

Desenvolvimento e validação de método analítico titulométrico para o controle de qualidade de levofloxacin em comprimidos

Mirella Carla Galana Gerlin¹, Patrícia Espinosa dos Santos¹, Teófilo Fernando Mazon Cardoso¹, Marcos Serrou do Amaral², Nájla Mohamad Kassab^{1*}

¹Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Alimentos e Nutrição (FACFAN), Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (UFMS), Campo Grande, 79070-900, Campo Grande (MS), Brasil,

²Instituto de Física, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (UFMS), Campo Grande, 79070-900, Campo Grande (MS), Brasil

¹nmkassab@gmail.com

Resumo

Levofloxacin é um agente antimicrobiano de amplo espectro usado no tratamento de infecções respiratórias. Considerando o alto consumo desse antimicrobiano, é fundamental realizar o controle de qualidade para garantir a segurança e eficácia, pois desvios de qualidade podem prejudicar a saúde dos pacientes e contribuir para o surgimento de resistência bacteriana. Para a determinação e controle de qualidade da levofloxacin, diversos métodos analíticos são descritos na literatura empregando cromatografia líquida de alta eficiência e espectrofotometria. Neste estudo, é proposto um novo método analítico, ecologicamente correto, que não requer o uso de solvente tóxico ou equipamentos caros. Etanol foi usado como meio de dissolução do fármaco e hidróxido de sódio como titulante. A validação foi realizada de acordo com a Resolução 166/2017 da ANVISA. O método desenvolvido foi satisfatório nos testes de linearidade, precisão, exatidão, robustez e seletividade. Além disso, mostrou-se sensível, com limite de quantificação de 2,77 mg. O método titulométrico desenvolvido foi comparado a um método espectrofotométrico previamente validado, e ambos apresentaram resultados semelhantes na dosagem do fármaco em comprimidos, comprovando a eficiência do método proposto. Além disso, o método validado é econômico, rápido, não exige equipamentos caros e evita o uso e o descarte de solventes muito tóxicos.

Palavras-chave: Levofloxacin, Fluoroquinolona, Controle de qualidade, Validação, Titulométrico, análise farmacêutica.

Abstract

Levofloxacin is a broad-spectrum antimicrobial agent used for the treatment of respiratory infections. Considering the high consumption of this antimicrobial, it is essential to perform quality control to ensure safety and efficacy, since quality deviations can harm the health of patients and contribute to the emergence of bacterial resistance. For the determination and quality control of levofloxacin, several analytical methods are described in the literature, employing high-performance liquid chromatography and spectrophotometry. In this study, a novel procedure for an environmentally friendly analytical method is proposed, which does not require the use of a toxic solvent or expensive equipment. Using ethanol as dissolution medium to the drug, and sodium hydroxide as titrant. The validation was carried out following ANVISA Resolution 166/2017. The developed method was satisfactory in linearity, precision, accuracy, robustness, and selectivity tests. Furthermore, it proved to be sensitive, with a quantification limit of 2.77 mg. The titrimetric method developed was compared to a previously validated spectrophotometric method, and both presented similar results in the dosage of the drug in tablets, proving the efficiency of the proposed method. In addition, it is economical, fast, does not require costly equipment, and avoids the use and disposal of very toxic solvents.

Keywords: Levofloxacin, Fluoroquinolone, Quality Control, Validation, Titrimetric, Pharmaceutical analysis.

Introdução

A primeira quinolona de uso clínico foi descoberta acidentalmente por Lescher em 1962 durante a síntese de um composto antimalárico, a cloroquina. Ao introduzir o fármaco na terapêutica de algumas infecções em 1963, foi constatado que este continha atividade antibacteriana [1].

Os primeiros fármacos quinolônicos possuíam estreito espectro de atividade e farmacocinéticas desfavoráveis. Atualmente, as quinolonas ou fluoroquinolonas são amplamente utilizadas no tratamento de uma variedade de infecções causadas por bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, incluindo micobactérias e anaeróbios [2].

A Organização Mundial de Saúde (OMS), elegeu o levofloxacino como fármaco seguro e eficaz. O *Food and Drug Administration* (FDA) o aprovou para uso clínico nos Estados Unidos para o tratamento de pneumonia nosocomial, comunitária, rinossinusite bacteriana, exacerbação bacteriana aguda de bronquite crônica, prostatite, pielonefrite aguda, infecção do trato urinário, infecções da pele, na profilaxia e tratamento da peste causada por *Yersinia pestis* e para diminuir a progressão da doença causada por inalação de antraz. Além disso, o levofloxacino também é empregado no tratamento da conjuntivite bacteriana [3].

O levofloxacino $[-(-)(S)-9\text{-fluoro-2,3-dihidro-3-metil-10-(4-metil1-piperazinil)-7-oxo-7H-pirido[1,2,3-de]-1,4-benzoxazina-6-carboxílico ácido hemi-hidrato}]$ (Figura 1).

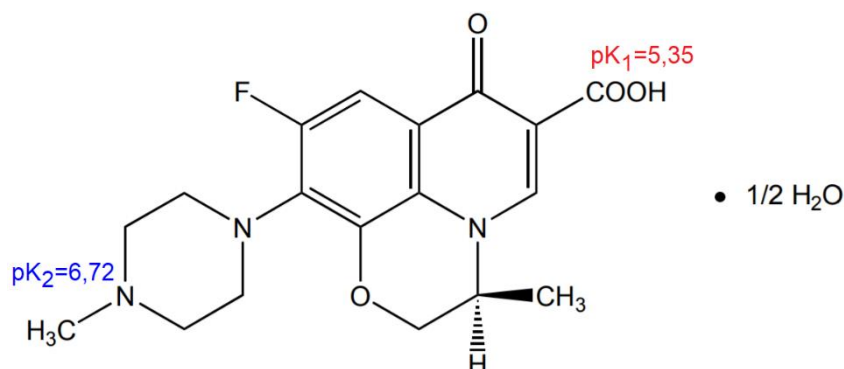


Figura 1: Estrutura molecular do levofloxacino hemi-hidrato, ilustrada com seus respectivos pKas.

A forma empírica do levofloxacino é $C_{18}H_{20}FN_3O_4 \cdot \frac{1}{2} H_2O$ e a massa molar é de 370,38 g/mol, apresenta-se como um pó branco cristalino levemente amarelado, com faixa de fusão entre 225-227 °C, com decomposição [4]. Apresenta 2 pKas: pKa₁ 5,35 (porção do ácido carboxílico) e 6,20 (para o nitrogênio do anel piperazina) [5], solúvel em água, ácido acético glacial, levemente solúvel em diclorometano, metanol [6-7], solúvel em etanol [8], dimetilsulfóxido e dimetilformamida [9]. Em pH 6,1, aproximadamente 67% da molécula está na forma *zwitterionica*. A maior solubilidade desse fármaco se dá em pH menor que 3 e maior que 9 (361,33 mg/mL) [5].

Levofloxacino é uma molécula quiral (S-isômero), da terceira geração das fluoroquinolona, com atividade antibacteriana até 128 vezes maior que seu isômero-R (ofloxacino) [4] e mais ativa que o ciprofloxacino contra algumas cepas [2]. O mecanismo de ação dessa classe de fármacos incide sobre a replicação e transcrição do DNA bacteriano de modo a corromper as atividades de várias enzimas como a DNA-girase (bactérias Gram-negativas) e a Topoisomerase IV (bactérias Gram-positivas), levando à morte das células bacterianas [10-11].

Para o sucesso do tratamento de doenças infecciosas é preciso que a concentração de agentes microbianos no local da infecção esteja adequada, para isso é necessário que a potência dos antimicrobianos nas preparações farmacêuticas que serão administradas seja precisa. Se o teor de ativos estiver abaixo do rotulado, o fármaco pode não atingir uma concentração capaz de exercer o efeito biológico esperado. Por outro lado, se a concentração estiver acima, poderá provocar efeitos tóxicos [12].

As metodologias analíticas aplicadas na realização do doseamento (determinação de teor) de fármacos baseiam-se em métodos instrumentais, como a Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) e na Espectrofotometria UV/Vis e, também, em métodos clássicos, como as titulações e as reações de oxirredução, complexação e volumetria de neutralização [13]. Na técnica chamada de volumetria de neutralização, determina-se o ponto de equivalência como a quantidade da base adicionada equivalente à quantidade do ácido presente no analito e *vice-versa*. Substâncias orgânicas chamadas de indicadores ácido-base são em geral empregadas para esse tipo de reação química. Os indicadores alteram a cor da solução devido a mudanças de pH, mas especificamente, devido a sua forma ionizada ou molecular, segundo o pH da solução [14-15-16].

Vários métodos de análise para o levofloxacinó em amostras farmacêuticas e biológicas que estão disponíveis na literatura. Estes métodos incluem a CLAE [17-18-19-20-21], espectrofotometria na região do UV [22-23-24], mas em geral são mais caros, exigem pessoal treinado e nem todo laboratório analítico dispõe de equipamentos para essa finalidade.

Assim, o presente estudo teve como objetivo desenvolver e validar um novo método analítico clássico, ecologicamente correto, que não requer o uso de solventes tóxicos ou equipamentos caros, para a quantificação do levofloxacinó em comprimidos, por meio da titulação em meio não aquoso, empregando etanol como meio de dissolução do fármaco, e compará-lo a um método analítico instrumental anteriormente validado por espectrofotometria na região do ultravioleta.

PARTE EXPERIMENTAL

MATERIAL

Reagentes

Os reagentes utilizados foram etanol (Chemco[®], Dinâmica[®]), metanol (Proquimios[®]), acetonitrila (Dinâmica[®]) hidróxido de sódio (Vetec[®] e Synth[®]) 0,1 Molar (M) solução volumétrica (SV) com fator de correção de 1,012 e fenoltaleína (Sigma-Aldrich[®]) a 1% em etanol, todos de grau analítico. Placas cromatográficas em folha de alumínio (cromatofolha) de sílica gel 60 F₂₅₄ da Machery-Nagel[®].

Equipamentos

Espectrofotômetro UV-Vis Thermo Scientific[®], modelo Evolution 60 com cubetas de quartzo de 1 cm de caminho óptico. Medidor de pH (peagâmetro) da marca HANNA Instruments[®], modelo HI 9321. Banho de ultrassom Unique[®] e modelo Ultra Cleaner 1400. Medidor digital de ponto de fusão GEHAKA[®]. Câmara escura para revelação de placa de cromatografia com lâmpadas de 254 e 365 nm, modelo SL – 204 da SOLAB[®] e balança analítica Zhimadzu Ay 220.

Padrão secundário

A matéria-prima hemi-hidrato de levofloxacinó Lote: DK21016095122, teor declarado: 99,99%, segundo laudo de qualidade, foi adquirida da distribuidora de insumos farmacêuticos Pharma Nostra[®]. Essa matéria-prima foi utilizada no lugar da substância química de referência (SQR) sem qualquer purificação prévia. Após a caracterização da SQR, esta foi denominada Substância Química Caracterizada (SQC).

Amostra comercial

Foram utilizados comprimidos revestidos de levofloxacino do laboratório RANBAXY® na forma de hemi-hidrato (512,5 mg correspondentes a 500 mg de levofloxacino base livre). Os excipientes descritos na bula eram: celulose microcristalina, croscarmellose sódica, dióxido de silício, estearato de magnésio, lauril sulfato de sódio, povidona, hipromelose, macrogol, dióxido de titânio rutilo, óxido de ferro amarelo e óxido de ferro vermelho.

MÉTODOS

Caracterização da matéria-prima

Cromatografia em Camada Delgada (CCD)

O procedimento da CCD foi adaptado da monografia do fármaco ciprofloxacino na Farmacopeia Brasileira (2019) [14], utilizando cromatofolha, como suporte e a mistura de cloreto de metileno, metanol, hidróxido de amônio e acetonitrila (4:4:2:1 v/v), como eluente ou fase móvel.

Para cálculo e comparação dos fatores de retenção, foram aplicados 10 µL, de cada solução: matéria-prima (levofloxacino hemi-hidrato) e solução oriunda da diluição de comprimidos de levofloxacino (amostra comercial). Ambas foram diluídas em metanol na concentração de 1,0 mg mL⁻¹ de fármaco. O cromatograma foi desenvolvido e, após a placa ter sido seca no ar à temperatura ambiente, foi examinada à luz ultravioleta em câmara escura.

Determinação da faixa de fusão

A faixa de fusão da matéria-prima foi determinada em triplicata pela técnica do tubo capilar, o qual foi inserido no equipamento com aumento gradativo de temperatura, até a observação do início e término da fusão. Os valores foram anotados e calculado a média.

Desenvolvimento e validação do método analítico

O método foi desenvolvido e validado segundo os parâmetros expressos na Resolução nº 166/2017 da ANVISA [25]. As análises estatísticas aplicadas para tratamento dos dados obtidos foram realizadas através do estudo por testes *t-Student* e *F*. Conforme ANOVA, foi aplicada com fator único com repetição.

Titulação ácido-base do branco

O branco foi constituído pelo placebo dos comprimidos, isto é, os mesmos excipientes empregados na fabricação do medicamento. Uma amostra simulada composta por excipientes misturados nas proporções usuais de preparo de formas farmacêuticas sólidas (FFS), foi triturada, homogeneizada e uma quantidade equivalente a 250 mg de pó foi pesada em balança analítica e transferida para um erlenmeyer de 250 mL. Então, adicionou-se 100 mL de etanol e a solução foi levada ao banho de ultrassom por 15 minutos. Logo após, procedeu-se a titulação com NaOH 0,1 M (FC: 1,012), empregando 3 gotas de fenolftaleína 1%. Este procedimento foi realizado em triplicata.

Titulação ácido-base do levofloxacino hemi-hidrato (SQC)

Linearidade

A linearidade foi demonstrada por meio da construção, em triplicata, da curva de calibração. Foram adicionados em erlenmeyer 62,5, 125, 250, 500 e 1000 mg de levofloxacino SQC, além de 100 mL de etanol e 3 gotas de fenolftaleína 1%. As soluções permaneceram no ultrassom por 15 minutos. Procedeu-se a titulação com NaOH 0,1 M (FC: 1,012), até o surgimento da coloração rosa permanente nas soluções. Os volumes de titulante gastos foram anotados e a partir desses dados obteve-se a equação da reta e o coeficiente de correlação (*r*).

Precisão

A precisão foi avaliada por meio da repetibilidade e da precisão intermediária.

Repetibilidade

Foi pesado, em erlenmeyer, quantidade de pó de comprimidos triturados equivalente a 250 mg de fármaco. Então, adicionou-se 100 mL de etanol e o erlenmeyer foi mantido em ultrassom durante 15 minutos. Após, foram adicionadas 3 gotas de fenolftaleína 1% e procedeu-se a titulação com NaOH 0,1 M (FC: 1,012) até surgimento da coloração rosa.

A análise foi realizada em sextuplicata e os volumes de titulante gastos foram anotados e calculados o teor empregando equação da reta. A partir dos resultados obtidos, foram calculados o desvio padrão (DP) e o desvio padrão relativo (DPR).

Precisão intermediária

O procedimento para a realização da precisão intermediária foi o mesmo descrito na repetibilidade. Entretanto, as sextuplicatas foram realizadas por dois analistas em dois dias diferentes. A partir dos resultados obtidos, foram calculados o DP e o DPR.

Exatidão

A exatidão foi avaliada por meio da adição e recuperação de quantidades conhecidas de levofloxacin hemi-hidrato (SQC) na amostra em três níveis de concentração. Foram separados 5 erlenmeyer de 250 mL. Nos quatro primeiros frascos foram adicionados apenas uma quantidade de pó da amostra comercial, triturada, equivalente a 62,5 mg de fármaco. Em seguida, nos frascos 2, 3 e 4 foram adicionadas quantidades crescentes de SQC, isto é, 62,5, 187,5 e 437,5 mg, respectivamente. Reservando o último frasco para adição somente do SQC (62,5 mg). Assim, a quantidade teórica resultante de fármaco nos frascos aditivados de padrão (2, 3 e 4) foram: 125, 250 e 500 mg, respectivamente. A Figura 2 representa o esquema de aditivção de padrão para recuperação através do método proposto.

Foi realizada a titulação de cada erlenmeyer e anotado o volume gasto. O teste foi realizado em triplicata e a porcentagem de recuperação foi calculada como indicado pela *Association of Official Analytical Chemists* [26].

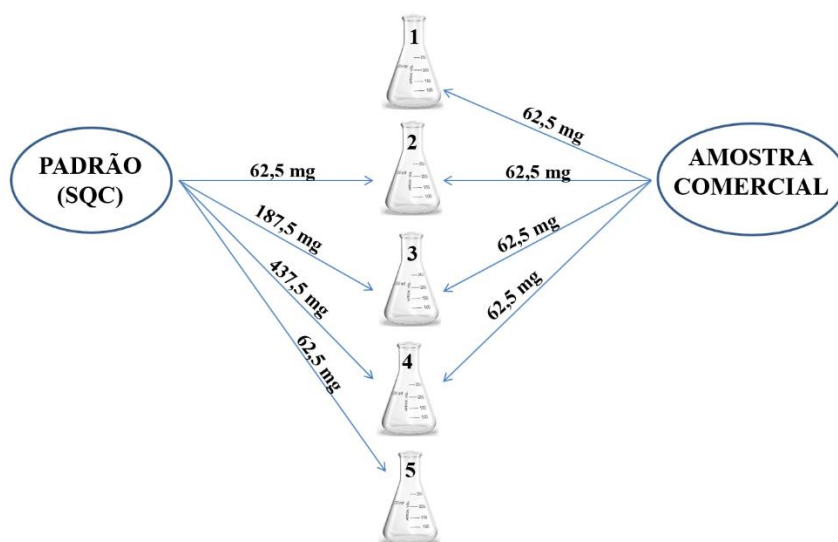


Figura 2: Esquema da adição de levofloxacin hemi-hidrato (SCQ) para demonstrar a exatidão do método através da porcentagem de recuperação do fármaco.

Robustez

A robustez foi avaliada por meio de pequenas modificações no método, como alteração do fabricante do hidróxido de sódio e do etanol. Soluções foram preparadas e tituladas na presença dos modificadores. Os volumes de titulante gastos foram observados e comparados com os volumes gastos nas condições normais.

Seletividade

A seletividade foi avaliada através do branco da amostra, ou seja, amostra simulada de excipientes com o intuito de verificar o quanto o placebo interferiria no doseamento do fármaco.

Limite de detecção e quantificação

O limite de detecção e quantificação do método foi determinado experimentalmente pela titulação de quantidades cada vez menores da levofloxacino SQC até não ocorrer o ponto de viragem (coloração rosa), visivelmente, nas soluções. O ensaio foi realizado em triplicata.

Doseamento da amostra comercial de levofloxacino hemi-hidrato por titulação

O doseamento foi realizado a partir de um *pool* de 20 comprimidos, os quais tiveram o peso médio determinado previamente. Foi pesado e transferido para um erlenmeyer, quantidade de pó de comprimidos triturados equivalente a 250 mg de fármaco. Então, adicionou-se 100 mL de etanol e o erlenmeyer foi levado ao banho de ultrassom por 15 minutos para auxiliar na solubilização. Logo após, foram adicionadas 3 gotas de fenolftaleína 1% e procedeu-se a titulação com NaOH 0,1 M (FC: 1,012) até surgimento da coloração rosa. A análise foi realizada em triplicata e o teor foi calculado empregando a equação da reta obtida no ensaio da linearidade.

Comparação dos métodos titulométrico e espectrofotométrico UV

O método titulométrico desenvolvido foi comparado ao método validado por Kassab e colaboradores (2010) [22]. Para isso, foi construída uma curva de calibração com a linearidade de 0,9995, empregando as mesmas condições analíticas do referido trabalho, porém, empregando outro espectrofotômetro. A amostra comercial foi preparada na concentração de $4,5 \mu\text{g mL}^{-1}$ em metanol e lida em 298 nm, a qual correspondeu concentração de maior linearidade da curva de calibração de levofloxacino pelo método espectrofotométrico. A análise foi realizada em triplicata e o teor foi calculado por meio da equação da reta obtida da curva de calibração do método espectrofotométrico. Os métodos titulométrico e espectrofotométrico foram comparados estatisticamente, conforme ANOVA, em relação ao teor obtido para o mesmo lote de comprimidos de levofloxacino hemi-hidrato.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Caracterização da matéria-prima – CCD e faixa de fusão

A Figura 3 ilustra o cromatograma obtido na CCD revelado à luz ultravioleta. As manchas 1 e 2 correspondentes à amostra comercial e a matéria-prima de levofloxacino, respectivamente, cujo R_f calculado foi 0,82. As manchas principais são de mesma coloração, formato e intensidade. Outras manchas secundárias que aparecem no cromatograma poderiam indicar presença de impurezas ou sobrecarga de material no ponto de injeção da placa.

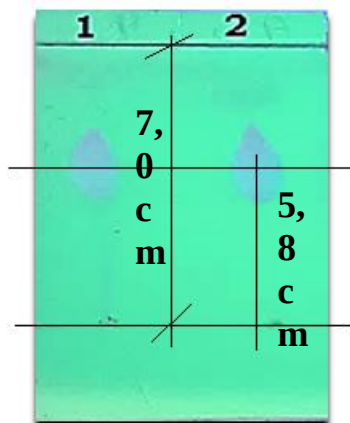


Figura 3: Cromatograma da amostra comercial (1) e o padrão secundário ou matéria-prima (2) de levofloxacino, desenvolvido com o eluente $\text{CHCl}_3:\text{MeOH}:\text{NH}_4\text{OH}:\text{MeCN}$ (4:4:2:1 v/v) em cromatofolha de sílica gel 60 F₂₅₄, revelada sob luz ultravioleta luz UV 254 nm.

A organização mundial da saúde propôs a inscrição do levofloxacino na Farmacopeia Internacional desde 2010 [6]. Entretanto, até a última edição da Farmacopeia Brasileira (2019) [14], esse fármaco não entrou no rol de substâncias inscritas. Porém, um dos métodos de identificação de ciprofloxacino (fluoroquinolona de segunda geração) em produtos acabados (comprimidos, solução oftálmica e injetável), no compêndio nacional, é a CCD empregando como sistema eluente mistura de cloreto de metileno, álcool metílico, hidróxido de amônio e acetonitrila (4:4:2:1 v/v/v/v). Como o levofloxacino é estruturalmente semelhante ao ciprofloxacino, a utilização dessa fase móvel foi empregada com êxito para a identificação da matéria-prima de levofloxacino, que devido à falta de um padrão farmacopeico (SQR) do fármaco, para comparar os Rfs, utilizou-se da extração do fármaco de uma amostra comercial e fez o comparativo da eleição, conforme ilustrou a Figura 2.

Como o intuito desse trabalho foi desenvolver um método mais simples para identificação e quantificação de levofloxacino em FFS, preferiu-se não empregar a espectrofotometria na região do infravermelho para a identificação ou caracterização da matéria-prima levofloxacino hemi-hidrato.

O ponto de fusão é uma propriedade física das substâncias que auxilia na identificação, na análise da pureza e estabilidade do fármaco, bem como para prever a solubilidade [27-28], verificar a presença transição cristalina e polimorfismo em fármacos [29]. A fusão do levofloxacino iniciou-se na temperatura de 217,5 °C e finalizou-se em 218,9 °C, valores estes expressos pela média das análises em triplicatas, o que é condizente com os achados na literatura [30-31-32].

Uma vez caracterizada a matéria-prima adquirida como levofloxacino hemi-hidrato, passou a usá-la como padrão de referência, daí o termo adotado SQC, que segundo a Farmacopeia Brasileira (2019) volume 1 [13] e a Resolução nº 166/2017 da ANVISA [25], esta é admitida quando na ausência de uma Substância Química Farmacopeia (SQF), desde que devidamente caracterizada. Assim, mediante o laudo de análises emitido pela distribuidora de insumos farmacêuticos e os testes mínimos realizados (aparência da amostra, CCD e faixa de fusão), a matéria-prima de lote DK21016095122, foi empregada como SQC para a validação do método proposto.

Desenvolvimento e validação do método analítico

Teoricamente, cada mL de NaOH 0,1 M gasto na titulação neutraliza 36,137 mg de levofloxacino hemi-hidrato (SQC), valor determinado na reação estequiométrica de proporção 1:1. Na titulação ácido-base de 250 mg de levofloxacino SQR foi consumido 7,5 mL do titulante, sendo que o esperado seria 6,9 mL. Entretanto, ao realizar a titulação do branco, verificou-se que o volume gasto foi de 0,6 mL do titulante. Dessa forma, o volume real obtido em cada titulação da SQC para a curva de calibração, bem como para a amostra comercial analisadas, tiveram seus valores descontados do branco titulado.

O pH da solução antes da titulação foi determinado em 7,7 e no ponto de viragem, em torno de 10, como era esperado segundo a faixa de transição do indicador fenolftaleína (8,3 -10,0). A verificação do pH inicial e final da titulação foi realizada para atestar que ao atingir o ponto de viragem e todas as moléculas do fármaco presente em solução estariam na forma ionizada. Isso foi comprovado, pois em pH acima de 10, praticamente 100 % das moléculas de levofloxacino perdem o hidrogênio do grupo ácido carboxílico [5] e, portanto, participam da reação ácido-base, quando em meio não aquoso.

Sem dúvida a titulação em meio não aquoso representa uma excelente alternativa à titulação aquosa. Ácidos fracos podem ser facilmente titulados, com precisão e dão ponto final exatos. A habilidade das substâncias em agir como ácidos ou bases depende do solvente, uma vez que no meio não aquoso o efeito nivelador dos íons da água não está presente [13], logo ácidos fracos como levofloxacino hemi-hidrato podem ser titulados por base forte como NaOH, em meio não aquoso, uma vez que o fármaco em análise é também é possível solubilizá-lo em alguns solventes orgânicos como metanol e etanol.

A validação analítica possui como objetivo demonstrar que o método é apropriado para a finalidade pretendida e, para isso, precisa cumprir os ensaios de linearidade, precisão, exatidão, seletividade e robustez [25].

No desenvolvimento do método, a interferência dos excipientes foi anulada pela titulação do branco, o que garantiu a confiabilidade do método.

Linearidade

O etanol foi escolhido como solvente devido pela baixa toxicidade, comparado ao metanol, e por ser empregado em outros métodos titulométricos não aquosos para quantificação de fármacos, como exemplo têm-se o método descrito na Farmacopeia Brasileira para o doseamento de ibuprofeno comprimidos (fármaco ácido fraco pKa 4,85) [14].

A curva de calibração do levofloxacino (Figura 4) apresentou coeficiente de determinação (r) igual a 0,9997, atestando a linearidade no intervalo de 62,5 a 1000 mg de fármaco. A equação obtida no gráfico foi $y = 0,0287x + 0,3264$. As respostas analíticas obtidas nas curvas de calibração foram diretamente proporcionais à concentração do analito, fato comprovado pelo coeficiente de determinação maior que 0,99, por isso o método desenvolvido foi considerado linear [25].

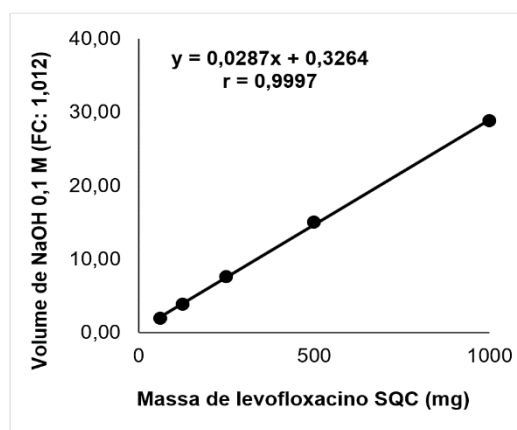


Figura 4. Curva de calibração do levofloxacino hemi-hidrato (SQC), obtida pela titulação com NaOH 0,1 M (FC: 1,012)

Precisão

Para expressar a precisão, foi calculado o desvio padrão relativo de cada conjunto de determinações e em ambos os ensaios (repetibilidade e precisão intermediária) os DPR foram inferiores a 2,0 %, o qual é o valor recomendado pelos compêndios de validação, comprovando a precisão do método [25, 33]. Os resultados da repetibilidade e da precisão intermediária estão apresentados na Tabela 1.

Exatidão

A exatidão de um método analítico é determinada quando os resultados obtidos experimentalmente são muito próximos dos valores teóricos [34]. A quantidade de massa adicionada, bem como a quantidade teórica resultante nos frascos aditivados foram idealizadas de modo que a quantidade final de fármaco estivesse contemplada na linearidade da curva. É recomendável a porcentagem média de recuperação esteja entre 98 e 102% [26], o que foi alcançado pelo método desenvolvido nesse trabalho, os resultados obtidos no ensaio de exatidão estão ilustrados na Tabela 2.

Robustez

O método mostrou-se robusto, pois, de acordo com os resultados obtidos, não apresentou diferença significativa nos volumes de NaOH 0,1 M (FC:1,012) gastos nas condições normais e alteradas para a quantificação do fármaco. As pequenas modificações efetuadas no método não produziram efeitos significativos nas análises, confirmando a robustez do método proposto.

Tabela 1: Resultados obtidos na precisão do método proposto.

Repetibilidade		Precisão intermediária			
Nº Amostras	Massa consumida (mg)	Massa consumida (mg)		Massa consumida (mg)	
		1º dia		2º dia	
		A ₁ *	A ₂ *	A ₁ *	A ₂ *
1	253,44	253,44	253,44	260,40	253,44
2	249,95	256,92	256,92	256,92	249,95
3	253,44	256,92	253,44	253,44	260,40
4	249,95	253,44	253,44	253,44	256,92
5	253,44	253,44	253,44	260,40	249,95
6	253,44	253,44	256,92	256,92	253,44
Média	252,27	254,60	254,60	256,92	254,02
DP	1,91	1,90	1,55	3,4	4,5
DPR (%)	0,68	0,68	0,68	1,56	1,53
Teor (%)	100,91	101,84	101,84	102,77	101,61

Média Geral do teor encontrado: 101,79%

*A₁ e A₂: Analista diferentes

Tabela 2: Resultados obtidos na exatidão do método.

Massa adicionada (mg)	Massa encontrada (mg)	Recuperação (%)	Recuperação média ± DPR (%)
62,5	62,72	100,35	
187,5	188,15	100,30	99,78
437,5	432,06	98,70	

Seletividade

A seletividade foi demonstrada com o ensaio da amostra simulada de excipientes, os quais não interferiram no método, sob o ponto de vista de dificultar a visualização final, pois não alteraram a cor da solução. A opacidade no fundo do frasco se deveu a não solubilidade deles no etanol. O consumo de base ainda que em pequena quantidade (média de 0,6 mL) pode ser atribuído a presenças de impurezas inorgânicas oriundas da síntese, extração ou purificação de cada matéria-prima (excipiente), por isso a Farmacopeia Brasileira recomenda realizar o teste de acidez para a determinação de pureza e, dependendo da substância a ser avaliada, o consumo de NaOH 0,1 M (SV) pode variar de 0,1 a 0,3 mL.

[14]. Assim, acredita-se que o volume de titulante gasto na titulação do placebo seja resultado da soma de impurezas ácidas presentes.

Limite de quantificação e detecção

A menor massa de levofloxacinó capaz de promover o ponto de viragem do método foi 2,77 mg com o volume gasto de 7,5 mL. Por se tratar de método clássico, o resultado encontrado é condizente e aceitável. Um trabalho desenvolvido e validado por Marona e colaboradores (2003) para doseamento de gatifloxacino comprimidos, em meio não aquoso, esse parâmetro não foi determinado [35]

Doseamento da amostra comercial e comparação dos métodos titulométrico e espectrofotométrico

O resultado dos teores obtidos no método proposto e no método espectrofotométrico desenvolvido por Kassab e colaboradores (2010) [22], foram apresentados na Tabela 3. A curva de calibração construída empregando o método espectrofotométrico apresentou um coeficiente de determinação de 0,9995 e a equação da reta obtida foi $y = 0,1018x + 0,0626$. A estatística foi realizada utilizando-se a ANOVA nos teores obtidos pelos métodos UV e titulométrico. No nível de confiança de 95% e não foi encontrado diferença significativa entre os métodos.

Além de ser linear, preciso, exato e robusto, o método desenvolvido mostrou-se capaz de quantificar o fármaco em uma ampla faixa de massas, com limites inferior e superior de quantificação de 2,77 e 1000 mg, respectivamente. Enquanto os métodos encontrados na literatura que empregaram titulação, espectroscopia e CLAE para quantificar quinolonas apresentaram intervalo linear estreito [18-24-36-37-38].

A capacidade de quantificar o fármaco em quantidades maiores diminui a necessidade de diluições, contribuindo para a economia de solvente e, por consequência diminui a geração de resíduos. Outra vantagem é que o método desenvolvido pode ser aplicado no teste de uniformidade de conteúdo sem a necessidade de diluições da amostra, uma vez que o comprimido contém 500 mg de levofloxacinó, podendo ser quantificado em uma única etapa.

Ao comparar estatisticamente o método titulométrico desenvolvido com o método espectrofotométrico na determinação do teor de comprimidos contendo levofloxacinó, não foi encontrada diferença significativa, o que comprova a eficiência do método proposto.

Tabela 3: Comparação dos teores de levofloxacinó hemi-hidrato obtidos por diferentes métodos.

Fármaco	Espectrofotometria UV	Titulação NaOH (FC: 1,012)
Levofloxacinó hemi-hidrato (SQC)	98,75%	101,79%

Como mencionado anteriormente, o levofloxacinó hemi-hidrato não está inscrito na Farmacopeia Brasileira (2019) [14]. Todavia, ciprofloxacino, gemifloxacino e ofloxacino, na forma farmacêutica de comprimidos, possuem monografias no compêndio nacional [14]. Por se tratar de substâncias seguras, isto é, não apresentam baixo índice terapêutico, geralmente os compêndios oficiais recomendam que o teor real destes em FFS sejam maiores ou iguais a 90% e menores ou iguais 110% do teor declarado ou rotulado. Sendo assim, o levofloxacinó hemi-hidrato por se tratar de uma fluoroquinolona à semelhança das citadas acima, adotou-se neste trabalho, os mesmos percentuais. Assim, os comprimidos analisados através do método desenvolvido e validade apresentou teor de fármaco dentro dos limites preconizados, como ilustrado na Tabela 3.

Considerações Finais

O método de titulação ácido-base validado para a quantificação de levofloxacinó hemi-hidrato em comprimidos mostrou-se linear, preciso, robusto, sensível e econômico.

Portanto, assim como o método espectrofotométrico, o método titulométrico pode ser empregado nas análises de rotina dos laboratórios de controle de qualidade para matéria-prima, sendo que o baixo custo da titulação, a fácil reprodutibilidade e a geração de pouco resíduos são as principais vantagens em relação aos métodos instrumentais.

AGRADECIMENTOS

Agradecemos a Fundação de Apoio ao Desenvolvimento do Ensino, Ciência e Tecnologia (FUNDECT) do Estado de Mato Grosso do Sul, que financiou o projeto do Edital Universal nº 08/2020 (PPSUS), o apoio financeiro do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) que concedeu bolsa de mestrado através do Programa de pós-graduação em ciências Farmacêuticas da UFMS.

REFERÊNCIAS

- [1] Martins, S.; Cristiano, M. L. S. Quinolonas em Química Medicinal. Dissertação apresentada para Doutorado, Universidade do Algarve, Faculdade de Ciências e Tecnologia, 2014.
- [2] Pham, Thu.; Ziora, Z.; Blaskovich, M. Quinolone Antibiotics. *MedChemComm.*, p. 1-56, 2019.
- [3] Podder, V.; Sadiq N. M. Levofloxacin. In: *StatPearls*. StatPearls Publishing, Treasure Island (FL), 2020.
- [4] Bano, R.; Aralan, A.; Ahmad, I.; Shad, Z. Levofloxacin: a potent antibiotic introduction. *Journal of Baqai Medical University*, v. 14, p. 1-20, 2011.
- [5] Chemicalize. Disponível em: <<https://chemicalize.com/app/search/levofloxacin>>. Acesso em: 14/06/2021.
- [6] WHO. World Health Organization. The International Pharmacopeia. Disponível em: <https://www.who.int/medicines/services/expertcommittees/pharmprep/Levofloxacin_QAS10-360Rev1_6102010.pdf>. Acesso em: 10/05/2021.
- [7] Dabhi, B.; Parmar, B.; Patel, N.; Jadeja, Y.; Patel, M.; Jebaliya, H.; Karia, D.; Shah, A. K.A Stability Indicating UPLC Method for the Determination of Levofloxacin Hemihydrate in Pharmaceutical Dosage Form: Application to Pharmaceutical Analysis. *Chromatography Research International*, v. 2013, p. 1-5, 2013.
- [8] Zhang, J.; Yang, X.; Han, Y.; Li, W.; Wang, J. Measurement and correlation for solubility of levofloxacin in six solvents at temperatures from 288.15 to 328.15K. *Fluid Phase Equilibria*, v. 335, p. 1-7, 2012.
- [9] Cayman Chemical. Disponível em: <<https://www.caymanchem.com/product/20382/levofloxacin>>. Acesso em: 06/04/2021.
- [10] Brar, R. K.; Jyoti, U.; Patil, R. K.; Patil, H. C. Fluoroquinolone antibiotics: An overview. *Adesh Univ J Med Sci Res*, v. 2, n. 1, p. 26-30, 2020.

- [11] El-Malah, A.; Youssef, A.; Ismail, M.; Kamel, M.; Mahmoud, Z. New promising levofloxacin derivatives: Design, synthesis, cytotoxic activity screening, Topo2 β polymerase inhibition assay, cell cycle apoptosis profile analysis. *Bioorg Chem.*, v. 113, 2021.
- [12] Takamune, L. F.; Vieira, D. C. M. Comparação da metodologia para determinação da potência de amoxicilina: método de difusão em ágar e método de espalhamento / Comparison of methods for determining the power of amoxicillin: agar diffusion assay and method of spreading. *Rev. ciênc. farm. básica apl.*, v. 34, n. 4, 2013.
- [13] Anvisa. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. *Farmacopeia Brasileira*, volume 1. 6ª ed. Brasília, 2019.
- [14] Anvisa. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. *Farmacopeia Brasileira*, volume 2. 6ª ed. Brasília, 2019.
- [15] Terra, J. R.; Vitorino, A. Sobre o desenvolvimento da análise volumétrica e algumas aplicações atuais. *Química Nova [online]*, v. 28, n. 1, p. 166-171.
- [16] Gomes, S. I. A. A.; Matias, T. B.; Giusti, E. D.; Santos, V. M. S. *Volumetria de Neutralização - Abordagens Teórico-Experimentais*. São Carlos: Pedro & João Editores, 2018. 163p.
- [17] Siewert, S. Validation of a levofloxacin HPLC assay in plasma and dialysate for pharmacokinetic studies. *J Pharm Biomed Anal*, v. 41, n. 4, p. 1360-1362, 2006.
- [18] Hurtado, F. K.; Nogueira, D. R.; Bortolini, F.; Silva, L. M.; Zimmermann, E.; Jost e Souza, M.; Melo, J.; Rolim, C. M. B. Determination of Levofloxacin in a Pharmaceutical Injectable Formulation by Using HPLC and UV Spectrophotometric Methods, *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*, v. 30, n. 13, p. 1981-1989, 2007.
- [19] Gao, X. X.; Yao, G. C.; Guo, N.; An, F.; Guo, X. J. A simple and rapid high performance liquid chromatography method to determine levofloxacin in human plasma and its use in a bioequivalence study. *Drug Discov Ther*, v. 1, n. 2, p. 136-140, 2007.
- [20] Czyrski, A.; Szalek, E. An HPLC method for levofloxacin determination and its application in biomedical analysis. *J Anal Chem*, v. 71, p. 840-843, 2016.
- [21] Toker, S. E.; Kızılcay, G. E.; Sagirli, O. Determination of levofloxacin by HPLC with fluorescence detection in human breast milk. *Bioanalysis*, v. 13, n. 13, p. 1063-1070, 2021.
- [22] Kassab, N. M.; Amaral, M. S.; Singh, A. K.; Santoro, M. I. R. M. Development and validation of UV spectrophotometric method for determination of levofloxacin in pharmaceutical dosage forms. *Química Nova*, v. 33, n. 4, p. 968-971, 2010.
- [23] Desai, V.; Afieroho, O.; Dagunduro, B.; Okonkwo, T.; Ndu, C. A Simple UV Spectrophotometric Method for the Determination of Levofloxacin in Dosage Formulations. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*, v. 10, n. 1, p. 75-79, 2011.
- [24] Maleque, M.; Hasan, Md. R.; Hossen, F.; Safi, S. Development and validation of a simple UV spectrophotometric method for the determination of levofloxacin both in bulk and marketed dosage formulations. *Journal of Pharmaceutical Analysis*, v. 2, n. 6, p. 454-457, 2012.
- [25] Brasil. Resolução da Diretoria Colegiada nº 166, de 24 de julho de 2007. Dispõe sobre a validação de métodos analíticos e dá outras providências. *Diário Oficial da União*: nº 141, 25 jun. 2017.

- [26] AOAC. Association of Official Analytical Chemists. Official Methods of Analysis, 20^a ed. Washington, DC, 2016.
- [27] Tetko, I.; Sushko, Y.; Novotarskyi, S.; Patiny, L.; Kondratov, I.; Petrenko, A.; Charochkina, L.; Asiri, A. M. How Accurately Can We Predict the Melting Points of Drug-like Compounds?. Journal of chemical information and modeling, v. 54, n. 12, p. 3320–3329, 2014.
- [28] Mao, F.; Kong, Q.; Ni, W.; Xu, X.; Ling, D.; Lu, Z.; Li, J. Melting Point Distribution Analysis of Globally Approved and Discontinued Drugs: A Research for Improving the Chance of Success of Drug Design and Discovery. ChemistryOpen, v.5, n. 4, p. 357-368, 2016.
- [29] Oliveira, M. A.; Yoshida, M. I.; Lima Gomes, E. C. Análise térmica aplicada a fármacos e formulações farmacêuticas na indústria farmacêutica. Química Nova [online]. v. 34, n. 7, p. 1224-1230, 2011.
- [30] Pharmaceuticals. Safety Data Sheet - Levofloxacin tablets, film-coated SDS. Disponível em: <<https://www.sasrx.com/media/wysiwyg/attachments/028970.pdf>>. Acesso em: 08/05/2021.
- [31] Toronto Research Chemicals. Levofloxacin Hemihydrate. Disponível em: <<https://www.trc-canada.com>>. Acesso em: 08/05/2021.
- [31] Chemical Book. Levofloxacin heMihydrate. Disponível em: <https://www.chemicalbook.com/ChemicalProductProperty_EN_CB1122905.htm>. Acesso em: 08/05/2021.
- [32] ICH. International Conference on Harmonization. Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology Q2 (R1). Geneva: IFPMA, 2005.
- [33] Giudice, G. H. Parâmetros de uma validação analítica: uma revisão bibliográfica. Acta de Ciências e Saúde, v. 1, n. 5, p. 130-134, 2016.
- [34] Vinay, K. B.; Revanasiddappa, H. D.; Devi, O. Z.; Ramesh, P. J.; Basavaiah, K. Rapid titrimetric and spectrophotometric determination of ofloxacin in pharmaceuticals using N-bromosuccinimide. Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences [online], v. 47, n. 2, 2011.
- [35] Marona, H. R. N.; Lopes, C. C. G. O.; Cardoso, S. G. Non-aqueous Titration of Gatifloxacin in Pharmaceutical Formulations using Perchloric Acid. Lat. Am. J. Pharm, v.22, n. 4, p. 339-42, 2003.
- [36] Szerkus, O.; Jacyna, J.; Gibas, A.; Sieczkowski, M.; Siluk, D.; Matuszewski, M.; Kaliszan, R.; Markuszewski, M. J. Robust HPLC–MS/MS method for levofloxacin and ciprofloxacin determination in human prostate tissue, Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, v. 132, p. 173-183, 2017.
- [37] Ashour, S.; Al-Khalil, R. Simple extractive colorimetric determination of levofloxacin by acid-dye complexation methods in pharmaceutical preparations. Farmaco, v. 60, n.9, p.771-775, 2005.
- [38] Marona, H. R. N.; Lopes, C. C. G. O.; Cardoso, S. G. Non-aqueous Titration of Gatifloxacin in Pharmaceutical Formulations using Perchloric Acid. Lat. Am. J. Pharm, v.22, n. 4, p. 339-42, 2003.