaliam aos obtidos com o transportador (figura 3.1).

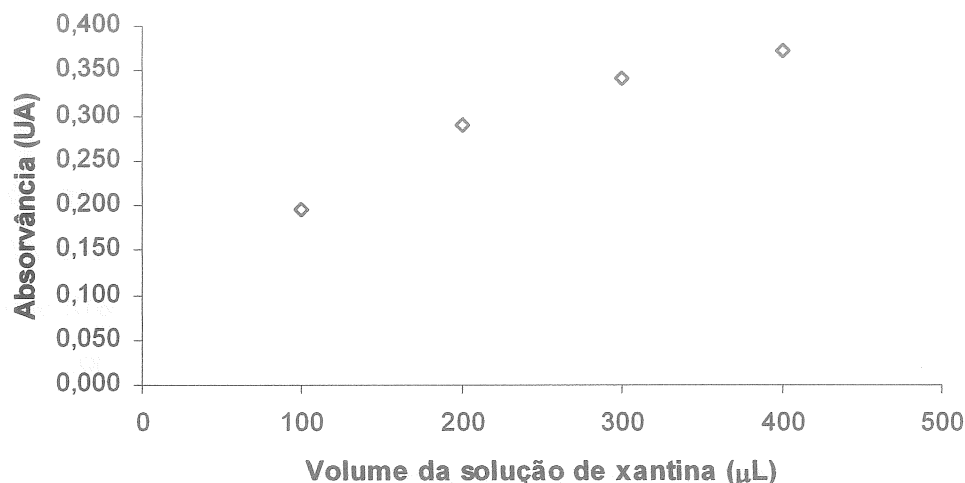


Figura 3.2 - Estudo do volume (μL) da solução de xantina a utilizar.

De seguida estudou-se o volume da solução de xantina oxidase a utilizar. Os resultados obtidos encontram-se na figura 3.3. Dos volumes estudados (100, 200, 300 e 400 μL), optou-se por 300 μL já que o sinal analítico era superior neste caso e, a diferença entre este e o obtido para um volume de 400 μL era imperceptível, não compensando um gasto de mais 100 μL de solução de xantina oxidase.

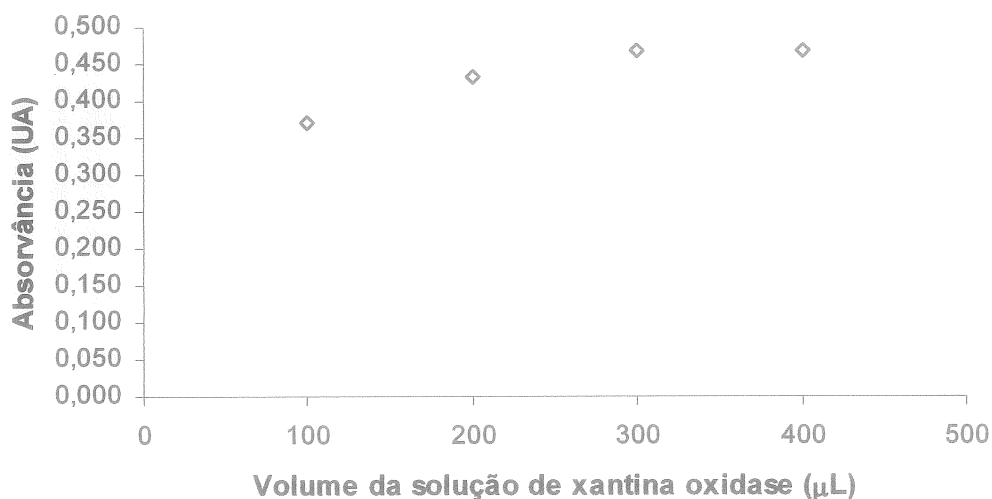


Figura 3.3 - Estudo do volume (μL) da solução de xantina oxidase a utilizar.

Após estarem definidas as concentrações e volumes das soluções de xantina e xantina oxidase, prosseguiu-se com a avaliação do intervalo de concentrações de alopurinol em que era possível estabelecer uma relação linear com o sinal analítico. Para tal, prepararam-se uma série de soluções padrão de alopurinol com as seguintes concentrações: 10; 25; 50; 75; 125; 187,5; 375 e 750 μM (em solução tampão). Com os resultados obtidos (figura 3.4) verificou-se que o intervalo de concentrações em que era possível obter uma curva de calibração linear correspondia a concentrações de soluções padrão de alopurinol entre 25 e 75 μM .

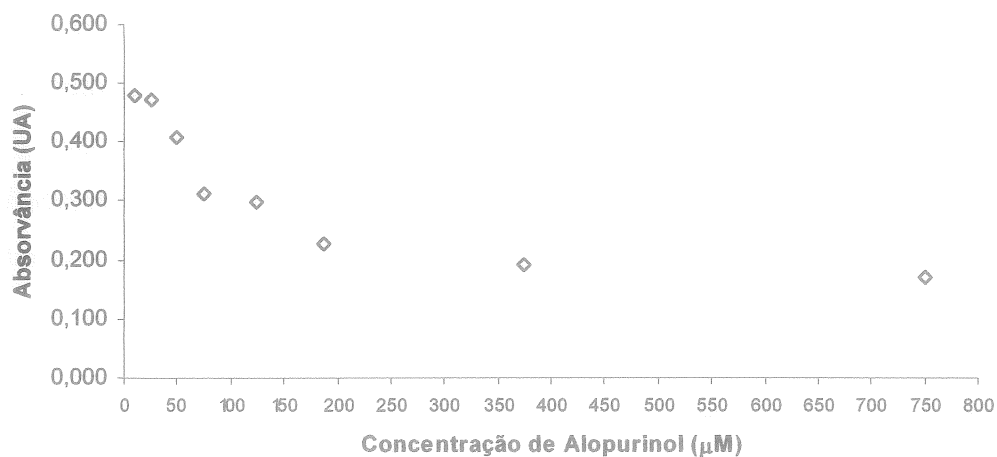


Figura 3.4 - Estudo do intervalo de concentrações de alopurinol em que é possível estabelecer uma curva de calibração linear.

De seguida, avaliou-se o volume de solução padrão de alopurinol (ou amostra) a utilizar, realizando para cada volume a testar uma curva de calibração (figura 3.5). Os volumes testados foram de 50, 100 e 200 µL.

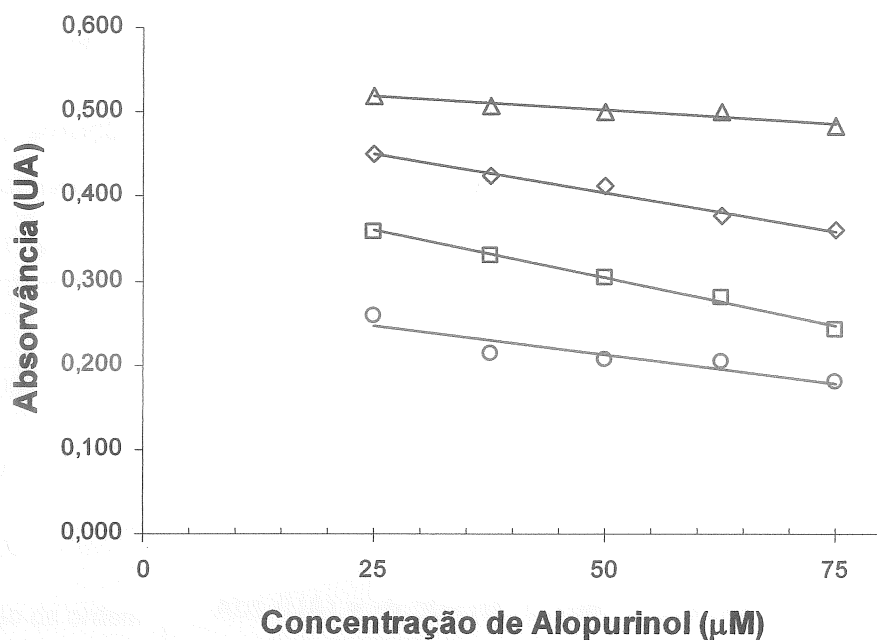


Figura 3.5 - Estudo do volume da solução padrão de alopurinol a aspirar e da sequência de aspiração dos reagentes. Ensaio efectuado com aspiração de 50 µL (◇), 100 µL (□), 200 µL (○) e 100 µL após inversão da ordem de aspiração (Δ).

Pela tabela 3.1, que complementa a figura 3.5, constatou-se que o volume que conduzia a resultados com uma maior sensibilidade e um coeficiente de correlação mais próximo de -1 era de 100 μL .

Definido o volume da solução de alopurinol a aspirar, estudou-se a sequência de aspiração dos reagentes. Estabeleceu-se que a solução de xantina oxidase seria a última a ser aspirada de forma a evitar a sua diluição. Assim, para realizar este estudo, apenas se inverteu a ordem de aspiração da solução de xantina e da de alopurinol. Os resultados evidenciaram que esta inversão apesar de conduzir a um incremento de sinal analítico, em termos absolutos superior, não conduziu a um aumento de sensibilidade, pois o facto de se intercalar uma alíquota superior de xantina entre a de xantina oxidase e de alopurinol dificultava a mistura e a inibição do alopurinol (tabela 3.1), pelo que, manteve-se a ordem inicialmente proposta de aspiração dos reagentes.

Tabela 3.1 - Equações de recta e valores de coeficiente de correlação obtidos no estudo dos volumes da solução padrão de alopurinol. Abs: absorvância; C: concentração.

Volume de solução de alopurinol a aspirar (μL)	Equação da recta obtida	Coefficiente de Correlação
50	$\text{Abs (UA)} = -1,85 \times 10^{-3} C (\mu\text{M}) + 4,97 \times 10^{-1}$	-0,9897
100	$\text{Abs (UA)} = -2,27 \times 10^{-3} C (\mu\text{M}) + 4,17 \times 10^{-1}$	-0,9959
200	$\text{Abs (UA)} = -1,34 \times 10^{-3} C (\mu\text{M}) + 2,80 \times 10^{-1}$	-0,9224
100 (com inversão da ordem de aspiração)	$\text{Abs (UA)} = -6,50 \times 10^{-4} C (\mu\text{M}) + 5,35 \times 10^{-1}$	-0,9636

Temperatura

Este estudo foi efectuado através do estabelecimento de curvas de calibração para cada temperatura em avaliação (figura 3.6 e tabela 3.2). As temperaturas estudadas foram 23, 30 e 37 °C. Para 37°C não são apresentados resultados, visto que não foi possível obter dados consistentes, já que o aumento de temperatura ocasionou a formação de inúmeras bolhas de ar que impediram o registo do sinal analítico sem perturbações.

Uma vez que a 30°C se obteve uma maior sensibilidade e um coeficiente de correlação mais próximo de -1, efectuou-se ainda outro estudo a esta temperatura, que consistiu na execução de uma curva de calibração, com o transportador aquecido. Um vez que num sistema SIA a interdispersão, entre as diferentes alíquotas de soluções e com o transportador, se verifica no momento da sua aspiração pretendia-se desta forma garantir um aquecimento mais homogéneo em todo o sistema. Pelos resultados obtidos, verificou-se que esta alteração não contribuiu para melhorias significativas. Assim, apenas se optou pelo aquecimento do reactor e suporte da célula de fluxo a 30°C.

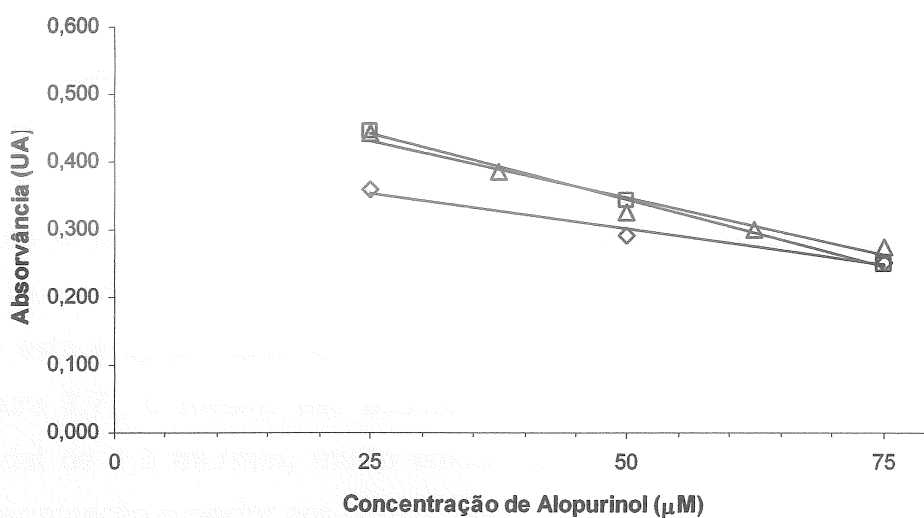


Figura 3.6 - Estudo da temperatura da reacção: 23°C (◇), 30 °C (□) e 30 °C com o transportador aquecido (Δ).

Tabela 3.2 - Equações de recta e valores de coeficiente de correlação obtidos no estudo da temperatura. Abs: absorvância; C: concentração.

Temperatura (°C)	Equação da recta obtida	Coefficiente de Correlação
23	$Abs (UA) = -2,12 \times 10^{-3} C (\mu M) + 4,07 \times 10^{-1}$	-0,9860
30	$Abs (UA) = -3,94 \times 10^{-3} C (\mu M) + 5,42 \times 10^{-1}$	-0,9997
30 (com transportador aquecido)	$Abs (UA) = -3,36 \times 10^{-3} C (\mu M) + 5,14 \times 10^{-1}$	-0,9793

Caudais de propulsão

Com o objectivo de diminuir o tempo necessário à execução do ciclo analítico que se traduz no aumento do ritmo de determinação, foi avaliado o caudal utilizado na mistura da amostra com os reagentes e respectiva formação do produto reaccional, isto é, o caudal de envio para o detector.

Para tal, foram realizadas curvas de calibração com base em todos os parâmetros previamente definidos, para caudais de 0,69; 0,9 e 1,3 mL/min.

Optou-se pelo caudal de propulsão de 0,9 mL/min, uma vez que permite um ritmo de determinação superior e não compromete a sensibilidade, já que esta é aproximadamente semelhante à obtida com o caudal de 0,69 (figura 3.7). O mesmo não acontece com a sensibilidade obtida com um caudal de 1,3 mL/min, muito embora este caudal permita um ritmo de determinação superior aos outros dois.

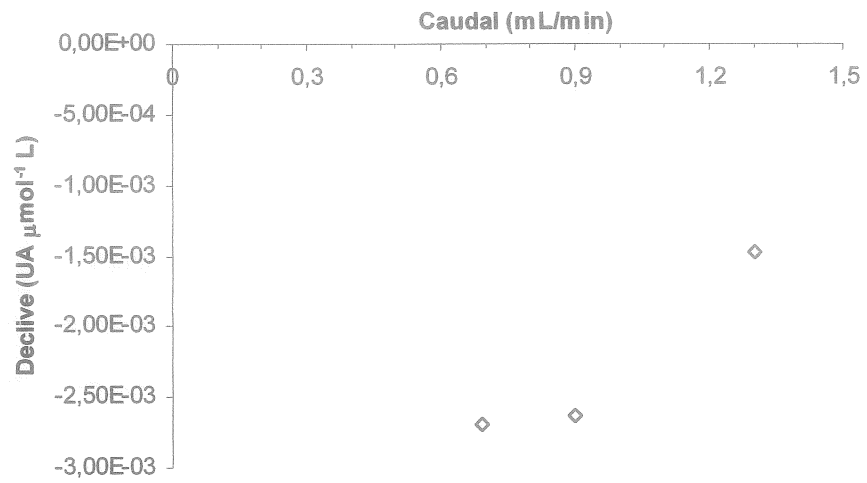


Figura 3.7 - Influência do caudal de propulsão na sensibilidade da metodologia para determinação a tempo fixo.

Na tabela 3.3 encontram-se resumidos os parâmetros e o intervalo de valores estudados para cada um deles e os respectivos valores finais escolhidos para a operação do sistema SIA para determinação a tempo fixo.

Tabela 3.3 - Intervalo de valores usados no estudo das variáveis do sistema SIA para determinação a tempo fixo e condições escolhidas para o seu funcionamento.

Parâmetro	Valores Estudados	Valores Escolhidos
Concentração de xantina (μM)	25 - 100	75
Volume de xantina (μL)	100 - 400	400
Concentração de xantina oxidase (U/mL)	0,148 e 0,296	0,296
Volume de xantina oxidase (μL)	100 - 400	300
Concentração de alopurinol (μM)	10 - 750	25 - 75
Volume de alopurinol (μL)	50 - 200	100
Temperatura ($^{\circ}\text{C}$)	23 - 37	30
Caudal de propulsão (mL/min)	0,69 - 1,3	0,9

3.1.2. Parâmetros de calibração do sistema

Após o desenvolvimento e optimização das variáveis físicas e químicas, a metodologia SIA para determinação a tempo fixo foi caracterizada de acordo com o referido na secção 2.4. A tabela 3.4 resume os parâmetros avaliados.

Tabela 3.4 - Parâmetros de calibração do sistema.

Parâmetro	
Limite de detecção	6,9 μM
Limite de quantificação	22,9 μM
Intervalo de linearidade	25 - 75 μM
Precisão (DPR)	<2,4 %
Ritmo de determinação	15 h^{-1}

Em termos de precisão, a metodologia proposta foi avaliada através da determinação do desvio padrão relativo (DPR), expresso em percentagem, de um conjunto de 3 injeções consecutivas de cada amostra. Os valores de DPRs variaram entre 0,8 e 2,4%, o que permite concluir que o sistema desenvolvido apresenta uma boa repetibilidade e, logo, uma boa precisão.

A figura 3.8 representa um registo do sinal analítico de uma curva de calibração típica para um intervalo de concentrações compreendido entre 25 e 75 μM .

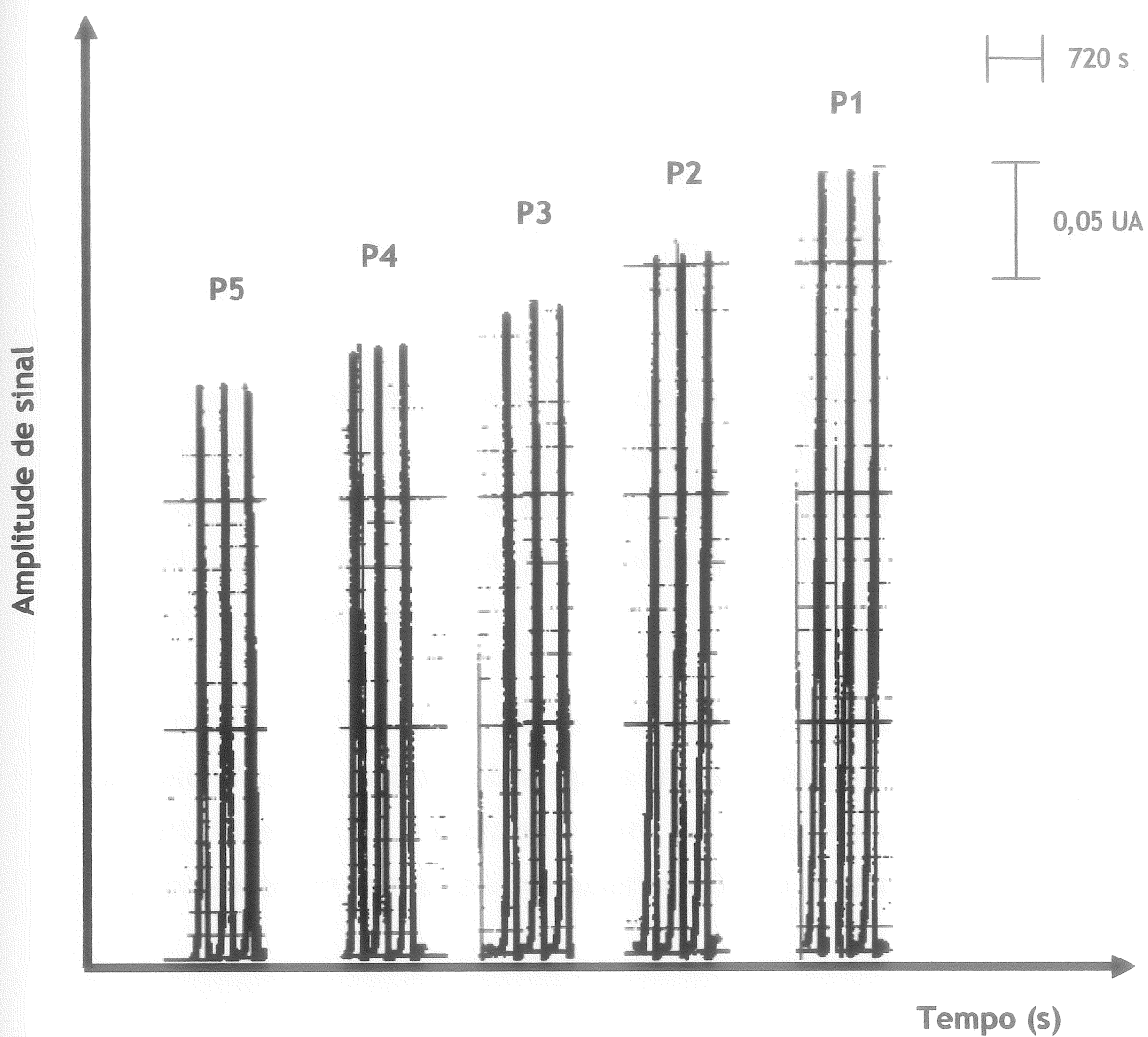


Figura 3.8 - Registo obtido no estabelecimento de uma curva de calibração. P1, P2, P3, P4, P5: Soluções padrão de alopurinol de concentrações 25; 37,5; 50; 62,5 e 75 μM , respectivamente.

3.1.3. Estudo de interferentes

Para efectuar este estudo, fez-se inicialmente o levantamento dos excipientes contidos nos comprimidos a analisar. Depois os excipientes potencialmente interferentes foram analisados de acordo com o descrito na secção 2.1. Os resultados obtidos encontram-se na tabela 3.5.

Relativamente aos excipientes amido, celulose monocristalina, glicolato de amido sódico e povidona, estes não apresentam massa molecular definida, pelo que a solução concentrada de cada um destes excipientes foi preparada em termos de quantidade em massa.

A avaliação da interferência de um excipiente englobou a medição do valor do sinal analítico obtido para uma solução padrão de alopurinol de 50 μM e sua comparação com o valor do sinal analítico da solução final (contendo 50 μM de alopurinol e, 5000 μM ou 680 mg/L de interferente, de acordo com o tipo de excipiente).

Esta comparação foi efectuada pela determinação do desvio relativo face ao valor do sinal analítico obtido para uma solução padrão de alopurinol de 50 μM (tabela 3.5). O excipiente para ser considerado interferente teria que provocar um desvio relativo superior a 3% no valor do sinal analítico.

Tabela 3.5 - Estudo dos excipientes potencialmente interferentes.

Excipiente potencialmente interferente	Desvio Relativo (%)
Aerosil 200 (SiO ₂)	1,4
Lactose	-0,3
Talco	1,0
Estereato de magnésio	0,6
Amido	-0,6
Celulose monocristalina	2,3
Glicolato de amido sódico	1,2
Povidona	2,0

Como se pode verificar pela observação da tabela 3.5, os excipientes analisados não provocam um desvio relativo superior a 3% e, portanto, pode inferir-se que não interferem na determinação.

3.2. Metodologia SIA para determinação cinética

O desenvolvimento desta metodologia teve como principais objectivos aumentar o ritmo de determinação e reduzir o consumo de reagentes e a produção de efluentes, relativamente ao método para determinação a tempo fixo.

Desta forma, utilizou-se o sistema proposto para a metodologia para determinação a tempo fixo já optimizado e introduziram-se algumas alterações, nomeadamente o caudal de aspiração a utilizar ser de 1,9 mL/min e, o caudal de propulsão de 3,8 mL/min. Estes caudais são bastante superiores aos empregues na metodologia para determinação a tempo fixo, o que permite aumentar o ritmo de determinação. Para além disso, estes caudais são mais adequados pois é necessário acompanhar o desenvolvimento do produto reaccional ao nível do detector desde o início da reacção enzimática, altura em que se verifica a relação de Michaelis-Menten.

Pela mesma razão, seleccionou-se um reactor com um comprimento de 60 cm (o que permitiu diminuir o trajecto do produto reaccional até à célula de fluxo comparativamente com a metodologia anterior) e uma configuração também em figuras de oito. O reactor, neste caso, não esteve sujeito a aquecimento em banho termostático.

O banho termostático a 30°C utilizado visou apenas o aquecimento do suporte da célula de fluxo.

Por fim, o ciclo analítico compreendeu a aspiração sequencial de:

- 400 μ L de uma solução de xantina de concentração 75 μ M;
- 50 μ L de amostra ou padrão de alopurinol. No caso do branco, aspirava-se 50 μ L de solução tampão;
- 100 μ L de solução de XO de concentração 0,148 U/mL (preparada por diluição em solução tampão).

Posteriormente, ocorria a propulsão destas três zonas aspiradas para o detector, utilizando como transportador solução tampão, seguindo-se um período de paragem durante o qual ocorria o desenvolvimento do produto reaccional e simultaneamente a aquisição do sinal analítico. No fim deste período de tempo procedia-se à lavagem do detector.

Neste caso, utilizam-se volumes de enzima e amostra inferiores aos da metodologia para determinação a tempo fixo. Este facto encontra-se directamente relacionado com o tamanho do segmento que se “aprisiona”, por paragem de fluxo, no campo de observação do detector.

3.2.1. Estudo dos parâmetros físico-químicos

Estudo do tempo de envio

A primeira etapa da optimização desta metodologia para determinação cinética foi o estudo do tempo de envio das três zonas aspiradas para o detector, após o qual ocorria um período de paragem. Para tal, utilizou-se apenas o sinal analítico do branco (ausência de inibição da reacção enzimática) e considerou-se que o período de paragem no detector seria de 45 s, durante o qual ocorria a monitorização da absorvância através da aquisição do sinal analítico. A análise dos dados provenientes desta aquisição foi efectuada através do traçado gráfico dos valores de absorvância em função do tempo.

O tempo de envio foi avaliado segundo a segundo, entre 7 e 14 s (figuras 3.9 e 3.10). Constatou-se que a velocidade de reacção (avaliada pelo declive do gráfico da absorvância em função do tempo) era máxima entre 10 e 12 s, pelo que se decidiu também testar como tempos de envio 10,5 e 11,5 s.

Os tempos de envio que permitiram obter resultados com uma velocidade de reacção superior e com melhor coeficiente de correlação foram 11; 11,5 e 12 s. No entanto, optou-se pelo tempo de envio de 11,5 s, uma vez que, apresentava uma velocidade de reacção 7,8% e 12,1% superior, relativamente ao tempo de envio de 11 s e 12 s, respectivamente.

Também foram estudados vários intervalos de tempo entre 0 e 45 s (dentro do período de paragem) com a finalidade de obter melhores resultados, mas constatou-se que estes eram obtidos quando se utilizava todo o intervalo de aquisição.

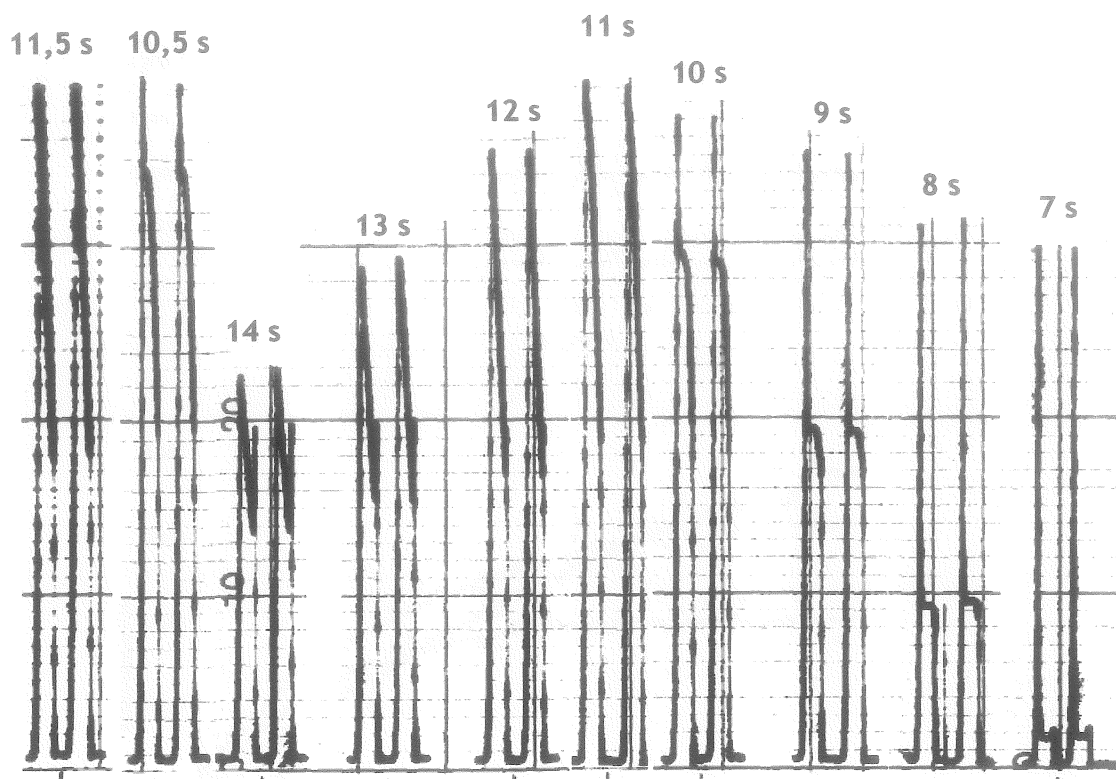


Figura 3.9 - Registo obtido no estudo dos tempos de envio das três zonas aspiradas para o detector. Por cima do sinal obtido encontra-se o tempo de envio utilizado. Os ensaios foram realizados em duplicado.

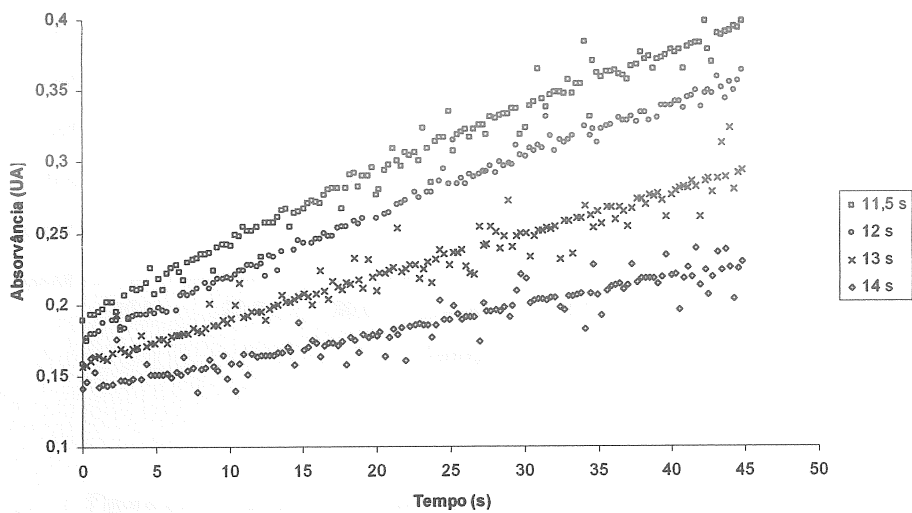
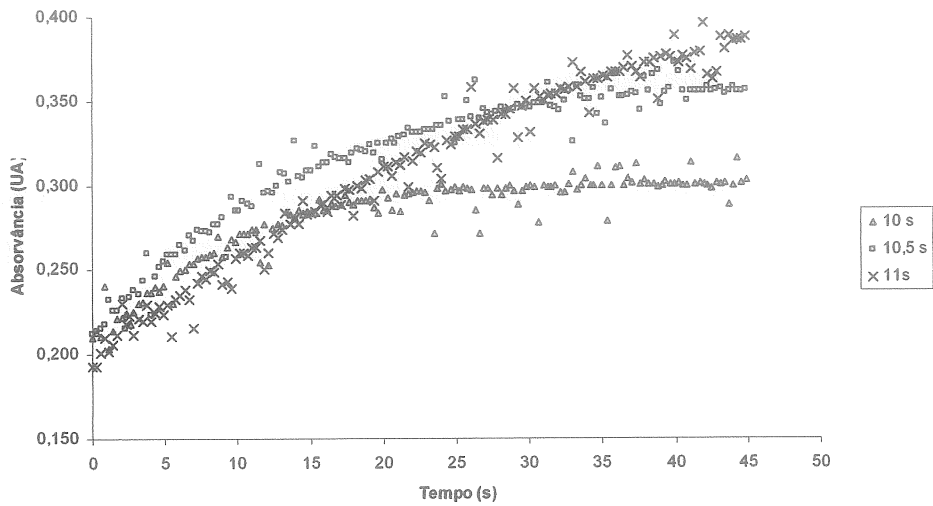
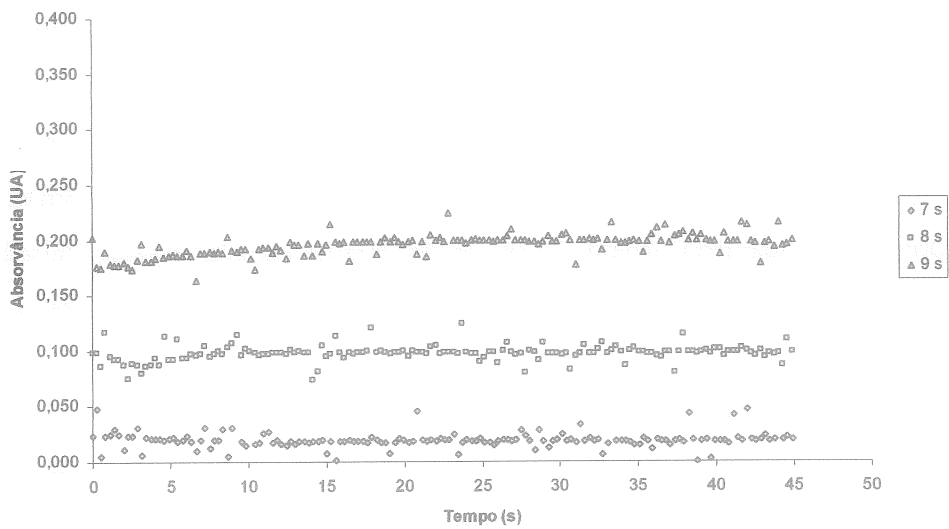


Figura 3.10 - Registo do sinal analítico em função do tempo para os vários tempos de envio estudados. Esta representação corresponde ao ensaio realizado com o branco.

Temperatura

O estudo da influência da temperatura foi efectuado com o sinal analítico do branco, variando a temperatura no suporte da célula de fluxo. Foram testadas temperaturas entre 25 e 50°C, cujos resultados se encontram representados na figura 3.11.

Como se pode verificar pela observação da figura, foi possível alcançar uma velocidade de reacção superior quando se utilizou uma temperatura de 30 °C, razão pela qual se manteve esta temperatura para prosseguir com as restantes optimizações.

Convém salientar que a 35°C o resultado foi bastante próximo do obtido a 30°C, no entanto, a velocidade de reacção obtida foi ligeiramente inferior. A partir de 35°C, a velocidade da reacção enzimática decresce devido à inactivação da enzima.

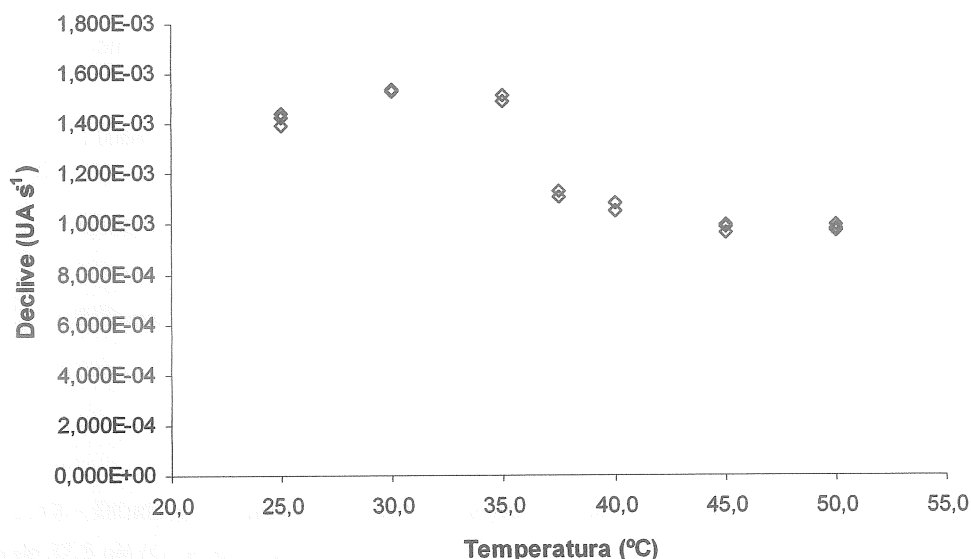


Figura 3.11 - Estudo da influência da temperatura no sinal analítico.

Volume e concentração da solução de xantina

O passo seguinte foi avaliar o volume de xantina e a sua influência na velocidade de reacção da metodologia. Para tal foram estudados volumes entre 100 e 500 μL , utilizando duas soluções padrão de concentrações distintas (figura 3.12).

Verificou-se que se obtinha uma maior velocidade de reacção enzimática, bem como, uma velocidade de reacção superior quando se aspirava um volume de 400 μL de xantina.

Pode observar-se um aumento gradual da velocidade de reacção com o incremento do volume de xantina aspirado até 400 μL . A partir deste volume, a velocidade de reacção manteve-se aproximadamente constante.

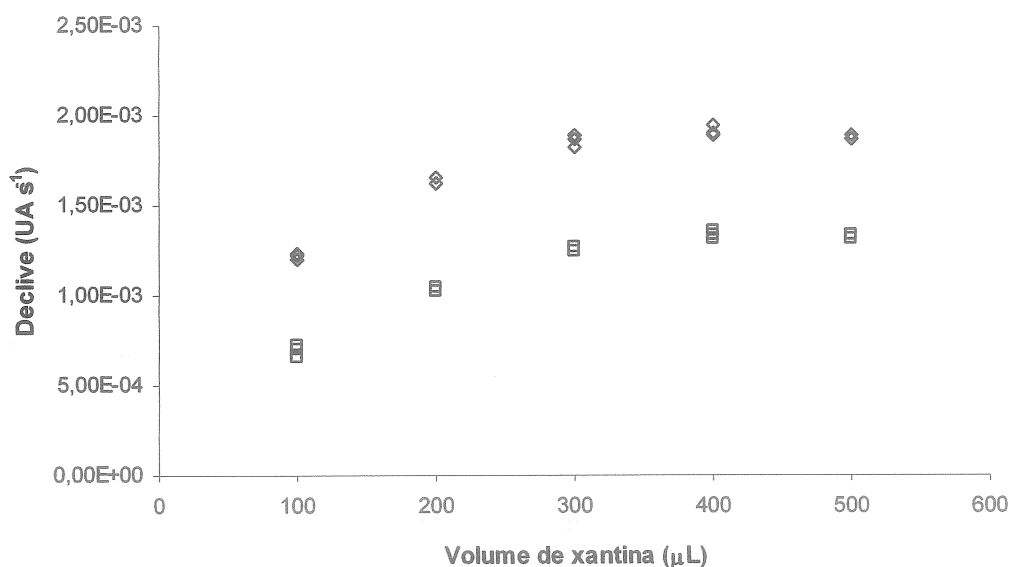


Figura 3.12 - Estudo da influência do volume de xantina na velocidade de reacção com uma solução padrão de 37,5 μM (\diamond) e 62,5 μM (\square).

Depois de definir o volume de xantina a utilizar, prosseguiu-se para o estudo da concentração de xantina. Testaram-se concentrações de 25, 50 e 75 μM de xantina e os resultados obtidos encontram-se na figura 3.13.

Estes ensaios foram realizados com soluções padrão de alopurinol de concentrações compreendidas entre 10 e 75 μM . Verificou-se que para todas as concentrações de alopurinol testadas, a concentração de xantina com a qual se obtinha uma maior velocidade de reacção era de 75 μM (fig. 3.13).

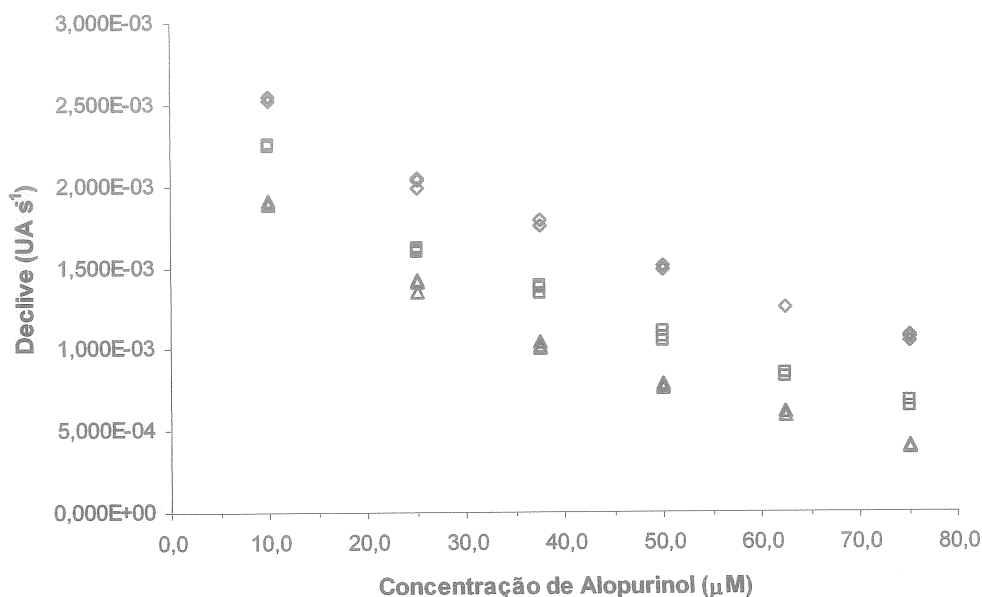


Figura 3.13 - Estudo das concentrações de xantina: 75 μM (◇), 50 μM (□) e 25 μM (Δ).

Concentração e volume da solução de xantina oxidase

A concentração de xantina oxidase foi estudada entre 0,074 e 0,592 U/mL. Este parâmetro foi avaliado utilizando o sinal analítico do branco e de dois padrões de alopurinol de concentrações 10 e 50 μM .

A relação entre absorvância e tempo obtida para concentrações de 0,074; 0,148 e 0,222 U/mL era linear em toda a sua extensão, contrariamente à obtida para 0,296 e 0,592 U/mL, que apenas se apresentava linear nos primeiros 30 s e 15 s, respectivamente (figura 3.14).

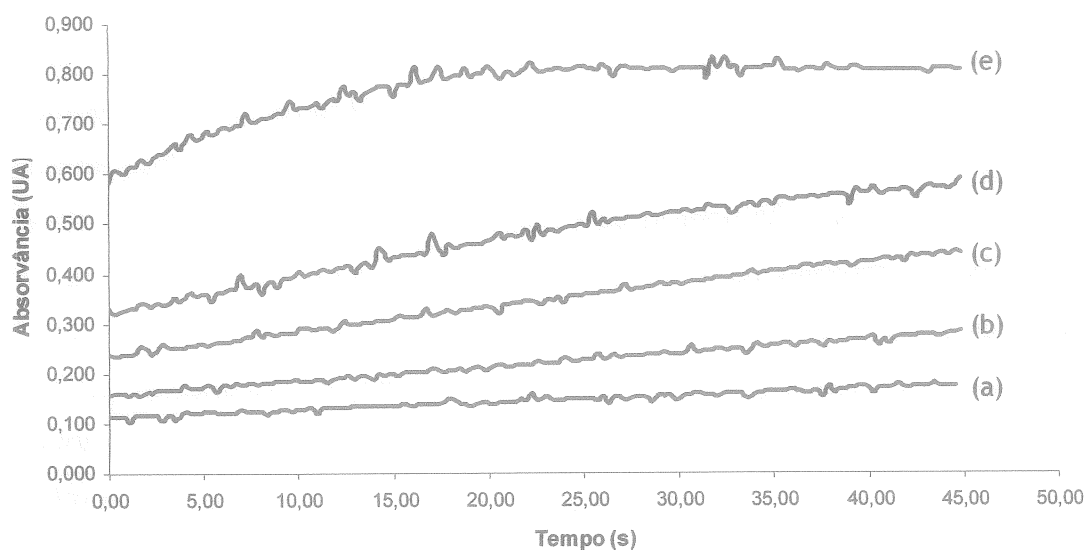


Figura 3.14 - Relação entre a absorvância e o tempo de aquisição para concentrações de xantina oxidase de 0,074 U/mL (a); 0,148 U/mL (b); 0,222 U/mL (c); 0,296 U/mL (d) e 0,592 U/mL (e). Esta representação corresponde apenas ao ensaio realizado com o branco.

Verificou-se também que à medida que aumentava a concentração de xantina oxidase, a sensibilidade, bem como, a velocidade de reacção eram superiores (tabela 3.6)

Tabela 3.6- Estudo das concentrações de xantina oxidase utilizando o branco e soluções padrão de alopurinol de concentrações 10 μM e 50 μM .

Concentração de XO (U/mL)	Declive (UA s^{-1})		
	Branco	Solução alopurinol 10 μM	Solução alopurinol 50 μM
0,074	$1,41 \times 10^{-3}$	$1,06 \times 10^{-3}$	$5,52 \times 10^{-4}$
0,148	$2,74 \times 10^{-3}$	$2,32 \times 10^{-3}$	$1,36 \times 10^{-3}$
0,222	$4,65 \times 10^{-3}$	$4,00 \times 10^{-3}$	$2,37 \times 10^{-3}$
0,296	$6,90 \times 10^{-3}$	-	-
0,592	$1,17 \times 10^{-2}$	-	-

Para cada concentração de xantina oxidase testava-se sequencialmente o branco, padrão de alopurinol de 10 e 50 μM . Observou-se que as soluções enzimáticas de concentração 0,296 e de 0,592 U/mL não eram homogêneas, tratando-se na realidade suspensões, pelo que se depositava grande parte de enzima. Assim, quando ocorria a aspiração desta solução, verificava-se que para o sinal analítico do branco não havia qualquer tipo de problema, mas quando se prosseguia para os padrões, ocorria uma perda abrupta e progressiva da actividade enzimática. A enzima, uma vez que se encontrava depositada no fundo do recipiente, era consumida maioritariamente nos primeiros ensaios, restando cada vez menos para os últimos ensaios.

Partindo deste pressuposto, era necessário estudar qual das concentrações de xantina oxidase - 0,148 e 0,222 U/mL - era mais conveniente. Isso foi efectuado através do estabelecimento de curvas de calibração (5 - 50 μM) (figura 3.15 e tabela 3.7).

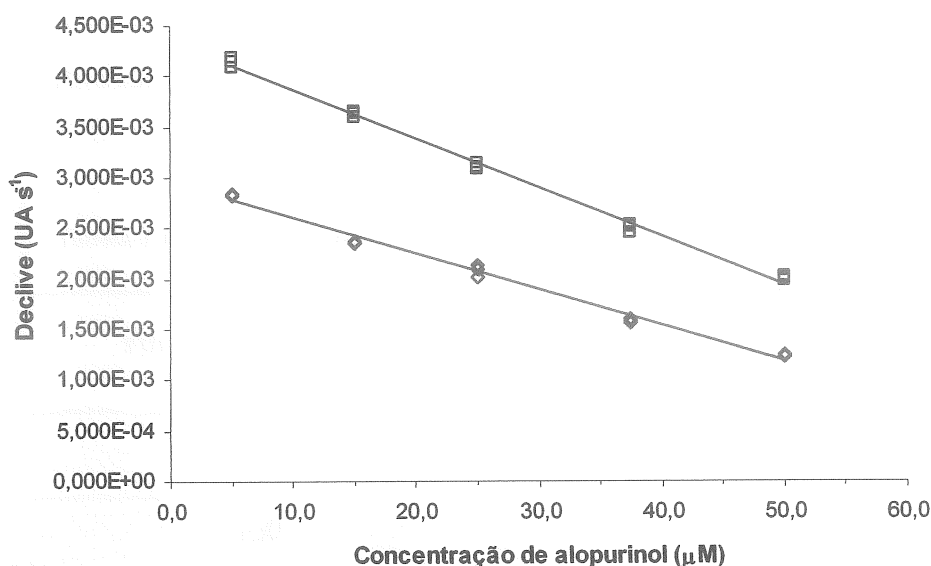


Figura 3.15 - Estudo das concentrações de xantina oxidase de 0,148 U/mL (\diamond) e de 0,222 U/mL (\square).

Tabela 3.7- Equações de recta e valores de coeficiente de correlação obtidos no estudo da concentração de xantina oxidase.

Concentração de XO (U/mL)	Equação da recta obtida	Coefficiente de Correlação
0,148	$y = -3,51 \times 10^{-5} x + 2,95 \times 10^{-3}$	-0,9952
0,222	$y = -4,81 \times 10^{-5} x + 4,35 \times 10^{-3}$	-0,9979

Desta avaliação concluiu-se que utilizando uma concentração de xantina oxidase de 0,222 U/mL, para além de se obter um coeficiente de correlação melhor, a sensibilidade era superior.

O último estudo incidiu sobre o volume de xantina oxidase. Foram testados volumes entre 50 e 200 μ L. Previamente a esta avaliação foi necessário estudar novamente o tempo de envio para o detector, pois ao alterar o volume de xantina oxidase, o segmento que se “aprisiona” no campo de observação do detector, por paragem de fluxo, não é o mesmo. É necessário então proceder a este estudo para obter uma maior sensibilidade. Os resultados encontram-se na tabela 3.8.

Tabela 3.8- Estudo do tempo de envio em função do volume de enzima aspirado.

Volume de XO (μ L)	Tempo de Envio (s)
50	9,5
100	11,5
150	11,5
200	13,0

A relação entre absorvância e tempo obtida para o volume de 100 μL era linear em toda a sua extensão, contrariamente à obtida para os restantes volumes, que apenas se apresentava linear nos primeiros 20 s (volumes de 150 e 200 μL) e 30 s (volume de 50 μL) (figura 3.16).

A aquisição de sinal apenas em 20 s é bastante limitativa porque os dez segundos após paragem de fluxo são utilizados para a estabilização da solução na célula de fluxo, pelo que se decidiu não utilizar os volumes de 150 e 200 μL . Relativamente aos dois outros volumes, optou-se pelo de 100 μL pois apresentava uma velocidade de reacção superior à obtida com 50 μL .

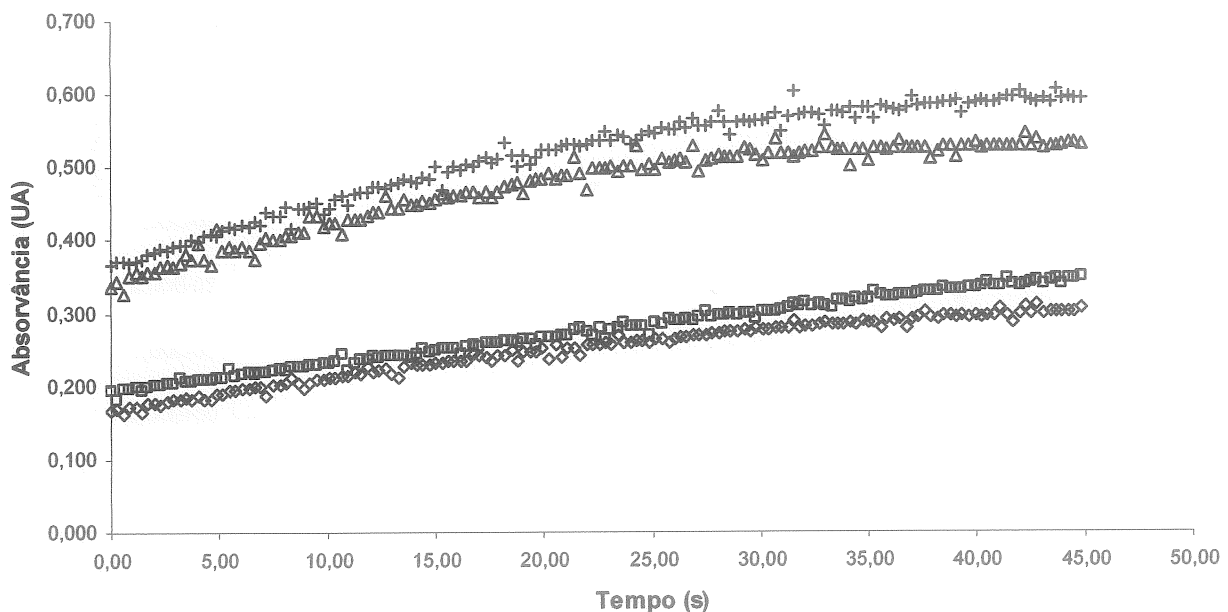


Figura 3.16 - Relação entre a absorvância e o tempo de aquisição para volumes de xantina oxidase de 50 μL (◇), 100 μL (□), 150 μL (Δ) e 200 μL (+). Esta representação corresponde apenas ao ensaio realizado com o branco.

Tendo em conta as limitações referidas, realizou-se uma curva de calibração para cada um dos volumes de xantina em estudo (figura 3.17). A curva de calibração foi estabelecida com soluções padrão de alopurinol de concentrações compreendidas entre 5 e 50 μM .

Constatou-se o esperado: à medida em que aumenta o volume de enzima, a sensibilidade vai sendo superior. Não obstante e, pelas razões mencionadas, o volume de xantina oxidase escolhido para terminar a optimização deste sistema foi de 100 μL .

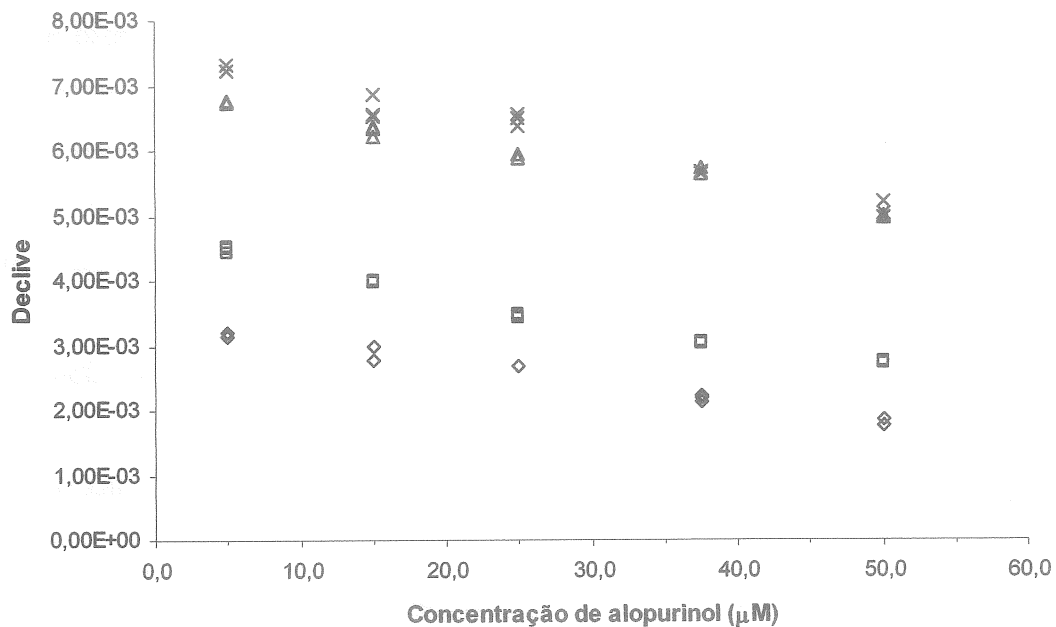


Figura 3.17 - Estudo dos volumes de xantina oxidase de 50 μL (◇), 100 μL (□), 150 μL (Δ) e 200 μL (×).

Na tabela 3.9 encontram-se resumidos os parâmetros e o intervalo de valores estudados para cada um deles e respectivos valores finais escolhidos para a operação do sistema SIA para determinação cinética.

Tabela 3.9 - Intervalo de valores usados no estudo das variáveis do sistema SIA para determinação cinética e condições escolhidas para o seu funcionamento.

Parâmetro	Valores Estudados	Valores Escolhidos
Caudal de aspiração (mL/min)	-	1,9
Caudal de propulsão (mL/min)	-	3,8
Tempo de envio (s)	7 - 14	11,5
Tempo de aquisição (s)	-	0 - 45
Concentração de xantina (μM)	25 - 100	75
Volume de xantina (μL)	100 - 500	400
Concentração de xantina oxidase (U/mL)	0,074 - 0,592	0,222
Volume de xantina oxidase (μL)	50 - 200	100
Concentração de alopurinol (μM)	1 - 75	5 - 25
Temperatura ($^{\circ}\text{C}$)	25 - 50	30

3.2.2. Parâmetros de calibração do sistema

Após o desenvolvimento e optimização da metodologia SIA para determinação cinética procedeu-se à sua caracterização de acordo com o referido na secção 2.4. A tabela 3.10 resume os parâmetros avaliados.

Tabela 3.10 - Parâmetros de calibração do sistema.

Parâmetro	
Limite de detecção	1,0 μM
Limite de quantificação	3,4 μM
Intervalo de linearidade	5 - 25 μM
Precisão (DPR)	<2,2 %
Ritmo de determinação	34 h^{-1}

Relativamente à precisão, a metodologia proposta foi avaliada através da determinação do desvio padrão relativo (DPR), expresso em percentagem, de um conjunto de 5 injeções consecutivas de cada amostra. Os valores de DPRs variaram entre 0,8 e 2,2%, o que permite concluir que o sistema desenvolvido apresenta uma boa repetibilidade e, logo, uma boa precisão.

3.3. Aplicação às amostras

No caso da metodologia SIA para determinação a tempo fixo, a concentração de alopurinol (μM) de cada amostra foi determinada utilizando uma curva de calibração previamente estabelecida, na qual se interpolava o valor de cada absorvância dos três sinais analíticos obtidos a partir do processamento de três alíquotas da mesma amostra. Posteriormente, calculava-se a concentração de alopurinol, em mg/L, contida num comprimido para cada um dos três valores obtidos. Por fim, o resultado final era apresentado como a média destes três valores, conjuntamente com o desvio padrão associado.

Relativamente à metodologia SIA para determinação cinética, a concentração de alopurinol foi determinada da mesma forma que para a metodologia para determinação a tempo fixo, com duas exceções: as alíquotas processadas de cada amostra eram cinco em vez de apenas três e, o valor que se interpolava na curva de calibração correspondia à percentagem de inibição. Poderia ter-se usado igualmente o valor do declive, mas foi com a percentagem de inibição que se obteve valores mais concordantes.

No que diz respeito ao método de referência, depois de se realizar três ensaios para cada amostra, interpolava-se o valor das absorvâncias obtidas na equação de Lambert-Beer. O resultado final era dado em mg/L de alopurinol, sendo calculado da mesma forma como para a metodologia SIA para determinação a tempo fixo.

Na tabela 3.11 encontram-se os valores de concentração obtidos e respectivo desvio padrão, para as duas metodologias SIA propostas, bem como, para o método de referência. Apresenta-se igualmente o desvio relativo, expresso em percentagem.

Tabela 3.11 - Resultados obtidos na análise de 8 preparações farmacêuticas pelo método SIA para determinação a tempo fixo (SIA_{fixo}), pelo método SIA para determinação cinética (SIA_{cin}) e pelo método de referência, expressos em mg/L. DR: desvio relativo, expresso em percentagem.

Amostra	Método de Referência	SIA_{fixo}	DR (SIA_{fixo})	SIA_{cin}	DR (SIA_{cin})
Ratiopharm 300 mg	298,9 ± 0,0	299,1 ± 7,2	+0,1	294,2 ± 9,0	-1,6
Alosfar 300 mg	299,6 ± 0,2	320,1 ± 3,3	+6,8	304,7 ± 16,9	+1,7
Zyloric 300 mg	302,5 ± 0,2	301,7 ± 5,6	-0,3	297,6 ± 27,5	-1,6
Uriprim 300 mg	297,9 ± 0,3	307,5 ± 2,4	+3,2	280,1 ± 19,1	-6,0
Zurim 300 mg	292,0 ± 0,3	301,1 ± 6,4	+3,1	272,6 ± 6,9	-6,6
Zurim 100 mg	97,3 ± 0,1	93,6 ± 0,8	-3,8	107,1 ± 9,8	+10
Zyloric 100 mg	97,3 ± 0,1	101,2 ± 0,8	+4,0	88,8 ± 1,1	-8,7
Uriprim 100 mg	101,4 ± 0,1	99,9 ± 1,9	-1,5	104,9 ± 3,5	+3,6

Comparando os resultados obtidos com as metodologias propostas com o método de referência, constata-se que apresentam uma concordância aceitável. Pela análise da tabela 3.11, podemos ainda inferir que os desvios relativos, assim como os desvios padrão obtidos, se encontram ligeiramente incrementados na metodologia para determinação cinética comparativamente com a de tempo fixo.

Convém ainda salientar que o facto dos desvios relativos serem tanto positivos quanto negativos, permite afirmar que o sistema proposto não condiciona o aumento ou a diminuição dos valores de concentração das amostras de uma forma sistemática.

Para avaliar a exactidão entre os resultados obtidos pelos métodos propostos e pelo método de referência, realizou-se o teste estatístico t de Student emparelhado [Miller e Miller, 1993].

Os valores de t obtidos para a metodologia SIA para determinação a tempo fixo e para a metodologia SIA para determinação cinética foram respectivamente de 1,64 e 1,21. Em ambas as situações foi assumido um nível de significância de 95%. De seguida comparou-se os valores de t calculados com o valor de t tabelado, que corresponde a 2,36. O facto dos valores de t calculados serem inferiores ao tabelado permite concluir que as diferenças entre os resultados obtidos são devidas ao acaso.

Foi igualmente realizado o teste t de Student emparelhado para a comparação entre as duas metodologias SIA. O valor obtido foi 1,77 que é inferior ao valor de t tabelado, o que permite analogamente concluir que as diferenças entre os resultados obtidos são devidas ao acaso.

4. CONCLUSÕES

Neste trabalho desenvolveu-se, pela primeira vez, duas metodologias SIA para a determinação da quantidade de alopurinol em formulações farmacêuticas, visando o seu controlo de qualidade. As principais características dos sistemas desenvolvidos encontram-se resumidas na tabela 4.1.

Tabela 4.1 - Características relevantes dos sistemas SIA desenvolvidos para a análise de alopurinol em preparações farmacêuticas.

Características	Metodologia SIA	
	Tempo fixo	Cinética
Limite de detecção (μM)	6,9	1,0
Limite de quantificação (μM)	22,9	3,4
Precisão (DPR) (%)	<2,4	<2,2
Ritmo de determinação (h^{-1})	15	34

Ambos os sistemas desenvolvidos apresentam um desvio padrão relativo aceitável, o que demonstra que apresentam uma boa repetibilidade e, portanto, uma boa precisão.

Quando comparados os resultados obtidos com os sistemas propostos e com o método de referência, pôde verificar-se que os desvios relativos entre eles eram inferiores a 6,8% e a 10%, no caso da metodologia para determinação a tempo fixo e da metodologia para determinação cinética, respectivamente. A exactidão foi confirmada pela realização do teste *t* de Student emparelhado, cujos resultados permitiram concluir que não havia evidência de desvios sistemáticos.

A metodologia para determinação cinética apresentou um ritmo de determinação superior em mais do dobro relativamente à metodologia para determinação a tempo fixo, o que permite evidenciar a sua supremacia no que concerne a economia de tempo. Para além disso, ambas as metodologias desenvolvidas apresentam um ritmo de determinação significativamente superior ao obtido pelo método de referência (cada determinação demorava cerca de uma hora). Isto permite que as metodologias propostas sejam aplicadas no controlo de qualidade diário em larga escala.

Os sistemas desenvolvidos são simples, fiáveis e encontram-se adaptados ao conceito de “Química Verde”, na medida em que primam pela utilização de baixas quantidades de reagentes e pela redução do volume de efluente gerado, o que contribui para a diminuição dos custos operacionais associados à análise propriamente dita, bem como os relacionados com o tratamento dos efluentes produzidos.

Tabela 4.2 - Volume de reagentes utilizados e efluentes produzidos por determinação.

	Método de Referência	Metodologia SIA	
		Tempo fixo	Cinética
Volume de Reagentes	500 mL	800 µL	550 µL
Volume de Efluentes	500 mL	3800 µL	3270 µL

Como se pode verificar pela análise da tabela 4.2, os sistemas propostos reduzem drasticamente quer o volume de reagentes utilizados, quer o volume de efluentes gerados, o que representa elevada importância em termos ambientais. Para além disso, ainda se conseguiu alcançar um consumo de reagentes e produção de efluentes ligeiramente inferiores no desenvolvimento da metodologia para determinação cinética face à de tempo fixo.

Convém salientar que, contrariamente ao método de referência, as metodologias desenvolvidas assentaram na utilização de uma enzima. Isto proporciona algumas vantagens, nomeadamente o facto das enzimas apresentarem elevada sensibilidade, uma boa selectividade e a sua aplicação envolver tempos de análise reduzidos (pois apresentam respostas rápidas). Não obstante, a sensibilidade a factores ambientais, como pH e temperatura, e o facto de terem um tempo de vida limitado, constituem algumas das desvantagens da utilização de enzimas.

É ainda de realçar que as montagens SIA estão geralmente associadas a elevada versatilidade, associada à sua adaptação a diversas determinações apenas por alteração dos parâmetros do sistema controláveis por processador e à eficiente utilização das soluções, permitindo uma diminuição do consumo de reagentes (e, conseqüentemente, uma minimização de resíduos). Este facto permite antever a possibilidade de alargamento da aplicabilidade dos sistemas desenvolvidos à determinação de alopurinol em fluidos biológicos, ou mesmo a sua aplicação a outras preparações farmacêuticas que também contenham inibidores da xantina oxidase.

REFERÊNCIAS

Borges, F., Fernandes, E. e Roleira, F. 2002. Progress towards the discovery of xanthine oxidase inhibitors. *Current Medicinal Chemistry* 9: 195.

British Pharmacopoeia 2005, volume III, 2211-2212.

Cataldi, T. R. I., Palmissano, F. e Zambonin, P. G. 1989. Flow injection with anodic polarographic detection for the determination of allopurinol in pharmaceutical formulations. *Analyst* 114: 1449.

Christian, G. D. e Ruzicka, J. 1992. Exploiting stopped-flow injection methods for quantitative chemical assays. *Analytica Chimica Acta* 261: 11.

Cladera, A., Gómez, E., Estela, J. M. e Cerda, V. 1996. Effect of variables influencing $S_{1/2}$ in sequential injection analysis. Extrapolability of $S_{1/2}$ based results between SIA designs. *Talanta* 43: 1667.

Cladera, A., Tomàs, C., Gómez, E., Estela, J. M. e Cerda, V. 1995. A new instrumental implementation of sequential injection analysis. *Analytica Chimica Acta* 302: 297.

Gennaro, A. R., Chase, G. D., Marderosian, A. D., Harvey, S. C. e Hussar, D.A. 1990. *Remington's Pharmaceutical Sciences*, 18ª edição, Mack Publishing Company, USA.

Gubeli, T., Christian, G. D. e Ruzicka, J. 1991. Fundamentals of sinusoidal flow sequential injection spectrophotometry. *Analytical Chemistry* 63: 2407.

Hille, R. e Nishino, T. 1995. Flavoprotein structure and mechanism. 4. Xanthine oxidase and xanthine dehydrogenase. *FASEB Journal* 9: 995.

Ichida, K., Amaya, Y., Noda, K., Minoshima, S., Hosoya, T., Sakai, O., Shimizu, N. e Nishino, T. 1993. Cloning of the cDNA encoding human xanthine dehydrogenase (oxidase): Structural analysis of the protein and chromosomal location of the gene. *Gene* 133 (2): 279.

International Union of Pure and Applied Chemistry (IUPAC) 1976. Nomenclature, symbols and their usage in spectrochemical analysis - II. Data Interpretation. *Analytical Chemistry* 48: 2294.

International Union of Pure and Applied Chemistry (IUPAC) 1995. Nomenclature in evaluation of analytical methods including detection and quantification capabilities. *Pure and Applied Chemistry* 67: 1699.

Ivaska, A. e Ruzicka, J. 1993. From flow injection to sequential injection: comparison of methodologies and selection of liquid drives. *Analyst* 118: 885.

Many, A., Hubel, C. A. e Roberts, J. M. 1996. Hyperuricemia and xanthine oxidase in preeclampsia. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, 174 (1): 288.

Marshall, G. D. e van Staden, J. F. 1992. Operational parameters affecting zone penetration in sequential injection analysis. *Process Control and Quality* 3: 251.

Massey, V., Komai, H., Palmer, G. e Elion, G. B. 1970. On the Mechanism of Inactivation of Xanthine Oxidase by Allopurinol and Other Pyrazolo[3,4-d]pyrimidines. *Journal of Biological Chemistry* 245: 2837.

Miller, J. C. e Miller, J. N. 1993. *Estadística para Química Analítica*. 2ª edição, Addison-Wesley Ibroamerican, S.A., Wilmington, USA.

Radi, R., Rubbo, H., Bush, K. e Freeman, B. A. 1997. Xanthine Oxidase Binding to Glycosaminoglycans: Kinetics and Superoxide Dismutase Interactions of Immobilized Xanthine Oxidase-Heparin Complexes. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 339 (1): 125.

Ruiz, T. P., Lozano, C. M., Tomás, V. e Galera, R. 2003b. Development of a capillary electrophoresis method for the determination of allopurinol and its active metabolite oxypurinol. *Journal of Chromatography B* 798: 303.

Ruiz, T. P., Lozano, C. M., Tomás, V. e Martín, J. 2003a. Determination of allopurinol by micelle-stabilised room-temperature phosphorescence in real samples. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 32: 225.

Ruzicka, J. e Hansen, E. H. 1988. *Flow injection analysis*. 2ª edição, John Wiley & Sons, New York, USA.

Ruzicka, J. e Marshall, G. D. 1990. Sequential injection: a new concept for chemical sensors, process analysis and laboratory assays. *Analytica Chimica Acta* 236: 329.

Xia, M., Robert, D. e Hille, R. 1999. The Reductive Half-reaction of Xanthine Oxidase. Reaction with aldehyde substrates and identification of the catalytically labile oxygen. *Journal of Biological Chemistry* 274: 3323.

Zen, J. M., Chen, P. Y. E Kumar, A. S. 2002. Flow injection analysis of allopurinol by enzymeless approach at glassy carbon electrode. *Electroanalysis* 14: 645.

