

DOSEAMENTO DO ACICLOVIR POR VOLUMETRIA EM MEIO NÃO-AQUOSO*

Eduardo Dias ALMEIDA**
César Liberato PETZHOLD***
Ângelo Ricardo ZANOTTO****
Ana Maria BERGOLD****

- **RESUMO:** Métodos quantitativos de análise do aciclovir por volumetria em meio não-aquoso são comparados com o método oficial. As propriedades anfotéricas do fármaco, devido aos dois valores de pKa da molécula, possibilitam sua determinação, tanto como ácido quanto como base fraca, com uso de indicadores, tais como cristal violeta, naftolbenzeína e azovioleta, desde que a matéria-prima seja devidamente dessecada pelo menos a 160°C, durante 2 horas. Os resultados obtidos indicam que os métodos avaliados são exatos e precisos, constituindo-se em alternativa para o método oficial.
- **PALAVRAS-CHAVE:** Aciclovir; volumetria em meio não-aquoso; cristal violeta; azovioleta.

Introdução

O aciclovir (ACV), apresentado na Figura 1, é um agente antiviral, análogo sintético de um nucleosídeo natural, a desoxiguanosina, em que o carboidrato da molécula é acíclico. Sua diferença estrutural, em com-

* Trabalho realizado com o auxílio financeiro do CNPq.

** Mestrando do Curso de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas - UFRGS.

*** Departamento de Química - UFRGS.

**** Departamento de Produção de Matérias-Primas - Faculdade de Farmácia - UFRGS - 90610-000 - Porto Alegre - RS - Brasil.

paração com outros antivirais, proporciona um mecanismo de ação único contra infecções causadas pelos vírus *Herpes Simplex* (HSV) dos tipos 1 e 2 e *Varicella-Zoster* (VZV), apresentando baixa toxicidade para as células normais. *Epstein-Barr virus* (EB) e *Cytomegalovirus* (CMV) também são suscetíveis à ação do ACV, porém, em menor extensão.⁹

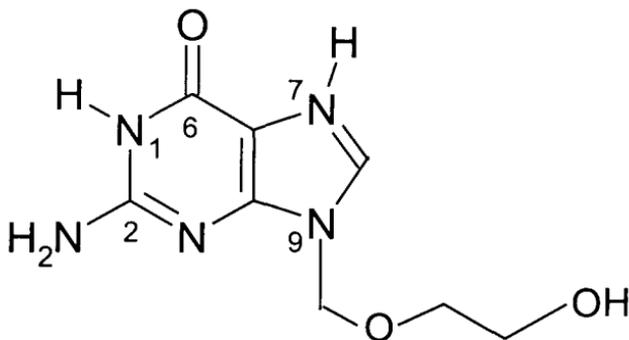


FIGURA 1 – Estrutura molecular do aciclovir.

Ao longo dos anos, diversos métodos têm sido propostos para determinação do ACV. Volumetria em meio não-aquoso com determinação potenciométrica do ponto final e espectrofotometria no UV são os procedimentos recomendados pela *Farmacopéia Britânica*² para a determinação de matéria-prima e suas formulações, respectivamente.

Métodos volumétricos em meio não-aquoso são utilizados há muito tempo para doseamento de ácidos e bases fracas e constituem métodos bastante simples e econômicos. Baseiam-se no conceito de Brønsted-Lowry, segundo o qual ácido é toda substância, molécula ou íon capaz de liberar um próton e base é o composto capaz de receber um próton.⁴ A molécula de ACV, segundo Kozjek et al.,⁵ apresenta duas constantes de ionização: 9,35 (ácida) e 2,19 (básica), determinadas através de espectrofotometria no UV. A acidez do composto, como demonstrado nos trabalhos de Kristl et al.,⁶ é proveniente da protonação do oxigênio ligado ao N1 do anel pirimidínico, enquanto suas propriedades básicas estão em função do N9 do anel imidazólico. Desta maneira, sua propriedade anfotérica, semelhante à guanosina (Figura 2), permite a determinação quantitativa por meios volumétricos, tanto como ácido quanto como base fraca.

É objetivo deste trabalho validar o doseamento em meio não-aquoso do ACV, utilizando indicadores para a visualização do ponto final. Estes doseamentos levam em consideração o caráter anfotérico da molécula. De acordo com as Boas Práticas de Fabricação que são referidas na Farmacopéia Americana,¹¹ a exatidão de um método pode ser determinada pela comparação dos resultados do método que está sendo proposto com os de um segundo método bem caracterizado.

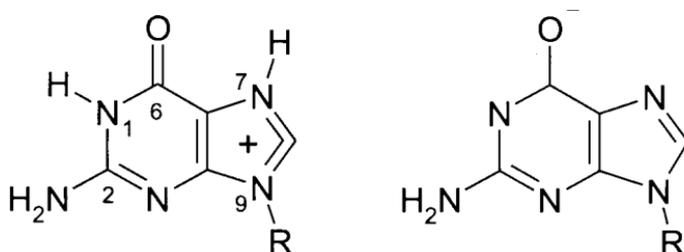


FIGURA 2 – Estrutura predominante da guanosina (a) protonada e (b) desprotonada.

Materiais e métodos

Reagentes e equipamentos

ACV foi obtido como matéria-prima fornecida por farmácias conveniadas com a ANFARMAG/RS (Associação Nacional de Farmacêuticos Magistrais, seccional RS); ácido acético glacial, dimetilsulfóxido, anidrido acético foram de grau analítico. As soluções titulantes de ácido perclórico 0,1 M e KOH propanólica 0,1 M foram preparadas e padronizadas utilizando-se padrões primários apropriados. As titulações potenciométricas foram realizadas a $25 \pm 2^\circ\text{C}$, com eletrodo combinado de vidro-calomelano, padronizado e estabilizado com tampão fosfato (pH 7,0) e ácido bórico/cloreto de potássio (pH 10). O aparelho utilizado foi um potenciômetro digital, modelo DMPH-2, além de buretas de 10 e 25 ml e agitador magnético. A dessecação das substâncias foi realizada em estufa modelo BIOMATIC (0-300°C) e a determinação de umidade, em aparelho de Karl-Fischer modelo KF DL-37. As análises de DSC (calorimetria diferencial exploratória) foram feitas em célula de DSC-4, pertencente ao sistema PERKIN ELMER, sob atmosfera dinâmica de ar, com taxa de aquecimento de $10^\circ\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$ até 400°C.

Métodos

Método potenciométrico com ácido perclórico 0,1 M (A)

Cerca de 150 mg de ACV, exatamente pesados, previamente dessecados a 160°C/2 h, foram dissolvidos em béquer com 60 ml de ácido acético glacial. O eletrodo foi inserido na solução, sendo esta titulada sob agitação contínua com ácido perclórico 0,1 M. A massa de ACV foi calculada do volume de titulante consumido no ponto de inflexão da curva potenciométrica. Cada ml de titulante consumido é equivalente a 22,52 mg do fármaco.

Método potenciométrico com adição de anidrido acético (B)

A amostra foi previamente dessecada a 105°C/2 h, seguindo-se o mesmo procedimento descrito para o método A, com a adição de 10 ml de anidrido acético antes do início da titulação.

Método volumétrico com indicador cristal violeta (C)

Cerca de 150 mg de ACV, exatamente pesados e previamente dessecados a 160°C/2 h, foram dissolvidos em erlenmeyer, com 60 ml de ácido acético glacial, adicionando-se cinco gotas de cristal violeta como indicador. A solução foi titulada sob agitação contínua com ácido perclórico 0,1 M até o desenvolvimento de coloração verde-esmeralda. A massa de ACV foi calculada levando-se em consideração o volume de titulante consumido até o ponto de viragem do indicador.

Método volumétrico com indicador naftolbenzeína (D)

Seguiu-se o mesmo procedimento descrito para o método C, substituindo apenas o indicador por naftolbenzeína.

Método volumétrico com KOH propanólico 0,1 M (E)

Cerca de 150 mg de ACV, exatamente pesados e previamente dessecados a 160°C/2 h, foram dissolvidos em erlenmeyer com 30 ml de dimetilsulfóxido, adicionando-se cinco gotas de azovioleta como indicador. A solução foi titulada sob agitação contínua com hidróxido de potássio propanólico 0,1 M, até o desenvolvimento de coloração azul. Calculou-se a massa de ACV considerando-se o volume de titulante

consumido até o ponto de viragem do indicador. Cada ml de titulante consumido é equivalente a 22,52 mg do fármaco.

Resultados e discussão

Volumetria de neutralização com hidróxido de potássio propanólico

Como já é conhecido, o uso de diferentes solventes interfere significativamente nas propriedades físico-químicas de compostos que apresentam facilidade de dissociação. Tais propriedades, como solubilidade e pKa, são importantes ferramentas na análise volumétrica e devem ser consideradas na tentativa de se obter um meio favorável de processar a reação estequiométrica para titulação de um fármaco.

O resultado de diferentes métodos tem mostrado que o equilíbrio no tautomerismo ceto-enólico do ACV é fortemente dependente da polaridade do solvente.⁸ O uso de DMSO tem sido largamente estudado, devido ao efeito nivelador que exerce sobre compostos que apresentam, principalmente, grupamentos NH-ácidos.³ No caso do N1 amídico do ACV, ligado ao oxigênio da posição 6, pode sofrer tautomerização ceto-enólica na molécula, aumentando sua acidez e contribuindo para um doseamento como ácido fraco mais eficiente.

O método para determinação de ácidos fracos descrito por Schneckeburger & Quade-Henkel,¹⁰ usando KOH propanólico como titulante e azovioleta como indicador, foi utilizado como base neste trabalho e demonstrou ser bastante eficiente na análise do ACV. O método forneceu valores precisos, diferindo significativamente apenas do método B, para bases fracas, que utilizou ácido perclórico e anidrido acético. Os resultados são apresentados na Tabela 3.

Volumetria com ácido perclórico

A determinação com ácido perclórico tem sido um método em meio não-aquoso muito versátil dentro da química quantitativa, pois um grande número de fármacos é titulado com este, devido às propriedades de ionização das moléculas em ácido acético glacial. As farmacopéias preconizam o uso deste método para o ACV. A *Farmacopéia Americana*,¹¹

entretanto, especifica o método por CLAE, até mesmo para a matéria-prima. A determinação do ponto final na volumetria é potenciométrica, com uso de eletrodo de vidro-calomelano.

A amostras de ACV, previamente dessecadas a 160°C/2 h, foram analisadas com uso de indicadores cristal violeta (método C), naftolbenzeína (método D) e comparadas com o método oficial (método A), conforme as Tabelas 1 e 2.

A alteração na metodologia, pela adição de anidrido acético como agente desidratante, foi proposta, visando verificar a influência da água presente na amostra (método B). A análise demonstrou pequena variação em relação aos métodos A, C e D, como verificado nas Tabelas 3 e 4. Neste método, a amostra foi analisada após dessecação a 105°C/2 h, sendo após titulada com ácido perclórico 0,1 M. A determinação visual do ponto final da titulação com o uso dos indicadores cristal violeta e naftolbenzeína ocorre sempre após o ponto de inflexão na curva potenciométrica, quando realizada em ensaios concomitantes. Isto pode ser devido a uma diminuição da sensibilidade no deslocamento químico do indicador, em consequência da presença da água, a qual também funciona como uma base fraca, competindo pelo mesmo substrato.

O ACV pode se apresentar na forma solvatada, o que se confirmou através da análise térmica por DSC. A substância apresenta pico endotérmico entre 135 e 166°C, com máximo em 155,02 °C (Figura 3), indicando que nessas condições ocorre perda de massa, comprovada através dos valores encontrados na determinação de umidade pelo método de Karl-Fischer. Estes dados condizem com os trabalhos de Kristl et al.,⁷ que, além disso, evidenciaram a presença de polimorfismo em temperaturas acima de 170°C, como pode ser evidenciado nas Figuras 3 e 4, com máximos em 172,15 e 171,2°C, respectivamente. Segundo Kristl et al.,⁷ a forma anidra pode ser alcançada através da secagem em temperatura de 50°C por 140 min; entretanto, com a diminuição da temperatura, pode rapidamente reidratar-se em um intervalo de 2 minutos. A forma anidra estável é alcançada somente em temperaturas mais elevadas (acima de 150°C).

A forma solvatada é um hidrato, com umidade em torno de 6%, onde cada molécula de ACV apresenta 0,67 de uma molécula de água ligada em sua estrutura cristalina, ou seja, para cada três moléculas de ACV existem duas de água de solvatação.¹

O teor de pureza das amostras foi calculado utilizando a seguinte equação:

$$\text{mg de ACV} = V \times T \times \text{mEq},$$

onde: V = o volume de titulante consumido até a viragem do indicador; T = fator de correção da solução titulante e $\text{mEq} = 22,52$.

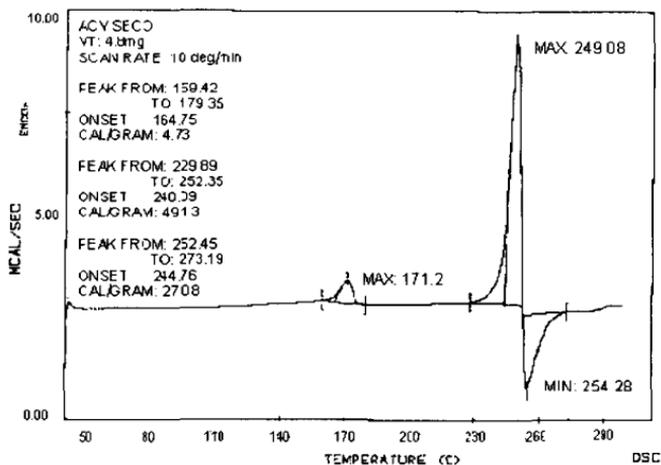


FIGURA 3 – Curva de DSC do ACV solvatado.

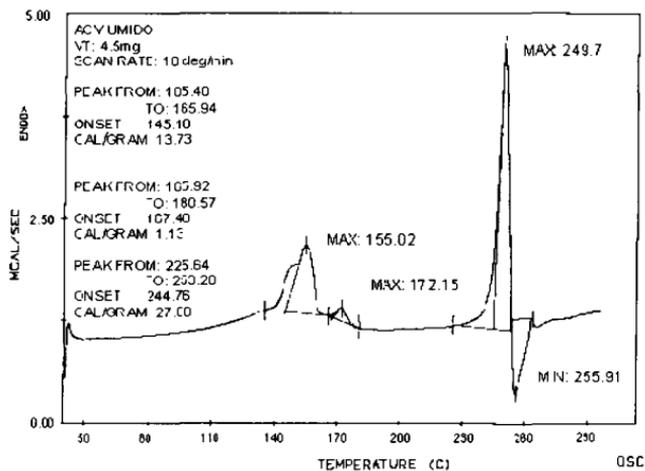


FIGURA 4 – Curva de DSC do ACV seco acima de 150°C.

Tabela 1 – Teores encontrados para ACV na determinação por volumetria em meio não-aquoso com ácido perclórico

Métodos	Potenciométrico (A)	Cristal violeta (C)	Naftolbenzeína (D)
ACV			
Média*	100,83	100,79	100,62
Desvio padrão	0,33	0,37	0,07
DPR%	0,33	0,36	0,07

n = 5 determinações para cada amostra

Tabela 2 – Análise de variância da amostra ACV, determinada com ácido perclórico

Fonte da variação	SQ	GL	MQ	F	Valor - P	F crítico
Entre grupos	0,12348	2	0,06174	0,72312	0,505222	3,88529
Erro	1,02456	12	0,08538			
Total	1,14804	14				

SQ = soma dos quadrados GL = graus de liberdade MQ = quadrado médio

Tabela 3 – Teores comparativos entre os diferentes métodos para ACV na determinação por volumetria em meio não-aquoso com ácido perclórico e KOH propanólico

	(A)	(B)	(C)	(D)	(E)
Média	100,83	101,14	100,79	100,62	100,37
Desvio padrão	0,33	0,13	0,37	0,07	0,43
DPR%	0,33	0,13	0,36	0,07	0,43

Tabela 4 – Análise de variância da análise quantitativa para o ACV

Fonte da variação	SQ	GL	MQ	F	Valor - P	F crítico
Entre grupos	1,599216	4	0,399804	4,324169	0,011084	2,866081
Erro	1,84916	20	0,092458			
Total	3,448376	24				

SQ = soma dos quadrados GL = graus de liberdade MQ = quadrado médio

Tabela 5 – Teste de Tukey para o ACV

		E	D	C	A
Método	(Xi)	(Xi) – 100,37	(Xi) – 100,62	(Xi) – 100,79	(Xi) – 100,83
B	101,14	0,77	0,52	0,35	0,31
A	100,83	0,46	0,21	0,04	
C	100,79	0,42	0,17		
D	100,62	0,25			
E	100,37				

$$\Delta_{5\%} = 0,58$$

A – método oficial (ácido perclórico, determinação potenciométrica)

B – ácido perclórico, determinação potenciométrica, anidrido acético

C – ácido perclórico, indicador cristal violeta

D – ácido perclórico, indicador naftolbenzeína

E – hidróxido de potássio propanólico, DMSO, indicador azovioleta.

Em dados experimentais verificou-se que a amostra submetida à secagem a 105°C, que é a temperatura mais comum em análise gravimétrica, também apresentou as mesmas características de reabsorção, como descreve o trabalho de Kristl et al.⁷ Após secagem, a amostra foi submetida a ambiente de umidade controlada (em torno de 80%), onde verificou-se que, em apenas 30 minutos, ambas as amostras, apresentaram reabsorção de água acima do teor determinado pelo método de Karl-Fischer antes da secagem.

No método B, apesar da água de solvatação presente ser eliminada pela adição de anidrido acético, a facilidade com que a amostra volta a absorver umidade interfere fisicamente no processo de doseamento, pois no momento da pesagem a amostra já não se encontra anidra. Este fato, ou seja, a reabsorção de água durante o preparo da amostra, pode ter sido responsável por resultados diferentes, obtidos na utilização das cinco técnicas propostas neste trabalho, também demonstrado pelo Teste de Tukey (Tabela 5), que indicou apenas os resultados da técnica B (método potenciométrico, com anidrido acético) diferente, em relação ao método E (volumetria com KOH propanólico). Os demais métodos não diferiram significativamente do método oficial (ácido perclórico, determinação potenciométrica), apresentando, portanto, exatidão. Além disso, são precisos, o que é evidenciado pelos baixos valores de desvio padrão relativo (Tabelas 1 e 3). Com isso, para assegurar a melhor exatidão no ensaio volumétrico, é necessária a secagem

prévia da matéria-prima entre 150 e 170°C durante 2 horas, garantindo a ausência total de água.

Conclusões

Métodos volumétricos, em sua maioria, apresentam grande eficiência na quantificação de fármacos por serem rápidos e precisos. O uso de diferentes solventes, com polaridades variadas e titulantes específicos, continua sendo, atualmente, um meio prático na análise de rotina de matérias-primas, sendo ainda exequível em farmácias, devido à simplicidade de execução e ao baixo custo.

A influência da água no meio não-aquoso pode ser um fator determinante na análise do ACV, pois as propriedades básicas desta podem provocar ligeira alteração no deslocamento químico de indicadores com alta sensibilidade em ácido acético. A análise de variância demonstrou ser possível a substituição do método oficial com determinação potenciométrica do ponto final da titulação por métodos com indicadores como, por exemplo, cristal violeta e naftolbenzeína, se o fármaco for considerado como base fraca e azovioleta na determinação como ácido fraco. É aconselhável a secagem prévia da matéria-prima a 160°C, pois a ausência de umidade na amostra favorece a determinação, com maior precisão, do ponto final da titulação no uso dos indicadores citados.

ALMEIDA, E. D.; PETZOLD, C. L.; ZANOTTO A. R.; BERGOLD, A. M. Assay of acyclovir by non-aqueous volumetry. *Rev. Ciênc. Farm.*, São Paulo, v.23, n.277-287, p.2002.

- **ABSTRACT:** *Non-aqueous assays of acyclovir bulk substance are compared with the official assay. The amphoteric properties of acyclovir (two pKa values) make it possible to titrate the substance as acid or as base by the use of indicators: crystal violet, naphtholbenzein or magneson. The bulk substance must be dried before the assay for at least 2 hours at 160°C. The obtained results support the conclusion that the evaluated methods are accurate and precise, representing an alternative for the official one.*
- **KEYWORDS:** *Acyclovir; non-aqueous titration; crystal violet; magneson.*

Referências bibliográficas

- 1 BIRNBAUM, G. I. et al. Structure and conformation of the potent antiherpes agent 9-(2-hydroxyethoxymethyl) guanine (acycloguanosine). *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, v.103, p.968-974, 1981.
- 2 BRITISH pharmacopoeia. London: The Stationary Office, 2002. v.1.
- 3 KOPPEL, I. et al. Comparison of Brønsted acidities of neutral NH-acids in gas phase, dimethyl sulfoxide and water. *Int. J. Mass Spectrometry Ion Proc.* v.175, p.61-69, 1998.
- 4 KOROLKOVAS, A. *Análise farmacêutica*. Rio de Janeiro: Guanabara Dois, 1984. p.120-127.
- 5 KOZJEK, F. et al. The effect of physicochemical properties of acyclovir and deoxiacyclovir on the in vitro diffusion. *Acta Pharm. Jugosl.*, v.38, p.61-69, 1988.
- 6 KRISTL, A. et al. The ionisation properties of acyclovir and deoxyacyclovir. *Int. J. Pharm.*, v.99, p.79-82, 1993.
- 7 KRISTL, A. et al. Polymorphism and pseudopolymorphism: influencing the dissolution properties of the guanine derivative acyclovir. *Int. J. Pharm.*, v.139, p.231-235, 1996.
- 8 PLASS, M.; KRISTL, A.; ABRAHAM, M. H. Spectroscopic investigation of the tautomeric equilibria in the guanine derivatives of acyclovir. *J. Chem. Soc. Perkin Transactions 2*, v.11, p.2641-2646, 1999.
- 9 PARFITT, K. (Ed.) *MARTINDALE: the extra pharmacopoeia*. 32.ed. London: Pharmaceutical Press, 1999, p.642-645.
- 10 SCHNEKENBURGER, J.; QUADE-HENKEL, M. Zur Titration sehr schwacher Säuren II. *Dtsch. Apoth. Ztg.*, v.124, n.23, p.1167-1170, 1984.
- 11 UNITED STATES PHARMACOPEIAL CONVENTION. *The United States Pharmacopoeia*. 25.ed. Rockville: 2002. p.47.

Recebido em 30.7.2002.