

VALIDACIÓN DE UN MÉTODO ANALÍTICO ESPECTROFOTOMÉTRICO PARA LA DETERMINACIÓN DE LEVOFLOXACINO

Autor: Ignacio Sánchez García

Tutora: Dra. María Magdalena Echezarreta López

Cotutora: Dra. María Isabel Soriano Torres

Ignacio Sánchez García

Índice

	Pág.
Abstract	2
Acrónimos	3
1.- Introducción	4
2.- Objetivo	5
3.- Materiales y Métodos	5
3.1.- Preparación de la disolución patrón y soluciones estándar	6
3.2.- Determinación de la longitud de onda de máxima absorción	6
3.3.- Validación del método	7
3.3.1.- Estudio de la linealidad e intervalo de concentraciones	7
3.3.2.- Especificidad	8
3.3.3.- Precisión.	8
3.3.4.- Exactitud	9
3.3.5.- Límite de detección y límite de cuantificación	9
3.3.6.- Análisis estadístico	10
4.- Resultados y Discusión	11
5.- Conclusiones	16
6.- Bibliografía	17

Abstract:

Levofloxacin (LFX) is an antibiotic drug used in many pathologies, including tuberculosis, and it is marketed in solid oral dosage forms such as tablets or capsules. Although the method of choice for estimating the amount of said active ingredient is high-performance liquid chromatography (HPLC), the development of alternative or parallel determination techniques, such as ultraviolet-visible (UV/VIS) spectrophotometry, are of great interest to reduce not only costs, but also the difficulty of quality control processes of the pharmaceutical specialties of this drug.

The present study takes as reference different works of validation and of analytical methods that use the aforementioned technique to the quantitative determination of LFX in acid solutions with HCl 0.1M as diluent by UV/VIS spectrophotometry. It was achieved a calibration curve that was statistically studied by an analysis of variance ANOVA, studies of precision, accuracy, and repeatability. This analysis technique followed the standards present in the guide ICH Q2(R1) of The International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use (ICH).

Results: UV/VIS spectrophotometry analysis at a wavelength of 294 nm exhibited a correlation coefficient of 0.9978 in a concentration range from 2.0 to 9.0 µg/mL. The equation of the regression curve was $y = 0.0864 * x$. The average recovery was 100.91%, while the coefficient of variation (CV) remained at 0.16%. The limit of detection and limit of quantitation were 0.539 and 1.634 µg/mL, respectively. It was concluded that the developed method is suitable for the quality control of levofloxacin and it is fast, simple with high precision and accuracy.

Keywords:

Quinolones, levofloxacin, ultraviolet-visible spectrophotometry method, quality control, validation.

Acrónimos

FF	Forma farmacéutica
HCl	Ácido clorhídrico
HPLC	Cromatografía líquida de alta resolución
ICH	The International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use; Conferencia Internacional sobre armonización de requisitos técnicos para el registro de productos farmacéuticos para uso humano
LFX	Levofloxacino
PA	Principio activo
UV/VIS	Ultravioleta-Visible
USP	United States Pharmacopeia; Farmacopea de los Estados Unidos

1.- Introducción

Entre los antibacterianos utilizados en la lucha contra *Mycobacterium tuberculosis*, el Levofloxacin (LFX) se considera un fármaco de sustitución de los antituberculosos de primera y segunda línea, como coadyuvante de terapia conjunta en tuberculosis resistentes a varios fármacos o en pacientes con síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA). LFX pertenece al grupo de antibióticos de las quinolonas, siendo un análogo sintético del ácido nalidíxico, de tercera generación y correspondiente al subgrupo de las fluorquinolonas. Este subgrupo está modificado con un átomo de flúor y un radical piperacínil, que confiere al compuesto un amplio espectro frente a bacterias gramnegativas y grampositivas.

Su mecanismo de acción consiste en la unión y posterior inhibición de las enzimas ADN-girasa (topoisomerasa II) y encargada del enrollamiento del ADN bacteriano y bloquea las subunidades que la componen. Esta inhibición impide la reparación de las incisiones durante la replicación, reparación y recombinación del ADN y ejerce un efecto bactericida en poblaciones bacterianas [1].

En la actualidad, la Farmacopea de Estados Unidos (USP) recomienda que la caracterización del LFX y otras quinolonas en formas farmacéuticas sólidas se lleve a cabo mediante un estudio analítico por Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC) [2-6]. Este hecho puede derivar en un problema para muchos laboratorios del tercer mundo y países en desarrollo, pues el coste de los sistemas cromatográficos es muy alto y requieren de personal especializado.

Los controles de calidad de las formulaciones farmacéuticas durante su desarrollo y su comercialización es un proceso que permite identificar anomalías o deficiencias del medicamento durante su periodo de utilización. Es importante, por ello, que los laboratorios responsables de realizar estos controles dispongan de técnicas analíticas asequibles y que sean precisas, robustas y reproducibles [7].

En base a lo expuesto, consideramos necesaria la validación de un método de análisis de LFX en formas farmacéuticas sólidas, de menor coste y dificultad que el de HPLC, esto es, un análisis mediante espectrofotometría UV/vis que permita su determinación precisa y exacta. Con el fin de mantener la mayor similitud entre ambas técnicas, este trabajo

plantea desarrollar un método de análisis en el laboratorio en base a las normas de validación de LFX en comprimidos según los métodos recogidos en la USP y siguiendo las indicaciones de las normas ICH [7].

2.- Objetivo

El presente trabajo tiene como finalidad desarrollar y validar un método de cuantificación de LFX mediante espectroscopia de UV/VIS que permita realizar controles de calidad de medicamentos de este fármaco en paralelo o como alternativa a la técnica de HPLC.

3.- Materiales y Métodos

Para el desarrollo del método espectrofotométrico se empleó LFX (lote: V009) cedido por Laboratorios Cinfa (Navarra, España), HCl 1M (1N) (Reag. Ph. Eur. Lote SZBG081AV) de Fluka Analytical, (San Galo, Suiza) y agua MilliQ de un sistema Millipore (Water, USA). Las disoluciones patrón y estándar se prepararon con los siguientes materiales de laboratorio: matraces aforados de 10, 100 y 250 mL, balanza de precisión (Mettler Toledo modelo AG285, España), micropipetas de 100 y 1000 μ L y pipetas Pasteur.

El espectrofotómetro UV/VIS utilizado es un modelo Ultrospec 3300 Pro de Amersham Laboratories (Amersham, Buckinghamshire, Reino Unido).

La determinación de la concentración de LFX en disolución se realiza siguiendo el trabajo desarrollado por Desai *et al.* (2011) [9] y teniendo en cuenta la validación de otros grupos [10-14]. La validación del método mediante el proceso estadístico necesario se realizará siguiendo las normas presentes en la guía ICH [7].

La monografía de la USP recomienda la utilización de una disolución ácida de HCl 0,1M para disolver el LFX, debido a la formación de la sal que aumenta la solubilidad del

fármaco, antes de proceder a su estudio por espectrofotometría [2]. Por lo tanto, se realizará una lectura directa de LFX puro disuelto en un medio ácido.

3.1.- PREPARACIÓN DE LA DISOLUCIÓN PATRÓN Y LAS DISOLUCIONES ESTÁNDAR

Con el fin de preparar una disolución patrón de 0,5 mg/mL de LFX, se pesaron 5 mg de LFX puro en una balanza de precisión, se llevó a un matraz aforado de 10 mL y se disolvió en una disolución de HCl 0,1 M. A continuación, se completó el volumen.

A partir de la disolución patrón se prepararon 9 disoluciones estándar. Para ello, se tomaron alícuotas de la disolución comprendidas entre 0,04 y 0,18 mL y se llevaron a matraces aforados de 10 mL y se enrasaron con la disolución HCl 0,1M anterior.

Las concentraciones finales de LFX de 2, 2,5, 3,5, 4,5, 5,5, 6,5, 7,5, 8,5 y 9 µg/mL fueron analizadas directamente en un espectrofotómetro UV/VIS.

Tanto la disolución patrón como las disoluciones estándar se mantuvieron protegidas de la luz durante todo el proceso.

3.2.- DETERMINACIÓN DE LA LONGITUD DE ONDA DE MÁXIMA ABSORCIÓN

Aunque las monografías de la USP indican una absorción máxima con UV/VIS y HPLC-UV/VIS para el LFX analizado en comprimidos de 280, 294, 320 y 360 nm, la mayoría de los estudios publicados emplean el intervalo comprendido entre 289 y 294 nm [5][9-12].

Con el fin de verificar estos datos en el laboratorio, se extrajeron tres alícuotas de la disolución patrón de LFX que se diluyeron con HCl 0,1M en matraces aforados, para obtener tres concentraciones estándar de 5 µg/mL. Con cada una de ellas se realizó un barrido en longitudes de onda comprendidas entre 200 y 800 nm y se determinó el pico de máxima absorbancia de LFX en este medio.

3.3.- VALIDACIÓN DEL MÉTODO:

Para la validación del método propuesto se ha seguido la guía ICH Q2 (R1), Validación de los Procedimientos Analíticos [7], que incluye todos los pasos a seguir en el laboratorio con el fin de comprobar si el análisis cumple las especificaciones necesarias para la confirmación del cumplimiento estadístico. Para ello se analizaron nueve concentraciones distintas cuatro veces cada una (N=36).

Los parámetros de validación con respecto a la guía ICH determinados fueron los siguientes:

3.3.1.- ESTUDIOS DE LINEALIDAD E INTERVALO DE CONCENTRACIONES

La linealidad indica la capacidad del método para mostrar resultados directamente proporcionales a la concentración de LFX del medio a analizar.

El intervalo de concentraciones es el intervalo definido por los niveles inferior y superior de analito, para el que se demuestra que el procedimiento es adecuado con la precisión, exactitud y linealidad declarada en el procedimiento descrito.

Para comprobar la linealidad, a partir de la disolución patrón se prepararon 9 disoluciones estándar de LFX comprendidas entre 2,0 y 9,0 $\mu\text{g/mL}$ y se procedió a su posterior análisis mediante espectrofotometría UV/VIS.

Debe representarse gráficamente la señal en función de la concentración del analito. Si se observa relación lineal ésta debe evaluarse utilizando métodos estadísticos adecuados, como el cálculo de la recta de regresión por el método de mínimos cuadrados y verificarse empleando el análisis de la varianza (ANOVA) de la regresión lineal, que incorpora los diferentes orígenes de variación que puedan afectar a las observaciones experimentales.

Con el fin de analizar este parámetro, se plantearon las siguientes tres hipótesis nulas:

- $H_0: b_0 = 0$ La recta de calibrado pasa por el origen de coordenadas.
- $H_0: b_1 = 0$ La variable “y” (absorbancia), no depende de la variable “x” (concentración).
- $H_0: D.L. = 0$ No existe desviación de la linealidad y el modelo lineal es correcto.

Por lo tanto, el intervalo de concentraciones se estableció confirmando que el método analítico presenta una linealidad, precisión y exactitud aceptables cuando se aplica a muestras con concentración del analito dentro del intervalo especificado.

3.3.2.- ESPECIFICIDAD

La especificidad del método se traduce como la capacidad del espectrofotómetro UV/VIS para discernir la absorbancia del LFX en una disolución de HCl 0,1M sin interferencia de posibles excipientes, productos de degradación o impurezas.

Aunque al utilizar LFX puro en disolución no se esperaba interferencias de ningún tipo, este hecho se comprueba comparando la medida de un blanco de HCl 0,1M, a la longitud de onda de máxima absorción de LFX y las medidas de las distintas concentraciones estándar, las cuales no deben ser modificadas por el disolvente.

3.3.3.- PRECISIÓN.

La guía ICH define la precisión como la similitud entre los resultados en una serie de medidas tomadas de múltiples muestras de la misma disolución estándar homogénea. Se determinó comparando los resultados de las mismas disoluciones varias veces en un mismo día, *intra-day* (en inglés), con el fin de comprobar la precisión del método de estudio y que no existen errores aleatorios o errores sistemáticos en el proceso.

La norma ICH establece que una desviación estándar relativa (C.V.) superior al 1% indica que existen errores sistemáticos en el desarrollo del experimento mientras que inferior al 1% se considera un método preciso.

Para ello, a partir de la dilución con HCl 0,1M de una disolución patrón de concentración 0,5 mg/mL, se preparó una disolución estándar de 3,7 µg/mL y se midió la absorbancia seis veces en las mismas condiciones de operario, reactivos y espectrofotómetro con el fin de comprobar la variabilidad entre mediciones, analizando la precisión del método.

3.3.4.- EXACTITUD

La exactitud define la concordancia del resultado experimental a los valores esperados y aceptados como referencia. Los resultados se expresan como el porcentaje de recuperación (R) o como la diferencia entre el valor medio y el valor aceptado junto con los límites de confianza. El valor de R_{medio} (%) deben de encontrarse entre 97 – 103% para demostrar que se trata de un método exacto.

La exactitud del método se realizó mediante una nueva disolución patrón de LFX con una concentración inicial de 0,5 mg/mL, tomando alícuotas de 0,7, 0,11 y 0,15 mL y completando el volumen hasta los 10 mL para obtener concentraciones de 3,5, 5,5 y 7,5 $\mu\text{g/mL}$ respectivamente y midiendo sus absorbancias a la longitud de máxima absorción. El proceso se realizó por triplicado para obtener tres mediciones para cada una de las concentraciones estándares.

A partir de dichos datos se realizaron los cálculos de los porcentajes de recuperación individuales y la media resultante de todos estos valores.

3.3.5.- LÍMITE DE DETECCIÓN Y LÍMITE DE CUANTIFICACIÓN

La guía ICH indica que el límite de detección, LD, es la cantidad mínima de analito que puede ser detectado en una muestra sin necesidad de ser cuantificado en contraposición con el límite de cuantificación, LC, en el que el analito sí que llega a ser determinado cuantitativamente con precisión y exactitud aceptables.

Para su determinación se utilizan las siguientes ecuaciones:

$$LD = 3,3 \cdot DE/b_1$$

$$LC = 10 \cdot DE/b_1$$

siendo DE la desviación estándar de la raíz del Cuadrado Medio del residual y b_1 la pendiente de la recta de calibración.

3.3.6.- ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los datos obtenidos de los estudios realizados se analizaron estadísticamente utilizando los programas Microsoft® Excel® y SPSS® Software v. 25 con el fin de validar el método demostrando la conformidad con las indicaciones de la guía ICH.

4.- Resultados y Discusión

El barrido inicial entre 200 y 800 nm indicó una absorción máxima a la longitud de onda de 294 nm, que fue la utilizada en la realización de los distintos estudios.

Antes de iniciar la metodología de la ICH, se realizó un estudio preliminar para delimitar el intervalo de concentraciones de LFX donde se cumple la linealidad del método. Se observó que las absorbancias donde se cumple la Ley de Lambert-Beer están comprendidas en el intervalo de concentraciones estándar de LFX entre 2,0 y 9,0 µg/mL.

Los resultados de los cálculos estadísticos obtenidos con el total de las 36 medidas realizadas fueron representados obteniéndose que la recta de calibración muestra una linealidad entre 2,0 y 9,0 µg/mL, y está definida por la ecuación $y = 0,006 + 0,0855x$ con un coeficiente de correlación de 0,9956, tal y como se muestra en la Figura 1.

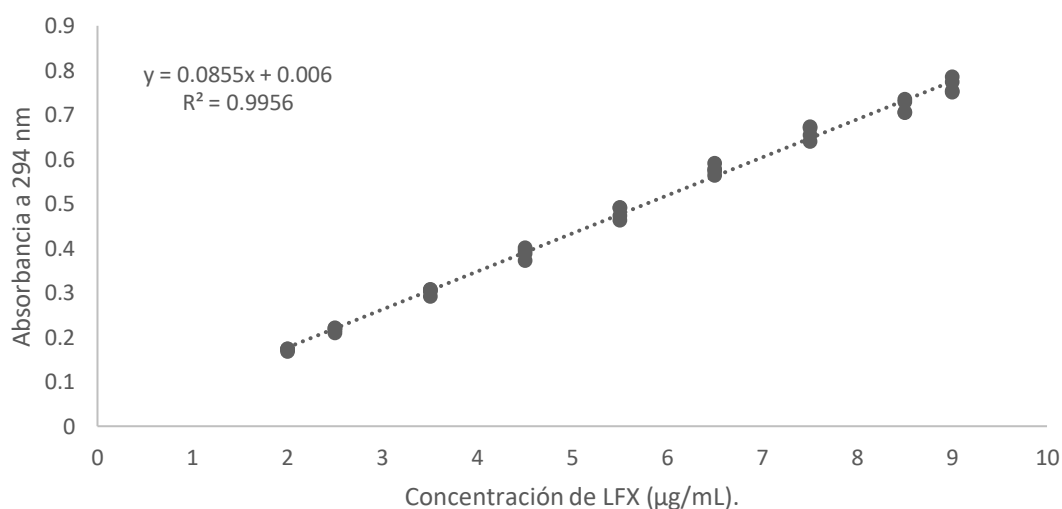


Figura 1: Recta de regresión lineal comprendida en el intervalo de concentraciones entre 2 y 9 µg/mL.

Como ya hemos comentado, la técnica estadística utilizada para la evaluación del método ha sido el Análisis de la Varianza (ANOVA) de la regresión lineal, que incorpora los distintos orígenes de variación o factores que presumiblemente van a afectar a las

observaciones experimentales. En la Tabla 1 se recogen los resultados obtenidos de dicho análisis.

OV	SC	GL	CM	FC
<i>Total</i>	1,54048	35		
<i>Regresión</i>	1,533699344	1	1,533699344	7690,3736
<i>Residual</i>	0,006780656	34	0,000199431	
<i>D.L.</i>	0,002873656	7	0,000410522	2,83698529
<i>Error Puro</i>	0,003907	27	0,000144704	

Tabla 1: Análisis de la regresión lineal (ANOVA). OV: origen de variación; SC: Suma de cuadrados; GL: grados de libertad; CM: cuadrados medios; FC: F calculadas; D.L.: Desviación de la linealidad.

Para verificar la primera hipótesis nula, $H_0: b_0 = 0$, se utilizó el estadístico t-Student; que se determina a partir de la siguiente expresión:

$$t_{calculada} = \frac{b_0}{\left[s^2 * \frac{\sum x^2}{N \left(\sum x^2 - \frac{(\sum x)^2}{N} \right)} \right]^{1/2}}$$

Siendo N el número de observaciones realizadas durante todo el experimento, s^2 , el cuadrado medio del residual; y x el valor de las concentraciones observadas. El valor obtenido fue de 1,02029.

La $t_{calculada}$ se comparó con los percentiles de la distribución t-Student, ($t_{tabulada}$, con $N-2$ grados de libertad y $\alpha=0,05$), que para 34 grados de libertad y un nivel de significación α , de 0,05 para una prueba bilateral, su valor es de 2,0322. Como la $t_{calculada} < t_{tabulada}$ se acepta la hipótesis nula, teniendo que reestimar la pendiente de la recta e indicando que la recta pasa por el origen de las coordenadas (0,0).

Para reestimar la pendiente, se utilizó la siguiente ecuación:

$$b_1 = \frac{\sum x * y}{\sum x^2}$$

Siendo “y” las absorbancias observadas.

Así pues, la recta se definió mediante la ecuación: $y = 0,0864 * x$

La verificación de la segunda hipótesis nula, $H_0: b_1 = 0$, se realiza mediante la distribución F de Snedecor con 1 y 34 grados de libertad y un nivel de significación α de 0,05. Como la $F_{calculada}$ (7690,373) es mayor que la $F_{tabulada}$ (4,13), se rechaza la H_0 planteada y se confirma que la variable “y” depende de la variable “x” siendo, por tanto, la pendiente distinta de cero.

Para la verificación de la tercera hipótesis nula, $H_0: D.L. = 0$, se utilizó también el estadístico F de Snedecor de los cuadrados medios de la variación existente entre la desviación de la linealidad y el error puro. El valor resultante fue de 2,8369, frente al estadístico tabulado igual a 2,373 con 7 y 27 en el denominador y un nivel de significación α , de 0,05. Como la $F_{calculada}$ es mayor que la $F_{tabulada}$, se rechaza la H_0 planteada por lo que existe desviación de la linealidad. Esto puede ser debido a que la varianza debido al error puro es muy pequeña.

El análisis de la precisión muestra un coeficiente de 0,16% en la disolución de 3,7 $\mu\text{g/mL}$, con un valor de desviación estándar de 0,0005164 de los valores observados incluidos en la Tabla 2. Como el $CV < 1\%$, se considera que el método es preciso.

Repetición	1	2	3	4	5	6
Absorbancia a 294 nm	0,323	0,323	0,323	0,323	0,324	0,324

Tabla 2: Cálculo de la precisión según las normas ICH.

La exactitud medida como porcentaje de recuperación medio fue de 100,91% en las nueve disoluciones estudiadas (tabla 3). Como el valor de R_{media} (%) se encuentra entre 97 – 103 %, indica que el método es exacto. Además, sólo uno de los resultados de porcentaje de recuperación individual se encontró por encima del límite superior del 103%. Los porcentajes de recuperación se indican en la Tabla 3.

Concentración teórica ($\mu\text{g/mL}$)	Concentración experimental ($\mu\text{g/mL}$)	Porcentaje de recuperación individual (R, %).	Porcentaje de recuperación media (R_{media} , %).
3,50	3,554	101,56	100,91
3,50	3,566	101,88	
3,50	3,519	100,56	
5,50	5,673	103,15	
5,50	5,488	99,78	
5,50	5,372	97,67	
7,50	7,421	98,95	
7,50	7,769	103,58	
7,50	7,583	101,11	

Tabla 3: Porcentajes de recuperación en el estudio de exactitud de LFX.

El Límite de Detección (LD) es de $0,539 \mu\text{g/mL}$ y el Límite de Cuantificación (LC) es de $1,634 \mu\text{g/mL}$ con un valor de la desviación estándar de los residuales y una pendiente de $0,01412$ y $0,0864$, respectivamente. El LC coincide con los estudios preliminares que indicaba una pérdida de linealidad para concentraciones menores a $1,5 \mu\text{g/mL}$ (resultados no mostrados).

En la tabla 4 se muestra un resumen de los parámetros de linealidad y los datos de validación.

Parámetro	Resultado
Absorbancia máxima	294 nm
Intervalo de linealidad de la ley de Beer	$2,0 - 9,0 \mu\text{g/mL}$
Ecuación de la recta de regresión	$y = 0,0864 * x$
Coefficiente de correlación	0,99779
N	36
Porcentaje de recuperación media (%)	100,91
C.V. (%)	0,16
Límite de Detección ($\mu\text{g/mL}$)	0,539
Límite de Cuantificación ($\mu\text{g/mL}$)	1,634

Tabla 4: Datos de los parámetros de linealidad y estudios estadísticos del método.

Los resultados demuestran que el método es eficaz para la caracterización del LFX y se obtuvieron unos valores muy parecidos con el procedimiento que utilizamos como referencia de Desai *et al.* (2011) [9].

La longitud de onda de máxima absorción fue diferente en nuestra experiencia respecto a los de otros estudios publicados, siendo la que nosotros determinamos 294 nm, la que coincide con la que establece la USP [2]; lo que no sucede con Desai *et al.* (2011), que señalan 290 nm [9], Kassab *et al.* (2010), 298 nm [10] y Wang *et al.* (2019) 288 nm. [5]. Únicamente el artículo publicado por Devi *et al.* (2009) utilizó 294 nm como nosotros [4].

Se podría deducir que la longitud de onda de máxima absorción dependerá de las condiciones experimentales (medio de disolución), el equipo instrumental y la respuesta de los distintos espectrofotómetros UV/VIS en los diferentes laboratorios (en el rango de 288 y 294 nm).

El intervalo de concentraciones en las que se cumplía la linealidad en nuestra experiencia de laboratorio ha sido diferente al propuesto por otros autores: Desai *et al.* (2011), lo ampliaron de 0,25 a 12,0 µg/mL [9] y Kassab *et al.* (2010) lo redujeron hasta concentraciones entre 3,0 y 8,0 µg/mL [10].

Desai *et al.* (2011) demostraron que su método era válido analizando dos medicamentos de LFX en comprimidos, mostrando un resultado óptimo de repetitividad y precisión en los datos. Estos autores indican que existe la posibilidad de encontrar en las muestras, mediante el análisis, diferentes compuestos de degradación que no es posible identificar y separar dando lugar a una modificación en las respuestas a una longitud de onda de 290 nm [9].

Kassab *et al.* (2010), a su vez, hace lo mismo con comprimidos y formulaciones inyectables de LFX, con un medio alcohólico (metanol) utilizado para la calibración y concluye con resultados de precisión y repetitividad óptimos [10].

El trabajo de Wang *et al.* (2019) arroja que, en FF de liberación prolongada en microesferas de sílice, existe una potenciación de la absorbancia, que presuponen debida a los excipientes y la degradación de la estructura esférica. Esto no pone en duda la validez del método, pues hace hincapié en que utilizando patrones estándar de LFX durante los

estudios de precisión y exactitud sin mediación de estas impurezas de la FF, las absorbancias en UV resultan más exactas [5].

Asimismo, Akthar *et al.* (2013) y Bano *et al.* (2013) concluyen además que el método de espectrofotometría UV/VIS permite llevar a cabo estudios de disolución y disgregación comparativos entre medicamentos innovadores y genéricos para comprobar que se cumplen las especificaciones recogidas por diferentes normas existentes. Sin embargo, ambos grupos de investigación han desarrollado distintos estudios comparativos para FF sólidas de LFX, actualmente en venta en el mercado de Pakistán, sin una validación previa del método y basándose en la información recogida en la Farmacopea Británica, sobre el análisis de dicho PA mediante espectrofotometría UV/VIS y utilizando medios de diferentes pH para su disolución [13][14].

5.- Conclusiones

El método propuesto de análisis de LFX mediante espectrofotometría UV/VIS ha resultado ser un método simple, rápido y sencillo para valorar las concentraciones de este principio activo en disolución, siendo posible realizar su análisis sin necesidad de previa especialización.

El método propuesto es preciso y exacto por lo que puede ser considerado adecuado para realizar más estudios del cumplimiento de las especificaciones en comprimidos de LFX.

Esta metodología alternativa ha demostrado ser tan eficaz como el HPLC, utilizado en la actualidad, lo que facilitaría en gran medida las posteriores mediciones de laboratorios, que encontrarían en la espectrofotometría UV/VIS una solución sencilla, rápida y menos costosa para los controles de calidad de las FF de LFX presentes en el mercado.

6.- Bibliografía

1. Lorenzo P., Aleixandre A, Sulfamidas y trimetoprima. *Quinolonas*. En Velázquez, B. *Farmacología Básica y Clínica*. 18ª ed., Buenos Aires, Madrid. Panamericana, 2017, pp. 857 - 872, 879.
2. *The United States Pharmacopeia. The National Formulary*. Rockville, Md.: United States Pharmacopeial Convention, Inc., 2000.
3. Czyski, Andrzej. *Analytical Methods for Determining Third and Fourth Generation Fluoroquinolones: A Review*. *Chromatographia*, 2017; vol. 80,2: 181-200.
4. Devi, M. Lalitha, K. B. Chandrasekhar. *A validated stability-indicating RP-HPLC method for levofloxacin in the presence of degradation products, its process related impurities and identification of oxidative degradant.*, *Journal of pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 2009; 50.5: 710-717.
5. Wang, Qi, Wang, G., Xie, S., Zhao, X., Zhang, Y. *Comparison of high-performance liquid chromatography and ultraviolet-visible spectrophotometry to determine the best method to assess Levofloxacin released from mesoporous silica microspheres/nano-hydroxyapatite composite scaffolds*. *Experimental and therapeutic medicine*, 2019; 17.4: 2694-2702.
6. Sedova, MK, Sergeeva MS, Dudenkova, ME, Gaevaya LM, Grushevskaya LN, Avdyunina NI et al. *Analysis and Standardization of Levofloxacin Substance*. *Pharm Chem*, 2014; J 47, 620–626.
7. *Guideline, ICH Harmonised Tripartite. Validation of analytical procedures: text and methodology Q2 (R1)*, International conference on harmonization, Geneva, Switzerland. 2005; Vol. 11.
8. O. Munguía, A. Santoveña. *Protocolo de prácticas de la asignatura de Tecnología Farmacéutica I, Grado en Farmacia*. Universidad de La Laguna. Curso 2016-2017.
9. Desai VN, Ozadheoghene O, Dagunduro BO, Okinkwo TJ, Ndu CC. *A Simple UV Spectrophotometric Method for the Determination of Levofloxacin in Dosage Formulations*, *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*, 2011; vol. 10, no. 1, pp. 75-79.

10. Kassab NM, do Amaral MS, Singh AK, Santoro MIRM. *Development and validation of UV spectrophotometric method for determination of levofloxacin in pharmaceutical dosage forms. Quím. Nova, São Paulo, 2010; v. 33, n. 4, p. 968-971.*
11. Matos AC, Pinto RV, Bettencourt AF. *Easy-Assessment of Levofloxacin and Minocycline in Relevant Biomimetic Media by HPLC–UV Analysis, Journal of Chromatographic Science, 2017; Volume 55, Issue 7, 757–765.*
12. Maleque M, Hasan MR, 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. J Pharm Anal., 2012, 2(6):454-457.*
13. Akhtar M., Malik A, Bashir S, Baig MF, Irshad N. *Pharmaceutical evaluation of different brands of Levofloxacin tablets (500 mg) available in Pakistan, International Journal of Current Pharmaceutical Research, 2013; Vol 5, Issue 1.*
14. Bano R, Gauhar S, Shyum Naqvi SB, Mahmood S. *Pharmaceutical evaluation of different Brands of Levofloxacin tablets (250 mg) available in local market of Karachi, Pakistan. International Journal of Current Pharmaceutical Research, 2013; Vol. 3, Issue 1.*