

DETERMINAÇÃO QUANTITATIVA DE CLORIDRATO DE MOXIFLOXACINO EM COMPRIMIDOS POR ESPECTROFOTOMETRIDA NA REGIÃO DO ULTRAVIOLETA

Pedro Luis Guizzo^{1,2}, Márcia Regina Moreira², Maria Ines Rocha Miritello Santoro¹, Andréia Alves de Lima², Tânia Cristina Massaro²

¹ Departamento de Farmácia, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brasil.

² Discentes do curso de Química Industrial do Centro Universitário Amparense, UNIFIA.

³ Docentes do curso de Química Industrial do Centro Universitário Amparense, UNIFIA.

RESUMO

Uma metodologia simples, rápida e reprodutível por espectrofotometria na região do ultravioleta (UV) foi desenvolvida e validada para quantificação de cloridrato de moxifloxacino em comprimidos, um antimicrobiano pertencente a quarta família das fluoroquinolonas utilizado na terapêutica contra bactérias gram-negativas, anaeróbias, mas principalmente contra bactérias gram-positivas do trato respiratório. O método provou ser efetivo, fácil aplicabilidade, baixo custo, uma vez que utilizou água destilada como solvente, além de não gerar resíduos tóxicos para o analista e para o meio ambiente e colaborando com a rotina analítica de um laboratório de controle de qualidade, garantindo eficácia terapêutica do fármaco comercializado. O método proposto foi capaz de quantificar o fármaco em sua forma farmacêutica sendo capaz de detectar e quantificar satisfatoriamente seguindo os critérios de especificidade, precisão de 101,6%, exatidão de 99,75%, baixo níveis de robustez na faixa linear de 2,0 a 8,0 µg/mL, mostrando coeficiente de correlação de 0.9999 quando analisado no comprimento de onda de $\lambda=294$ nm em espectrofotômetro.

Palavras-chave: cloridrato de moxifloxacino, validação de métodos analíticos, antimicrobianos, espectrofotometria na região do ultravioleta.

ABSTRACT

A simple, fast and reproducible methodology was development and valited by UV Spectrophotometric to quantification of moxifloxacin hydrochloride (HMOX) tablets, a antimicrobial belonging a fourth family of fluoroquinolones, used in the therapeutical against Gram-negatives bacterias, anaerobium, but mainly Gram-positive bacterias of respiratory tract. The method proved to be effective, easy applicability, low cost, once used distilled water as solvent, besides it does not generate toxic wastes to the analyst and to environment and corroborating with the routine analysis of quality control to ensure the therapeutic efficacy of the drug marketed. The method presented being capable to quantify the drug obtaining satisfactory results regarding specificity, precision with 102,8%, accuracy of 99,75%, lows levels of robustness at the linear range of 2,0 to 8,0 µg/mL, showing correlation coefficient of 0.9995 when analyzed in the wavelength $\lambda=294$ nm spectrophotometer.

Keywords: moxifloxacin hydrochloride, validation of analytical methods, antimicrobians, Spectrophotometric in ultraviolet region.

DESENVOLVIMENTO E DO TEXTO

Introdução e justificativa

Os antimicrobianos correspondem a uma classe de fármacos que é consumida frequentemente em hospitais e na comunidade, e junto com os quimioterápicos beta-lactâmicos as fluoroquinolonas (FQs) são os antibióticos mais prescritos e de maior utilização na terapêutica (CALVO & MARITNEZ-MARTINEZ, 2009).

Em dezembro de 1999, a *Food and Drug Administration* (FDA) sob registro 021085, aprovou o uso do Avelox®, com princípio ativo moxifloxacino (MOX) em sua forma de sal [cloridrato de moxifloxacino (HMOX)] fabricado pela Bayer® Indústria Farmacêutica nos Estados Unidos sob a forma comprimidos de 400 mg (FDA, 2018). Na Alemanha, o Avelox® também foi liberado para comercialização em 1999 (BALL, 2000). No Brasil, o Avalox® comprimidos foi liberado em abril de 2000 pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). O genérico do MOX é comercializado pela EMS Sigma Pharma® (BRASIL, 2018).

O cloridrato de moxifloxacino (HMOX) (Figura 1) com nome de ácido 1-ciclopropil-6-fluoro-1,4-dihidro-8-metoxil-7-[(4aS,7aS)-octahidro-1H-pirrol[3,4-b]piridina-6yl]-4-oxo-3-carboxílico foi desenvolvido exclusivamente para o tratamento em humanos (O'NEIL, 2013; DRUG BANK, 2015). Este fármaco apresenta fórmula molecular $C_{21}H_{24}FN_3O_4.HCl$. O HMOX inibe o crescimento bacteriano indiretamente quando se ligam a subunidade A da DNA-girase (topoisomerase II) em bactérias gram-negativas e a Topoisomerase IV em bactérias gram-positivas. Essa enzima que produz o ácido desoxirribonuclêico (DNA) é responsável pela sobrevivência bacteriana. O fármaco é seletivo para essa enzima bacteriana. Ao inibir essa enzima, a molécula de DNA passa a ocupar grande espaço no interior da bactéria e suas extremidades livres determinam síntese descontrolada de RNA-mensageiro e de proteínas, determinando a morte das bactérias (RANG et al., 2007; LEYVA & LEYVA, 2008; BRASIL, 2018).

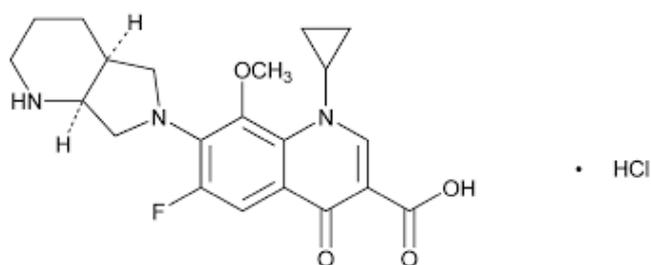


Figura 1: Estrutura química do HMOX (CAS 186826-86-6)

Fonte: O NEIL, 2013; USP 42, 2018

O MOX é considerado um dos quinolonas do trato respiratório, por ser usado principalmente contra *Streptococcus pneumoniae* e anaeróbios. Este fármaco também é considerado mais potente que os fármacos da terceira geração das FQs, uma vez que são usados contra bactérias Gram-negativas, como *Pseudomonas aeruginosa* (BALL, 2000; ZHANEL & NOREDDIN, 2001; ANDRIOLE, 1999; CALVO & MARTINEZ et al., 2009; GOODMAN & GILMAN, 2012). É um dos fármacos indicados para doenças contra microbactérias. É, portanto, um dos fármacos de primeira escolha para o tratamento da tuberculose. São ainda empregadas contra bactérias Gram-Negativas do trato respiratório, bactérias anaeróbias e *Streptococcus pneumoniae* (O'NEIL, 2013). O MOX apresenta também, eficácia comprovada contra sinusite bacteriana aguda, bronquite crônica e infecções da pele (ANDRIOLE, 2005; TOMIOKA et al., 2002; ANDRIOLE, 2005; SOUSA et al., 2012; U.S. FDA, 2018).

De acordo com a resolução denominal coligativa (RDC) nº17, de abril de 2010, o Controle de Qualidade (CQ) pode ser definido como o conjunto de ensaios qualitativos e quantitativos realizados com o objetivo de avaliar as matérias primas (fármaco recém-chegado a indústria farmacêutica ou laboratório de análise), produtos intermediários, produtos acabados (o medicamento propriamente dito depois de todo o processo de produção e fabricação), materiais de embalagem e verificar se apresentam conformidade com as especificações estabelecidas, detectando seus defeitos, desvios e erros e conseqüentemente sua eficácia até o término do prazo de validade (WATSON, 2005; LA ROCA et al., 2007; BRASIL, 2010).

O CQ também atua no desenvolvimento e validação de métodos analíticos, nos estudos de estabilidade de formulações, na análise de produtos de degradação e na padronização de procedimentos de produção (SWARTZ & KRULL, 1998).

O desenvolvimento de métodos analíticos deve permitir uma análise completa do produto farmacêutico, como a identificação e a determinação do teor de substância ativa, a identificação e determinação dos níveis de impureza e produtos de degradação, e a verificação da estabilidade da substância ativa na formulação (SWARTZ & KRULL, 1997).

São vários motivos para o desenvolvimento e/ou modificação de métodos analíticos: método não normalizado; método desenvolvido no laboratório para atender uma aplicação específica; modificações dos métodos normalizados; no caso de métodos analíticos não descritos em farmacopeias ou formulários oficiais (BRASIL, 2002; BRASIL, 2003).

Após o processo de desenvolvimento, a validação consiste um processo no controle de qualidade. O objetivo da validação é assegurar a reprodutibilidade dos resultados e o estabelecimento de limites de aceitação, exigindo a adoção de procedimentos de validação que conferem a confiabilidade necessária para a aplicação das técnicas de quantificação (TRAISNEL et al., 1995).

Vários órgãos governamentais, como a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) e compêndios oficiais como a Farmacopeia Americana [*United States Pharmacopeia* (USP)], Farmacopeia Britânica [*British Pharmacopoeia* (BP)], Farmacopeia Europeia [*European Pharmacopoeia* (EP)] e a Farmacopeia Japonesa [*Japanese Phamacopoeia* (JP)] possuem guias para a validação de fármacos e medicamentos. Todos esses guias recomendam que parâmetros como seletividade, linearidade, precisão e exatidão devem ser avaliados. No Brasil, o guia utilizado é a Resolução da diretoria colegiada (RDC) nº 166 de 24 de julho de 2017, publicada pela ANVISA (BRASIL, 2017). Já em países como Estados Unidos, continente europeu e Japão adotam as normas da *International Conference on Harmonization* (ICH) como guia oficial para validação de métodos analíticos (ICH, 2005).

Na Farmacopeia Brasileira (FB 5, 2010), Farmacopeia Japonesa (JP 17, 2017) e na Farmacopeia Portuguesa (FP 9, 2009) não foram encontradas metodologias analíticas para a determinação de HMOX matéria-prima e nem para a forma farmacêutica de comprimidos (HMOX). Na Farmacopeia Britânica (BP 7, 2014), Farmacopeia Europeia (EP 8, 2014) consta somente metodologias para a matéria do HMOX. Já a Farmacopeia Americana (USP 43, 2019) há monografia para quantificação em comprimidos, porém essa análise é feita por Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) e isso demanda um equipamento não encontrado em todos os laboratórios de análise e essa análise demanda tempo e custo elevado. Pelas razões expostas, são ainda necessários estudos de novas metodologias para a análise deste fármaco em medicamentos.

Embora algumas metodologias já foram encontradas por UV para quantificação de HMOX em comprimidos e outras formas farmacêuticas (SALEM et al., 2006; MOTWANI et al., 2007; SAHU et al., 2010; MISRA et al., 2010; DHUMAL et al., 2011; ATTIMARAD et al., 2012; VYAS et al., 2012; PATEL et al., 2012; TARKASE et al., 2012; PATEL et al., 2012; PARMAR et al., 2012), o projeto proposto consiste em uma nova metodologia com menos perda de tempo e reagentes, contribuindo para a segurança do analista e preservação ambiental, uma vez que gerará menos resíduos para o meio ambiente

e garantir limites de detecção e quantificação pequenos, resultando em alta sensibilidade e reprodutibilidade do método.

Desta maneira, a pesquisa proposta torna-se justificável, pois para aprimorar-se o controle de qualidade de formulações farmacêuticas, deve-se estudar o desenvolvimento e a validação de novas metodologias implicadas na quantificação de fármacos em medicamentos (SANTORO, 1988).

Este projeto tem como objetivo o desenvolvimento e a validação de novas metodologias analíticas para a determinação do HMOX em medicamentos, empregando a espectrofotometria na região do ultravioleta, uma vez que se trata de uma das técnicas analíticas mais confiáveis em relação a custo/benefício e com resultados satisfatoriamente

Materiais e metodologia

A substância química de referência utilizada como padrão farmacêutico secundário neste trabalho foi o cloridrato de moxifloxacino (HMOX-SQR) adquirida na Sequoia Research Company® – Oxford, Inglaterra, sob o lote de SEQ-0998 com validade em junho de 2018 e com teor declarado de 99,8% de HMOX.

Materiais de laboratório como: balão volumétrico de 5,0 mL, 10,0 mL, 100,0 mL; Béquer; Pipeta Pauster; balança analítica BEL Equipamentos Analíticos Mark 210A.

Os comprimidos de Cloridrato de Moxifloxacino®, produzido pela EMS Sigma Phamra® Indústria Farmacêutica, com 436,6 mg de cloridrato de moxifloxacino (400,0 g de moxifloxacino) foram adquiridos em comércio local sob prescrição médica e identificado pelo lote número 860139 com fabricação em 06/2016 e data de validade em 06/2018.

Espectrofotômetro com software UV-VIS *Spectrophotometer* e cuba de quartzo de 10,0 mm.

Desenvolvimento da metodologia

Preparo das soluções e melhor comprimento de onda para o fármaco.

Foram pesados 20,0 mg de HMOX-SQR e transferidos para balão volumétrico de 100,0 mL e o volume foi completado com água. O material foi agitado manualmente e após esse período completado o volume com água até o menisco, obtendo-se uma concentração final de 200,0 µg/mL (**solução estoque**). Após esse processo uma alíquota de 1,0 mL foi transferida para balão volumétrico de 10,0 mL a fim de se obter um espectro da amostra e verificar o melhor comprimento de onda para a amostra na concentração de 20,0 µg/mL.

As leituras de absorvâncias foram efetuadas realizando uma varredura no comprimento de onda de 200-500 nm, utilizando o solvente puro, no caso a água destilada, como branco para zerar o equipamento.

Preparo da solução de HMOX-Comprimidos

No preparo da solução de HMOX comprimidos partiu-se do peso médio de 7 comprimidos de HMOX e após trituração dos mesmos, pesou-se o equivalente a 86,27 mg em balança analítica, no qual foi transferido a balão volumétrico com capacidade de 250,0mL. A solução foi agitada manualmente por cerca de 5 minutos para garantir total dissolução e finalmente completando-se o volume com água, obtendo-se solução de HMOX comprimidos de concentração final 200,00 µg/mL. Posteriormente, a solução foi filtrada em papel de filtro.

Determinação da faixa linear (Curva de Ringbom)

A faixa de linearidade do método foi determinada pela curva de Ringbom. A partir da solução de trabalho de HMOX-SQR, foram preparadas soluções com auxílio de micropipeta, em balões volumétricos de 5,0 mL, com concentrações de 1,0 a 15,0 µg/mL.

Validação da metodologia analítica

A validação do método foi elaborada de acordo com o procedimento preconizado pela literatura (ICH, 2005; FB 5, 2010; INMETRO, 2011; USP 39, 2016). Os parâmetros avaliados foram: especificidade, linearidade, precisão (repetibilidade e precisão intermediária), exatidão, limite de detecção, limite de quantificação e robustez.

Linearidade

Para a preparação da curva analítica foi utilizada a preparada solução estoque de 200,0 ug/mL de HMOX-SQR. A partir dessa solução, foram transferidas alíquotas de 50,0; 75,0; 100,0; 125,0; 150,0; 175,0 e 250,0 uL para balões volumétricos de 5,0 mL, e o volume completado com água destilada, obtendo-se soluções com concentrações finais de 2,0; 3,0; 4,0; 5,0; 6,0; 7,0 e 8,0 µg/mL. As curvas analíticas foram preparadas e analisadas durante três dias. A equação da reta foi determinada através do estudo de regressão linear, pelo método dos mínimos quadrados e calculada a análise de variância (ANOVA), para análise de parâmetros estatísticos. Também foi avaliado o coeficiente de correlação.

Especificidade

A especificidade do método proposto foi avaliada pela comparação da resposta obtida com as soluções de SQR-HMOX e HMOX-comprimidos.

Precisão

Foi avaliada por meio da repetibilidade (precisão inter-dia) e precisão intermediária (intra-dia). O desvio padrão relativo (DPR%) foi utilizado para determinar a precisão do método.

Repetibilidade: Para o ensaio de repetibilidade, dez réplicas da solução de HMOX-SQR com concentração de 5,0 µg/mL foram preparadas e analisadas no mesmo dia, sob as mesmas condições experimentais, mesmo analista e no mesmo laboratório.

Precisão intermediária: Avaliou-se a precisão intermediária pela análise soluções de HMOX comprimidos, na concentração de 5,0 ug/mL, executadas por diferentes analistas em diferentes dias. As análises foram realizadas em triplicata.

Interdias: Prepararam-se, diariamente, duas amostras na mesma concentração de 5,0 ug/mL de HMOX comprimidos e analisaram-se três réplicas em três dias consecutivos, sob as mesmas condições experimentais.

Entre-analistas: Dois analistas preparam duas amostras distintas na concentração de 5,0 ug/mL e analisadas em triplicatas, sob as mesmas condições experimentais.

Após os procedimentos experimentais, foram calculados o teor e o valor percentual de HMOX nos comprimidos

Cálculo do teor dos comprimidos de cloridrato de moxifloxacino

$$C_A = \frac{(A_A \times C_{SQR})}{A_{SQR}}$$

Onde: C_A = concentração da amostra (ug/mL); A_A = média das absorvâncias das amostras; C_{SQR} = concentração da substância química de referência (ug/mL); A_{SQR} = absorvância da substância química de referência.

Após, foi calculado o valor percentual das amostras, pela fórmula abaixo.

$$C_A \% = \frac{(C_A \times 100)}{C_T}$$

C_A % = concentração percentual da amostra; C_A = concentração da amostra (ug/mL); C_T = concentração teórica (ug/mL).

Exatidão

O teste de recuperação foi o utilizado para a determinação da exatidão do método por UV. O ensaio utilizou o método de adição de padrão. O teste de recuperação foi realizado adicionando três níveis de concentração 80% (R1), 100% (R2) e 120% (R3) em relação a concentração de trabalho, de solução de HMOX-SQR as amostras. O ensaio foi realizado em triplicata nas concentrações de 4,0, 5,0 e 5,0 µg/mL. A porcentagem de recuperação foi calculada para cada nível de concentração. Desta maneira, foi possível avaliar a exatidão do método em determinar o teor de amostras com concentrações predeterminadas. As amostras foram preparadas de acordo com a Tabela 1.

Tabela 1: Preparo das soluções para o teste de recuperação do método por UV.

	Volume de HMOX-SQR (20,0 µg/mL)	Volume de HMOX- COMPRIMIDOS (20,0 µg/mL)	Concentração teórica final (µg/mL) em balão volumétrico de 5,0 mL
R1	1,0	1,0	4,0
R2	1,5	1,0	5,0
R3	2,0	1,0	6,0

A porcentagem de HMOX recuperada foi calculada de acordo com a equação abaixo.

$$\%R = \frac{(Cr - Ca)}{Cp} \times 100$$

Em que: *Cr*: concentração encontrada da solução amostra adicionada de SQR (µg/mL); *Ca*: concentração encontrada de amostra (µg/mL); *Cp*: concentração teórica adicionada da SQR (µg/mL).

Limite de Detecção e Limite de Quantificação

Os limites de detecção (LD) e de quantificação (LQ) foram calculados a partir da fórmula descrita na literatura (ICH, 2005), fundamentada no desvio padrão do intercepto e na inclinação da curva analítica. As equações abaixo foram utilizadas no cálculo.

$$LD = \frac{3,3 \times DP}{IC} \quad LQ = \frac{10 \times DP}{IC}$$

Onde: *DP*: desvio padrão do intercepto; *IC*: inclinação da curva de calibração.

Robustez

A robustez do método foi determinada variando-se o comprimento de onda (293 nm e 295 nm). Foram analisadas sei replicatas na concentração de 5,0 ug/mL de HMOX-SQR para cada variação.

Resultados e discussão

Os métodos espectrofotométricos são largamente utilizados nas análises farmacêuticas, uma vez que apresentam bons níveis de exatidão e precisão quando bem conduzidos experimentalmente. Pode-se notar que, mesmo sendo uma técnica relativamente simples quando comparadas a CLAE e eletroforese capilar, muitas vezes apresentam os mesmos resultados comparáveis com os níveis de exigência adotados em códigos oficiais. Em relação a sensibilidade, pode ser feita com restrição devido a imensa diversificação das estruturas químicas encontradas em medicamentos, na qual possui o fármaco como o princípio ativo e seus excipientes, que muitas vezes, podem contribuir para a interferência na metodologia.

Na análise farmacêutica a espectrofotometria na região do UV é utilizada como um método quantitativo quando não há interferência de excipiente. Além disso, essa técnica é um método de fácil execução, baixo custo, rápido e que não gera tanta quantidade de resíduos em relação a outras técnicas de análises como a CLAE (WATSON, 2005). Outra vantagem dessa técnica é que permite a determinação de parâmetros como quantificação da substancia em analise, constante de equilíbrio e velocidade de reações (ROCHA & TEIXEIRA, 2004; AMIN et al., 2008).

A água demonstrou em experimentos anteriores ser um excelente solvente para a quantificação do fármaco na forma farmacêutica escolha e como a mesma é de baixo custo e de grande quantidade no laboratório, optou-se por usar esse solvente para o desenvolvimento e a validação da metodologia.

Para a determinação do melhor comprimento de onda, partiu-se de uma concentração de 20,0 ug/mL, demonstrando que em 294 nm a amostra tinha seu comprimento de onda máximo.

Validação da metodologia

A linearidade foi determinada a partir dos resultados obtidos da construção da curva de Ringbom, indicando o intervalo linear obtido pelo método. Através dessa curva, pode-se verificar em quais concentrações o método obedece à lei de Lambert-Beer e em quais concentrações o erro relativo é mínimo (GONÇALVEZ, 1990). Observou-se que a melhor faixa linear de trabalho foi de 2,0 ug/mL a 8,0 ug/mL utilizando a água como solvente, portanto essa foi a faixa de linearidade trabalhada.

Tabela 2: Valores obtidos no ensaio de linearidade do método.

Concentração teórica final (ug/mL)	Absorvâncias	Absorvância média ± Desvio Padrão	Desvio Padrão Relativo (%)
2,0	0,237	0,236 ± 0,001	0,42
	0,236		
	0,235		
3,0	0,336	0,336 ± 0,001	0,17
	0,336		
	0,335		
4,0	0,433	0,432 ± 0,001	0,23
	0,431		
	0,432		
5,0	0,514	0,513 ± 0,002	0,30
	0,513		
	0,511		
6,0	0,609	0,608 ± 0,002	0,16
	0,607		
	0,608		
7,0	0,704	0,701 ± 0,003	0,46
	0,698		
	0,703		
8,0	0,790	0,789 ± 0,001	0,15
	0,788		
	0,788		

A curva analítica do HMOX-SQR foi construída com as médias dos valores de absorvâncias de três curvas analíticas, uma em cada dia, durante os ensaios de linearidade. A figura abaixo mostra os espectros sobrepostos para a determinação dos valores de linearidade.

Qualitativamente, o gráfico de resíduos (figura 2) pode indicar se os dados seguem um comportamento linear se a distribuição desses resíduos for aleatória (VALDERREMA et al., 2009). Como pode-se observar, os pontos estão distribuídos de forma equilibrada acima e abaixo de uma linha imaginária paralela ao eixo x na altura do resíduo zero, A realização do gráfico de resíduos é uma confirmação adicional para concluir que os dados são lineares.

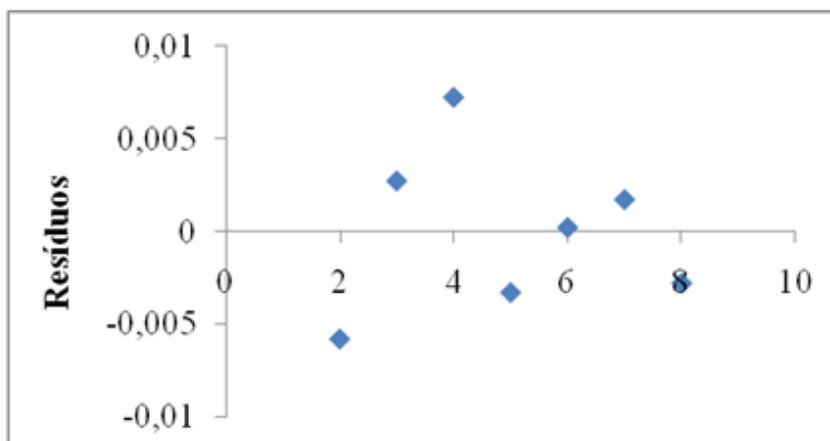


Figura 2: Gráfico de resíduos de HMOX-SQR, obtida através da regressão linear.

A análise de variância (ANOVA) calculada para o método é demonstrada na tabela abaixo.

Tabela 3: Análise de variância de absorvância determinados da curva analítica de HMOX-SQR, utilizando o método espectrofotométrico na região do UV.

Fonte da variação	Graus de liberdade	Soma dos Quadrados	Quadrado médio	F calculado	F crítico
Entre concentrações	6	0,705808286	0,117634714	47506,33*	2,84
Regressão linear	1	0,234423	0,234423	10243,2*	
Resíduo	5	0,000114	0,0000229		
Total	20	0,705842952			

Significativo para $p < 0,05\%$

A especificidade do método foi proposta pelo teste F de homogeneidade de variância e t de comparação das médias, sendo os valores encontrados de 0,99 e 0,01, menores que os tabelados, 4,95 e 1,943, respectivamente. Valores calculados menores que os valores tabelados indicam ausência de interferência de excipientes (INMETRO, 2007). Adicionalmente, foram comparadas as inclinações das curvas analíticas obtidas da SQR e amostra. Os resultados obtidos indicaram que não houve diferença estatisticamente significativa para os valores de inclinação das duas curvas. Esse resultado confirma com o já encontrado de que não há interferência do excipiente nas análises.

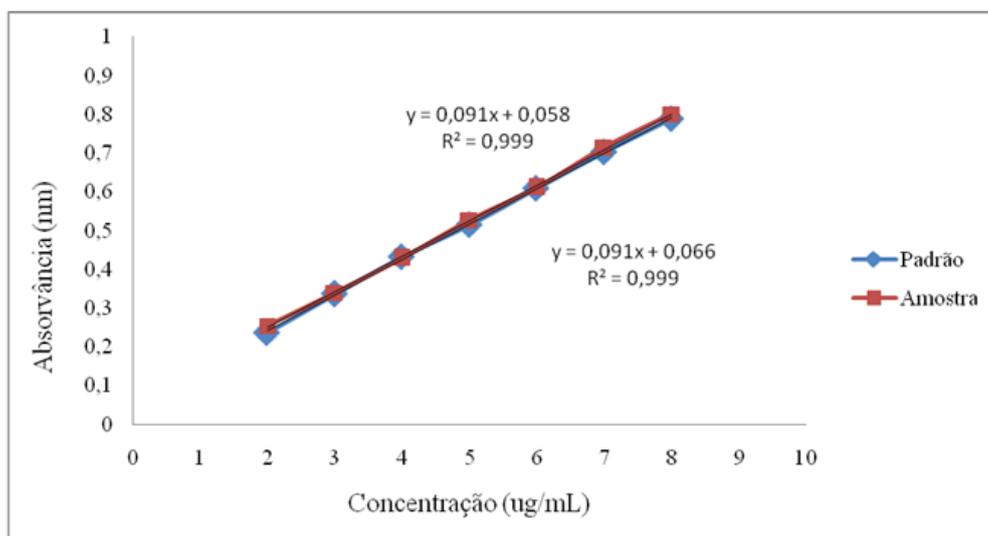


Figura 3: Comparação das curvas analíticas de padrão e amostra para a determinação da especificidade do método

De acordo com Bonfilio e colaboradores (2012), se o placebo não está disponível, a determinação da seletividade pode ser realizada através da comparação do valor de inclinação de duas curvas analíticas, sendo uma do padrão e uma da amostra. Se elas forem similares, o método é considerado seletivo e a matriz não interfere no placebo.

A precisão do método foi determinada através da repetibilidade (intradia) expressando-se os resultados com base no coeficiente de variação. Dez soluções de HMOX-SQR e HMOX comprimidos foram preparadas na concentração de 5,0 ug/mL foram submetidas a análises sucessivas, e os dados obtidos do mesmo dia, mesmo analista e mesmo laboratório, fornecendo um valor de 102,5 % e DPR de 0,98%.

A precisão intermediária foi avaliada através da precisão interdias. Os valores de teor de HMOX comprimidos determinados durante a avaliação da precisão do método proposto encontram-se na tabela abaixo. Os DPR% dos parâmetros interdias e entre-analistas foram de 1,04% e 1,92% respectivamente. Esses resultados estão de acordo com os compêndios oficiais, que preconizam um desvio padrão relativo de, no máximo 5% (BRASIL, 2017).

Tabela 4: Resultados obtidos pela repetibilidade, precisão intermediária e precisão entre analistas.

Repetibilidade e Precisão Intermediária					Reprodutibilidade			
Amostra	Dia	Teor (mg/comp)	Teor (%)	DPR (%)	Entre analistas	Teor (mg/comp)	Teor (%)	DPR (%)
1	1	448,3	102,8	1,04	1	443,4	101,6	1,92
	2	441,9	101,2		2	455,8	104,4	
	3	440,0	100,78					
Intradia		448,3	102,8	0,98%	Média	449,6	103,0	

O teor encontrado de HMOX comprimidos, em média, 101,6%, é um valor adequado. Geralmente para antimicrobianos, aceitam-se valores variando entre 90 a 110%, que é também a faixa de valor especificado para outras fluorquinolonas (USP 43, 2018). O teor encontrado entre-analistas também está de acordo com a literatura pesquisada, uma vez que demonstrou um teor de 103,0%.

A exatidão do método foi determinada pelo método da recuperação. Na tabela 13 são apresentados os valores de recuperação (R) obtidos para cada nível de concentração testado pelo método espectrofotométrico na região do ultravioleta.

Tabela 5: Determinação da exatidão do método analítico para análise de HMOX comprimidos por espectrofotometria na região do UV.

	HMOX adicionado (ug/mL)	HMOX encontrado (ug/mL)	Recuperação (%)	Recuperação média (%)	DPR (%)
R1	4,0	4,048	101,2	99,75	1,26
R2	5,0	4,961	99,22		
R3	6,0	5,930	98,84		

O teste de recuperação foi efetuado com o objetivo de comprovar a exatidão do método. Desta forma, quantidades conhecidas de SQR adicionadas as soluções de HMOX comprimidos para a

quantificação da substância. Obteve-se a média de 99,77%. Valores entre 98 a 102% indicam boa recuperação para o método e garantem sua exatidão (BRASIL, 2003; ICH, 2005).

A robustez do método foi determinada pela comparação dos resultados obtidos pela variação do comprimento de onda de (N) para 294 nm, (A) para 293 nm e (B) 295nm. Os valores obtidos estão dentro do especificado, sendo os valores de t calculados menores que os tabelados ($t_{\text{tab}}=2,015$) para todas as variações (N-A e N-B) com 5 graus de liberdade e 95% de confiança, demonstrando que o método é robusto.

Tabela 6: Valores obtidos para o ensaio de robustez.

	A	N	B
1	0,497	0,505	0,505
2	0,499	0,504	0,505
3	0,496	0,503	0,505
4	0,498	0,503	0,505
5	0,497	0,503	0,504
6	0,497	0,503	0,503
Média	0,497	0,504	0,505
DPR%	0,21	0,17	0,17
t encontrado	$2,94 \times 10^{-5}$	-----	0,02
t tabelado	2,015	-----	2,015

Os limites de detecção e quantificação calculados segundo a ICH/2005 e foram de 0,042 ug/mL e 0,129 ug/mL, respectivamente demonstrando alta sensibilidade e baixos níveis para quantificação.

CONCLUSÃO

O método proposto por UV, utilizando água destilada como solvente, com faixa de calibração de 2,0 a 8,0 ug/mL demonstrou especificidade, linearidade, precisão, exatidão e robustez, demonstrando ser adequados para a determinação quantitativa de HMOX em comprimidos.

O experimento provou também que, mesmo não sendo uma técnica oficial para quantificação de fármacos em sua forma farmacêutica, a espectrofotometria na região do ultravioleta demonstrou estar dentro dos padrões de exigência dos compêndios oficiais e legislações nacional e internacional vigentes.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AMIN, A.S. Pyrocatecol violet in pharmaceutical analysis. Part I. A spectrophotometric method for the determination of some B-lactamic antibiotics in pure and in pharmaceutical dosage forms. **II Farmaco**, v. 56, p. 211-218, 2008.

ANDRIOLE, V. T. **The Quinolones**. New York: Academic Press, 1999.

ANDRIOLE, V.T. The quinolones: past, present, and future. **Clin. Infect. Dis.**, v. 41, n. 2, p. 113-119, 2005.

ATTIMARAD, M.; AL-DHUBIAB, B.E.; ALHAIDER, I. A., ANROOP B NAIR, A. B.; SREE, H.N.; AHMED K MUEEN, A.K. Simultaneous determination of moxifloxacin and cefixime by first and ratio first derivative ultraviolet spectrophotometry. **Chem. Cent. J.**, v.6, p. 1-7, 2012.

BALL, P. Quinolone generations: natural history or natural selection? **J. Antimicrob. Chemother.**, v.46, p.17-24, 2000.

BONFILIO, R.; CAZEDEY, E.C.L.; ARAÚJO, M.B.; SALGADO, H.R.N. Analytical validation of quantitative high performance liquid chromatographic methods in pharmaceutical analysis: a practical approach. **Crit. Rev. Anal. Chem.**, v.42, p.1-14, 2012.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). **Antimicrobianos: bases teóricas e uso clínico**. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/servicos/controle/rede_rm/cursos/rm_controle/opas_web/modulo1/quinilonas.htm>. Acesso em: 08 ago. 2018.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). **Habilitação de Laboratórios Analíticos em saúde – segundo os requisitos da ISO/IEC 17025** – Procedimento GGLAS 02/17025, 2. Ed. Brasília, 2002.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária, Resolução da diretoria colegiada (RDC) nº 166, **Dispõe sobre a validação de métodos analíticos e dá outras providências**. Diário Oficial da União.

Brasília, 25 de julho de 2017. Disponível em: <<https://www20.anvisa.gov.br/coifa/pdf/rdc166.pdf>>. Acesso em: 20 Dez 2018.

BRITISH PHARMACOPOEIA. London: Her Majesty's Stationary Office, London; 2015.

CALVO, J.; MARTINEZ-MARTINEZ, L. Mecanismo de acción de los antimicrobianos. **Enferm. Infecc. Microbiol. Clín.**, v. 27, n.1, p.44-52, jan 2009.

DHUMAL, D. M.; SHIRKHEDKAR, A. A.; SURANA, S. J. Quantitative determination of moxifloxacin hydrochloride in bulk and ophthalmic solution by UV-spectrophotometry and first order derivative using area under curve. **Schol. Res. Library.**, v.3, n.3, p.453-456. 2011

EUROPEAN PHAMACOPOEIA, 8.ed. European Directorate for the Quality of Medicines & HealthCare (EDQM), 2014.

FARMACOPEIA BRASILEIRA. 5.ed. Brasília: Anvisa, 2010.

FARMACOPEIA PORTUGEUSA. 9. ed. Lisboa: Infarmed, 2009.

FDA. Food and Drug Administration 2018. **Moxifloxacin Drug Details**. Disponível em: <<http://www.accessdata.fda.gov/scripts/cder/drugsatfda/index.cfm?fuseaction=Search.DrugDetails>>. Acesso em: 08 ago 2018.

GONÇALVES, M. L. S. S. **Métodos instrumentais para análise de soluções: análise quantitativa**. 2. ed. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, 1990.

GOODMAN, L.S.; GILMAN, A. **As Bases Farmacológicas da Terapêutica**. 12 ed. Rio de Janeiro: Mac Grawhill, 2012.

ICH. **INTERNATIONAL CONFERENCE ON HARMONIZATION – ICH**. Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology Q2 (R1), Geneva, 2005.

INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA, NORMALIZAÇÃO E QUALIDADE INDUSTRIAL - INMETRO. DOQ-CGCRE-008, revisão 04: **Orientação sobre validação de métodos analíticos**. 2011. Disponível em: <http://www.inmetro.gov.br/Sidoq/Arquivos/Cgcre/DOQ/DOQ-Cgcre-8_04.pdf>. Acesso em: 08 ago 2018.

JAPANESE PHARMACOPOEIA. 17. ed. Disponível em: <<https://www.pmda.go.jp/english/rs-sb-std/standards-development/jp/0019.html>> Acesso em 20 ago. 2018.

LA ROCA, M.F.; SOBRINHO, J.L.S.; NUNES, L.C.C.; ROLIM NETO, P.J. Desenvolvimento e validação de método analítico: passo importante na produção de medicamentos. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêutica**, v.88, n.4, p.177-180, 2007.

LEYVA, S.; LEYVA, E. Fluoroquinolonas. Mecanismos de acción y resistencia, estructura, síntese y reacciones fisicoquímicas importantes para propiedades medicinales. **Bol. Soc. Quím. Méx.**, v. 2, n. 1, p. 1-13, 2008.

MARTINEZ, M.; MC-DERMOTT, WALKER, R. Pharmacology of the fluoroquinolones: a perspective for the use in domestic animals. **The Veterinarian Journal**, v.172, p.10-28, 2006.

MISRA M.; MISRA A. K.; ZOPE P.; PANPALIA G. M.; DORLE, A. K. Simple and validated UV-spectroscopic method for estimation of moxifloxacin.Hcl in bulk and formulation. **JGPT.**, v. 2, n. 6, p. 21-27, 2010.

MOTWANI, S. K.; CHOPRA S.; AHMAD, F. J.; KHAR, R. K. Validated spectrophotometric methods for the estimation of moxifloxacin in bulk and pharmaceutical formulations. **Spectrochim. Acta A. Mol. Biomol. Spectrosc.** v. 68 n. 2. P. 250-6, 2007.

O'NEIL, M. J. (Ed.). **The Merck Index**: an encyclopedia of chemicals, drugs and biologicals. 15th. ed. Whitehouse Station (NJ): Merck & Co., 2013, 1182 p.

PATEL, R. K.; PARMAR, R. R.; PATEL, V. M., SHAH, D. A. Method Development and validation of cefixime and moxifloxacin in pharmaceutical dosage form by UV spectrophotometric method. **Int Journ Pharma Rese Bioscience.**, v.1, n.2, p.81-93, 2012.

PATEL, R.; SHRIVASTAVA, S. K.; BHANDARI, P .; PATIDAR, A. Simultaneous estimation of moxifloxacin HCl and prednisolone acetate from eye drop formulation by Q analysis method. **Int. J. Pharm. Res. Dev.** v. 4 p. 118–122, 2012.

RANG, H. P.; DALE, M. M.; RITTER, J. M. **Farmacologia**. 6. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2007. p. 672-674.

ROCHA, F. R. P.; TEIXEIRA, L. S. G. Estratégias para aumento de sensibilidade em espectrofotometria UV-VIS. **Quim. Nova**, v. 27, n. 5, p. 807-812, 2004.

SAHU, S. K.; AZAM, M. A.; SAHU, D.; BANARJEE M. Spectrophotometric estimation of moxifloxacin in bulk and its pharmaceutical formulations. **Pharmacology** (online) v. 2, p. 491–502, 2010.

SALEM, M. Y.; EL-GUINDI, N. M; MIKAEL, H. K.; ABD-EL-FATTAH, L.E. Stability Indicating Methods for the Determination of Some Fluoroquinolones in the Presence of Their Decarboxylated Degradates. **Chem. Pharm. Bull.** v. 54, n. 12, p. 1625-1632, 2006.

SANTORO, M. I. R. M. **Introdução ao Controle de Qualidade de Medicamentos**. São Paulo: Atheneu, Editora da USP, 1988. 122 p.

SILVERSTEIN, R. M.; WEBSTER, F. X. **Identificação espectrofotométrica de compostos orgânicos**. 7. ed. Rio de Janeiro: LTC, 2007.

SOUSA, J.; ALVES, G.; FORTUNA, A.; FALCÃO, A. Analytical methods for determination of new fluoroquinolones in biological matrices and pharmaceutical formulations by liquid chromatography: a review. **Anal. Bioanal. Chem.**, v.403, p. 93-129, 2012.

SWARTZ, M. E.; KRULL, I. S. Validação de métodos cromatográficos. **Pharmaceutical Technology**, v.2, n.3, p. 12-20, 1998.

SWARTZ, M.E.; KRULL, I.S. **Analytical method development and validation**. New York, Marcel Dekker, p. 25-26, 1997.

TOMIOKA, H.; SATO, K., SHIMIZU, T.; SANO, C. Anti-mycobacterium tuberculosis activities of new fluoroquinolones in combination with other antituberculous drugs. **J. Infect.**, v. 44, n.3, p. 160-165, 2010.

TRASNEL, M.; GAYOT, A.T. Practice of validation. **Drug Dev. Ind. Pharm.**, v, 21, n. 1, p. 79-91, 1995.

UNITED STATES PHARMACOPEIA. 43. ed. Rockville. The United States Pharmacopeial Convention, 2019.

WATSON, D. G. **Pharmaceutical analysis: a textbook for pharmacy students and pharmaceutical chemists**. 2. ed. Edinburgh: Elsevier Churchill Livingstone, 2005. 382p.

ZHANEL, G. G.; NOREDDIN A, M. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of the new fluoroquinolones: focus on respiratory infections. **Curr. Opin. Pharmacol.** v.1, n. 5, p. 459–463. Oct 2001.

