

DETERMINAÇÃO ESPECTROFOTOMÉTRICA DE CLORIDRATO DE LEVAMISOL EM COMPRIMIDOS UTILIZANDO ÁGUA COMO SOLVENTE¹

SPECTROPHOTOMETRIC DETERMINATION OF LEVAMISOLE HYDROCHLORIDE IN TABLETS USING WATER AS SOLVENT

Leonardo Pereira Costa², Cristiane Ziech², Cristina Lenhardt Kaefer² e Fabiana Ernestina Barcellos da Silva³

RESUMO

O levamisol é um fármaco anti-helmíntico amplamente utilizado no tratamento de parasitoses. A metodologia oficial, segundo a Farmacopeia Norte-Americana (USP), para doseamento de levamisol em comprimidos, é a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), utilizando como fase móvel acetonitrila/tampão fosfato monobásico pH 7,0 no modo gradiente. No presente trabalho, propõem-se o desenvolvimento e a validação de metodologia para quantificação de levamisol em comprimidos, utilizando espectrofotometria no ultravioleta e água destilada como solvente. O método desenvolvido demonstrou ser específico visto que não houve interferência dos excipientes no doseamento. Na análise da linearidade, obteve-se um coeficiente de correlação (r) de 0,9988. A repetibilidade e precisão intermediária foram avaliadas pela análise dos teores no mesmo dia e em dias diferentes e foram obtidos coeficientes de variação percentual (CV%) de 1,47% (entredia) e 1,23% (intradia). O método demonstrou ser exato (recuperação de 99,95%). A robustez foi analisada através de um planejamento fatorial 22, em que foi verificada a influência do tempo de extração e pH da solução. O método desenvolvido demonstrou ser adequado para uso na rotina de laboratórios de controle de qualidade para doseamento de levamisol em comprimidos.

Palavras-chave: anti-helmínticos, espectrofotometria, teor.

ABSTRACT

Levamisole is an anthelmintic drug widely used in the treatment of parasitic infections. The official method, according to the American Pharmacopoeia (USP), for the dosage of levamisole in tablets is high performance liquid chromatography (HPLC), using as the mobile phase acetonitrile/buffer monobasic phosphate at pH 7.0 in gradient mode. In this paper we propose the development and validation of methodology for the quantification of levamisole in tablets using ultraviolet spectrophotometry and distilled water as solvent. The developed method proved to be specific since there was no interference of the excipients in the dosage. In the analysis of linearity it was noticed a correlation coefficient (r) of 0.9988. The repeatability and intermediate precision were evaluated by the analysis of the levels in the same day and on different days. The coefficient of percentage variation (CV%) of 1.47 % (between days) and 1.23 % (within day) were obtained. The method proved to be accurate (recovery of 99.95%). Robustness was analyzed using a factorial 22 design, in which it was noted the influence of extraction time and pH of the solution. The developed method proved to be suitable for routine use in quality control laboratories for the dosage of levamisole in tablets.

Keywords: anthelmintics, spectrophotometry, content.

¹ Trabalho Final de Graduação - TFG.

² Acadêmicos do Curso de Farmácia - UNIPAMPA.

³ Orientadora - UNIPAMPA. E-mail: fabianasilva@unipampa.edu.br

INTRODUÇÃO

As parasitoses intestinais decorrentes de protozoários e/ou helmintos são responsáveis por um grande gasto da saúde pública principalmente em países em desenvolvimento onde se encontram disseminadas devido à baixa qualidade de vida das camadas populacionais mais carentes (FREI et al., 2008). As helmintíases são as maiores causas de mortalidade e morbidade em países de terceiro mundo e são responsáveis por diversas infecções decorrentes destas parasitoses intestinais. As infecções por vermes helmintos afetam aproximadamente dois bilhões de pessoas em todo o mundo, principalmente em regiões rurais onde é comum a infecção simultânea por mais de um tipo de parasita (RANG et al., 2001; LOUKAS; HOTEZ, 2006). A ascariíase, infestação causada pelo *Ascaris lumbricoides*, por sua alta incidência, ocupa posição de destaque entre as verminoses intestinais que acometem a população brasileira, podendo determinar incapacidade física, tanto em adultos como em crianças. Um dos principais anti-helmínticos utilizados na terapia contra essa parasitose é o levamisol (LEV), sendo sua estrutura química representada na figura 1 (PARFITT, 2009).

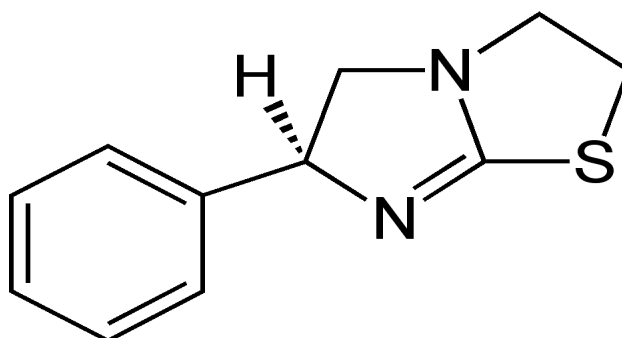


Figura 1 - Estrutura química do LEV.

A espectrofotometria, na região do ultravioleta, representa uma técnica adequada para o doseamento de substâncias ativas inseridas nas mais variadas formas farmacêuticas, apresentando como características principais o baixo custo e a possibilidade de redução do uso de solventes orgânicos quando comparados com CLAE. Diversos autores têm publicado estudos envolvendo a determinação de fármacos em comprimidos por espectrometria no ultravioleta. Segundo Aquino et al. (2011), a metodologia pode ser aplicada no doseamento de triancinolona em complexos de inclusão contendo beta-ciclodextrina. O fluconazol, um fármaco da classe dos triazólicos, pode ser quantificado em comprimidos utilizando-se espectrometria no ultravioleta no comprimento de onda de 261 nm (SILVA et al., 2009). Para Böer et al. (2008), o método por espectrofotometria, desenvolvido para quantificação de tracolimus, um agente utilizado na prevenção da rejeição de transplantes, se mostrou linear, específico, preciso, exato e robusto, sendo uma alternativa ao método já validado por CLAE. Segundo a Farmacopeia Americana (USP 32, 2009), o método preconizado para determinação do teor de comprimidos de LEV é a CLAE, utilizando como fase móvel acetonitrila/tampão fosfato monobá-

sico pH 7,0 no modo gradiente. Levando em consideração o custo das análises por CLAE, bem como a minimização do uso de solventes orgânicos, este trabalho tem o objetivo de desenvolver e validar uma metodologia rápida e simples para determinação de LEV em comprimidos por espectrofotometria no ultravioleta (UV), utilizando água destilada como solvente.

MATERIAL E MÉTODOS

INSUMO FARMACÊUTICO E AMOSTRA COMERCIAL

O LEV utilizado como substância química de referência (SQR) foi adquirido da empresa Henrifarma (São Paulo/Brasil), lote LV090609E e com o teor declarado de 100,1%, conforme certificado de análise. O insumo foi submetido a diferentes testes de caracterização a fim de utilizá-lo como padrão de trabalho nas análises. As amostras comerciais analisadas foram comprimidos do medicamento Ascaridil® (Janssen-Cilag Farmacêutica Ltda, Brasil), contendo 150mg de LEV adquiridos em uma drogaria local.

AValiação da Matéria-Prima e Comprimidos

O LEV utilizado no desenvolvimento do trabalho foi avaliado nos seguintes aspectos:

- Caracteres físicos da matéria-prima (EP, 2005);
- Solubilidade da matéria-prima (EP, 2005);
- Teor da matéria-prima e comprimidos (USP 32, 2009);
- pH da matéria-prima (USP 32, 2009);
- Pureza cromatográfica dos comprimidos (USP 32, 2009).

DESENVOLVIMENTO DA METODOLOGIA POR ESPECTROMETRIA NO ULTRAVIOLETA

Após determinação do peso médio, os comprimidos de LEV foram triturados em gral até formação de um pó fino. Uma amostra deste material foi adicionada em um balão volumétrico de 100ml, com 50% do volume de água destilada e posteriormente submetida a banho ultrassônico por 15 minutos. Após, completou-se o volume com água destilada. A amostra foi filtrada e uma alíquota foi retirada para obtenção da concentração de trabalho ($6 \mu\text{g mL}^{-1}$). Os espectros na região do ultravioleta foram obtidos utilizando-se espectrofotômetro UV-VIS Perkin Elmer Lambda 35, com leituras realizadas por varredura entre 200 e 400nm. O comprimento de onda selecionado para a análise foi de 213nm.

VALIDAÇÃO DA METODOLOGIA ANALÍTICA

A metodologia foi validada nos seguintes itens: especificidade, linearidade, precisão, exatidão e robustez. A especificidade foi avaliada a partir da determinação do efeito matriz de uma amostra placebo contendo excipientes que estão presentes na formulação do comprimido de LEV frente à inclinação da curva analítica obtida com a SQR (INMETRO, 2007). Para tanto, foram preparadas 3 curvas analíticas que abrangiam as seguintes concentrações: 2, 4, 5, 6, 7 e 8 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de LEV. A primeira curva continha LEV, empregando água como solvente. A segunda curva continha as mesmas concentrações de LEV da primeira curva e 3 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de LEV provenientes das amostras comerciais (comprimidos). A terceira curva foi preparada de maneira que contivesse as mesmas concentrações de LEV da primeira curva e uma quantidade pré-determinada de excipientes. Para tanto, foi preparada uma mistura placebo dos excipientes contendo amido, lactose e estearato de magnésio nas proporções de 78,5, 20 e 1,5%, respectivamente. A partir dessa mistura foi realizado procedimento idêntico ao realizado para a segunda curva. A linearidade foi avaliada através do preparo de 5 soluções apresentando diferentes concentrações (4, 5, 6, 7 e 8 $\mu\text{g mL}^{-1}$) de LEV (BRASIL, 2003). Para avaliação da precisão (ensaio de repetibilidade), foram analisadas seis replicatas da solução de LEV em uma concentração correspondente a 6 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Os dados para a precisão intermediária foram coletados em quatro dias e por analistas diferentes. Para a análise dos dados foi calculado o coeficiente de variação (CV%) (BRASIL, 2003). A exatidão foi determinada através da adição de quantidades conhecidas de LEV a uma mistura dos componentes do medicamento (placebo contaminado). A seleção dos excipientes bem como suas porcentagens foi determinada pela concentração usual destes em formulações sólidas (ROWE et al., 2009). Para o preparo da solução-amostra foi pesado o equivalente a 10mg de LEV de comprimidos pulverizados. Esta alíquota foi transferida a um balão volumétrico de 100mL o qual recebeu em torno de 50mL de água e foi submetido a banho ultrassônico por 15 minutos, após este processo o volume do balão foi completado com o mesmo solvente e a solução foi filtrada, sendo a primeira porção do filtrado descartada. Para o preparo das soluções teste foram adicionadas a balões volumétricos de 50mL quantidades específicas da solução amostra (100 $\mu\text{g mL}^{-1}$). A robustez do método analítico foi avaliada através de um planejamento fatorial 2^2 com ponto central onde foram verificadas as alterações nos teores das amostras variando-se o tempo de extração e o pH da solução, conforme descrito na tabela 1.

Tabela 1 - Parâmetros e níveis analisados para avaliação da robustez .

Parâmetros/Nível	-1	0	+1
Tempo de extração (min)	10	15	20
pH	6	6,5	7

Estes parâmetros foram analisados de acordo com os níveis de planejamento demonstrados na tabela 2.

Tabela 2 - Experimentos realizados para avaliação da robustez.

Experimento	Tempo de extração	pH
1	-1	-1
2	-1	+1
3	+1	-1
4	+1	+1
5	0	0
6	0	0
7	0	0

RESULTADOS

CARACTERIZAÇÃO DA MATÉRIA-PRIMA E COMPRIMIDOS

A determinação da solubilidade, pH e teor da SQR estava de acordo com o especificado na USP 32. A determinação da pureza cromatográfica por cromatografia em camada delgada e teor dos comprimidos por CLAE apresentaram resultados compatíveis com o especificado nos códigos oficiais.

VALIDAÇÃO DA METODOLOGIA

A validação deve garantir por meio de estudos experimentais que o método atende à aplicação analítica e para tanto deve ser avaliado quanto a especificidade, linearidade, precisão, exatidão e robustez (BRASIL, 2003; ICH, 2005). Na figura 2 estão representados os espectros da SQR (padrão) e da amostra analisada. O comprimento de onda de 213nm foi escolhido para quantificação da amostra.

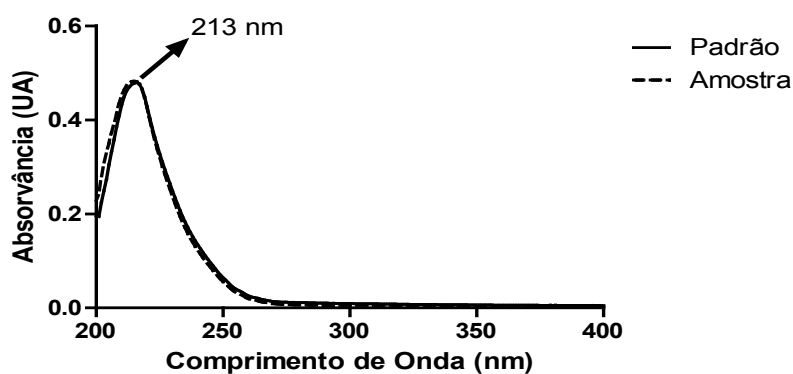


Figura 2 - Espectros obtidos para a SQR e comprimidos de levamisol.

A especificidade do método foi avaliada através da construção de curvas analíticas contendo LEV SQR (curva 1), LEV proveniente de amostra comercial (curva 2) e LEV adicionado de mistura

de excipientes padrão (curva 3). Na tabela 3, constam as equações da reta e respectivos coeficientes angulares e os coeficientes de correlação (r) para as 3 curvas analíticas acima descritas.

Tabela 3 - Equações da reta e coeficientes de correlação (r) obtidos para avaliação da especificidade.

Curva	Equação da reta	r
1	$y = 0,07928x + 0,018$	0,9997
2	$y = 0,08028x + 0,024$	0,9997
3	$y = 0,07923x + 0,029$	0,9994

Na avaliação da linearidade, a faixa de concentração estudada foi de 4,0 a 8,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$, conforme demonstrado na figura 3.

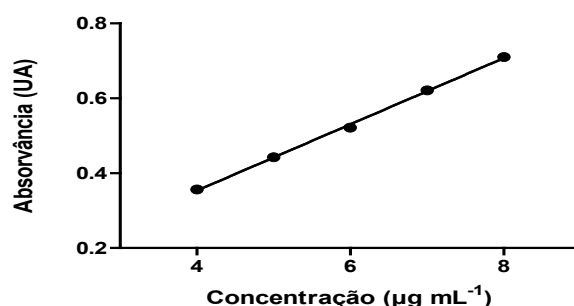


Figura 3 - Curva de calibração das soluções de LEV.

Na tabela 4, mostra-se a análise de variância dos valores obtidos na avaliação da linearidade.

Tabela 4 - Análise de variância da curva de calibração do LEV.

Fonte de variação	GL	Σ Quadrados	Variância	F*
Entre	4	0,2354	0,05886	118,66 (3,48)
regressão linear	1	0,2352	0,23516	474,06 (4,96)
desvio da linearidade	3	0,0003	0,00010	0,19 (3,71)
Resíduo	10	0,0050	0,00050	
Total	14	0,2404		

* Os valores entre parênteses correspondem aos valores críticos de F para $p = 0,05$.

O ensaio de repetibilidade foi realizado através da análise de 6 amostras na concentração de 6 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Os teores encontrados para cada solução estão descritos na tabela 5.

Tabela 5 - Ensaio de repetibilidade do LEV.

Solução	Concentração ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Teor (%)
1	6,03	100,33
2	6,00	96,66
3	6,02	98,00
4	5,99	98,99
5	6,00	100,5
6	6,01	98,33
	Média	98,80
	DP	1,46
	CV%	1,47%

Para a precisão intermediária, a análise foi realizada por analistas diferentes e em dias diferentes e obteve-se um CV% de 1,23%. A exatidão foi avaliada pela recuperação de quantidade do fármaco adicionada a uma mistura de excipientes usuais presentes em comprimidos (placebo) e calculada utilizando a equação (1):

$$Exatidão = \frac{\text{concentração média experimental}}{\text{concentração teórica}} \times 100 \quad (1)$$

Na tabela 6, mostram-se os resultados para o teste de exatidão.

Tabela 6 - Teste de exatidão do LEV.

	Concentração ($\mu\text{g mL}^{-1}$)		Recuperação (%)
	Adicionada	Recuperada	
Solução 1	2,00	1,99	99,5
Solução 2	4,00	3,97	99,2
Solução 3	5,00	5,10	102,0
Solução 4	6,00	5,94	99,0
Solução 5	7,00	7,00	100,0
Solução 6	8,00	8,00	100,0
		Média (% \pm DP)	99,95 \pm 1,08

Para o ensaio de robustez, foram preparadas soluções na concentração de $6 \mu\text{g mL}^{-1}$ e avaliadas as respostas referentes à concentração do fármaco após a determinação pela metodologia proposta ($n=3$), de acordo com o planejamento fatorial previamente demonstrado. O tratamento dos dados foi realizado utilizando uma planilha eletrônica disponibilizada *on-line* pelo Instituto de Química da Universidade Estadual de Campinas (TEÓFILO; FERREIRA, 2006).

DISCUSSÃO

O comprimento de onda, selecionado para quantificação do LEV nas amostras comerciais, foi de 213nm. Na avaliação da especificidade, conforme verificado na tabela 5, os coeficientes angulares apresentaram valores próximos entre si, o que sugere que não há influência da matriz sobre os resultados obtidos (INMETRO, 2007). O espectro obtido a partir da mistura de excipientes padrão na ausência de LEV foi também avaliado e não apresentou absorvância no comprimento de onda utilizado no método. Dessa forma, pode-se considerar que o método apresenta especificidade frente aos excipientes. No intervalo de $4,0$ a $8,0 \mu\text{g mL}^{-1}$, o método mostrou-se linear, apresentando um coeficiente de correlação (r) de 0,9988. A análise da variância (ANOVA), apresentada na tabela 6, demonstra que os dados não possuem desvio de linearidade, estando de acordo com as especificações do Guia para Validação de Métodos Analíticos e Bioanalíticos (BRASIL, 2003). O ensaio de repetibilidade apresentou um coeficiente de variação (CV) de 1,47% e o de precisão intermediária um CV de 1,23%. Os resultados do ensaio de precisão foram considerados adequados, de acordo com BRASIL (2003). O método demonstrou ser exato, com recuperação média de 99,95% da substância ativa, conforme tabela 9 (BRASIL, 2003).

A comparação com uma metodologia estabelecida foi também utilizada como parâmetro de avaliação da exatidão. Os resultados demonstraram que não houve diferença significativa entre a metodologia proposta e o método preconizado pela USP 32 utilizando CLAE. Para o ensaio de robustez, utilizando planejamento fatorial 2^2 , as variações no tempo de extração e pH da solução demonstraram possuir um efeito significativo quando analisadas em conjunto (com interação entre as duas variáveis). Entretanto, quando analisadas separadamente, não apresentaram efeitos significativos. Desta forma, o método foi considerado robusto.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Devido à facilidade das análises bem como rapidez e custo relativamente baixo da espectrofotometria ultravioleta, este método se mostra uma alternativa viável para quantificação de LEV em comprimidos. No método proposto não foram verificadas influências devido aos excipientes comumente encontrados em formulações sólidas, demonstrando que o mesmo é específico frente a este fator. A linearidade do método foi satisfatória, assim como os demais parâmetros de validação estudados (precisão, exatidão e robustez). Dessa forma, a metodologia proposta pode ser utilizada na rotina de controle de qualidade de comprimidos de cloridrato de LEV, como uma alternativa ao método oficial de doseamento utilizando CLAE.

REFERÊNCIAS

AQUINO, G. D. A. et al. Validation of quantitative analysis method of triancinolone in ternary complexes by UV-Vis spectrophotometry. **Rev. Ciênc. Farm. Básica Apl.**, v. 32, n. 1, p. 35-40, 2011.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução nº 899, de 29 de maio de 2003. Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos. **Diário Oficial da União**, de 2 de junho 2003.

BOER, T. M.; MARQUES, M. R.; CARDOSO, S. G. Determination of tracolimus in pharmaceutical formulations by validated spectrophotometric methods. **Rev. Ciênc. Farm. Básica Apl.**, v. 29, n. 2, p. 137-43, 2008.

EP 2005. **European Pharmacopoeia**. 5th. ed. Strasbourg: Convention on the Elaboration of a European Pharmacopoeia; 2005.

FREI, F.; JUNCANSEN, C.; RIBEIRO-PAES, J. T. Epidemiological survey of intestinal parasite infections: analytical bias due to prophylactic treatment. **Cad. Saude Pública**, v. 24, n. 12, p. 2919-25, 2008.

ICH. **Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology Q2(R1)**. International Conference of Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use. Suíça, 2005, p. 1-13.

INMETRO. **Orientações sobre validação de métodos de ensaios químicos DOC-CGCRE-008, Revisão 02**. Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial. Brasil, 2007, 1-24.

LOUKAS, A.; HOTEZ, P. J. Quimioterapia das infecções por helmintos. In: BRUNTON, L. L.; LAZO, J. S.; PARKER, K. L. (Editors). **Goodman & Gilman's: As Bases Farmacológicas da Terapêutica**. 11. ed. Rio de Janeiro: McGraw-Hil, 2006.

PARFITT, K. (Ed.). **Martindale: The complete drug reference**. 36 ed. London: Pharmaceutical Press, 2009.

RANG, H. P.; DALE, M. M.; RITTER, J. M. **Farmacologia**. 4 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Kooogan, 2001.

ROWE, R. C.; SHESKEY, P. J.; QUINN, M. E. **Handbook of pharmaceutical excipients**. 6th ed. London: Pharmaceutical Press, 2009.

SILVA, F. E. B. et al. Desenvolvimento de comprimidos contendo fluconazol por compressão direta. **Lat. Am. J. Pharm.**, v. 28, n. 4, p. 604-08, 2009.

TEÓFILO, R. F.; FERREIRA, M. M. C. Quimiometria II: Planilhas eletrônicas para cálculos de planejamentos experimentais, um tutorial. **Química Nova**, v. 29, n. 2, p. 338-50, 2006.

USP 32. **The United States Pharmacopeia**. 32 ed. Rockville: United States Pharmacopeial Convention, 2009.

