

QUANTIFICAÇÃO INDIRETA DE LEVOTIROXINA EM MEDICAMENTO ATRAVÉS DA DETERMINAÇÃO DE IODO POR ELETRODO ÍON SELETIVO APÓS DECOMPOSIÇÃO POR COMBUSTÃO INICIADA POR MICRO-ONDAS

**ALESSANDRA CORTES TEOTONIO¹; VANIZE CALDEIRA DA COSTA¹; DIOGO
LA ROSA NOVO¹; GILBERTO DA SILVA COELHO JUNIOR¹; MARCELO
GUERREIRO CRIZEL¹; MARCIA FOSTER MESKO¹**

¹*Centro de Ciências Químicas, Farmacêuticas e de Alimentos, Universidade Federal de Pelotas – alessandra.cortes@hotmail.com; marciamesko@yahoo.com.br*

1. INTRODUÇÃO

A levotiroxina (L-T4) é um hormônio sintético utilizado em pacientes com deficiência dos hormônios tireoidianos (tiroxina e/ou triiodotironina) (GILMAN *et al.*, 2005). A reposição destes hormônios é extremamente importante visto que a deficiência da tiroxina e da triiodotironina está associada à desordem conhecida como hipotireoidismo (COSTANZO, 2007; NOGUEIRA *et al.*, 2011). Contudo, é importante salientar que a dosagem de reposição da L-T4 é realizada na ordem de microgramas, tornando-se indispensável o controle de qualidade do medicamento, visto que o hormônio não apresenta efeito satisfatório em dose insuficiente e, em dose elevada, pode levar à efeitos tóxicos (ANVISA, 2015).

Dessa forma, métodos para dosar a L-T4 são encontrados em compêndios oficiais, como a Farmacopeia Americana, Britânica e Internacional. Entretanto, esses métodos envolvem o uso de técnicas de determinação com instrumentação de elevado custo, como a cromatografia líquida, ou ainda um preparo de amostra com baixa frequência de análise e que, geralmente, permitem a decomposição de uma massa de amostra reduzida, como o frasco de combustão de Schöniger. Ademais, nesses métodos oficiais, o preparo das amostras pelo frasco de combustão de Schöniger encontra-se associado a técnicas de determinação pouco sensíveis, como a volumetria, que por sua vez contribui para a obtenção de elevados limites de detecção (LOD), o que dificulta a avaliação de concentrações baixas (USP, 2000; FARMACOPEIA BRITÂNICA, 2001).

Neste sentido, uma alternativa aos métodos oficiais para decomposição de amostras de medicamentos com vistas à quantificação indireta do fármaco L-T4 através da determinação de I é a combustão iniciada por micro-ondas (MIC) (FARMACOPEIA BRASILEIRA, 2010). Na MIC, devido a pressurização do sistema com O₂, é possível a decomposição de massas de amostras superiores as comumente decompostas pelo frasco de combustão de Schöniger. Além disso, a MIC trata-se de um método que possibilita elevada frequência de análise e, assim como, o frasco de combustão de Schöniger, permite o uso de reagentes adequados aos analitos e a técnica de determinação utilizada (MAGALHÃES, 2010; NOGUEIRA, 2010; FARMACOPEIA BRASILEIRA, 2010).

Quanto à determinação de I⁻, cabe salientar que esta pode ser realizada por diversas técnicas, como a cromatografia de íons (IC), a volumetria, a potenciometria com eletrodo íon seletivo (ISE) e a espectrometria de massa com plasma indutivamente acoplado (ICP-MS). Dentre estas técnicas, a ISE apresenta como principal vantagem o fato de possuir uma instrumentação e manutenção de baixo custo. Todavia, trata-se de uma técnica suscetível a interferentes, assim, fazem-se necessários mais estudos que avaliem o seu potencial para a determinação de I, viabilizando seu uso em análises de rotina (HOLLER, 2009 e HANNA, 2015). Assim, esse trabalho teve como objetivo o desenvolvimento de

um método para a quantificação indireta do fármaco L-T4 através da determinação de I⁻ por ISE após a decomposição do medicamento por MIC.

2. METODOLOGIA

Os medicamentos contendo L-T4 (50, 100 e 150 µg/comp) foram adquiridos no comércio local de Pelotas – RS. Dentre as amostras, o medicamento com 100 µg/comp de L-T4 foi selecionado para a otimização do método.

Para a introdução das amostras no sistema de combustão, estas foram cominuídas com o auxílio de um gral e um pistilo, pesadas (100 a 900 mg) e envolvidas com filmes de polietileno. Após o fechamento dos invólucros, estes foram selados por aquecimento e dispostos na base dos suportes de quartzo contendo um papel filtro umedecido com 50 µl de NH₄NO₃ 6 mol l⁻¹. Em seguida, os suportes foram inseridos em frascos de quartzo contendo 6 ml de solução absorvedora (água, (NH₄)₂CO₃ 50 ou 100 mmol l⁻¹), os quais foram, posteriormente, fechados, fixados ao rotor, pressurizados com 20 bar de O₂ e inseridos no forno micro-ondas. O programa de irradiação com micro-ondas utilizado foi: i) 1400 W por 5 min e ii) 0 W por 20 min (etapa de resfriamento), conforme trabalhos prévios relatados na literatura (MESKO, 2010; HARTWIG, 2011). Após a decomposição das amostras, as soluções obtidas foram avolumadas a 25 ml e, posteriormente, analisadas por ISE. Para a comparação de resultados, algumas amostras também foram analisadas por IC.

Para a avaliação da solução mais adequada para a absorção de I⁻, bem como para a avaliação da exatidão do método proposto, foram realizados ensaios de recuperação. Para tanto, foi feita a adição de 50 µl de uma solução de iodeto de potássio (I⁻ de 2400 mg l⁻¹) ou de 100 µl de uma solução contendo 1875 mg l⁻¹ de L-T4 em 400 mg de amostra, previamente, ao fechamento dos invólucros.

Após a avaliação de todos os parâmetros do método, as melhores condições foram aplicadas para a decomposição de medicamentos com outras concentrações de L-T4 (50 ou 150 µg/comp), para a subsequente determinação de I⁻ por ISE e, quantificação indireta do fármaco. Neste contexto, cabe salientar que a concentração de L-T4 nas amostras analisadas foi obtida a partir de cálculos que relacionaram as concentrações de I⁻ obtidas com o teor de I na molécula do fármaco, bem como com a massa molecular da L-T4.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Inicialmente, foi realizada a avaliação da massa a ser decomposta pela MIC. Para tanto, massas de amostra de 100 a 900 mg foram submetidas ao processo de decomposição. Nesse estudo, foi observado que a massa máxima de medicamento que pode ser eficientemente decomposta pela MIC é 800 mg. Apesar disso, optou-se por utilizar 400 mg de amostra, visto que a concentração de iodo no fármaco é relativamente elevada (63,5% da massa total), e o LOD obtido para L-T4 (< 11,25 µg/comp) foi pelo menos cinco vezes menor que as concentrações determinadas neste estudo.

Posteriormente, foi avaliada a solução absorvedora (água, (NH₄)₂CO₃ 50 ou 100 mmol l⁻¹) mais adequada para a retenção de iodo durante a decomposição do medicamento por MIC. Na Tabela 1 são apresentadas as concentrações de I⁻ e de L-T4 obtidas após a decomposição do medicamento (400 mg) contendo 100 µg/comp de L-T4 por MIC, utilizando as soluções absorvedoras avaliadas e, determinação de I⁻ por ISE.

Tabela 1. Concentrações de I e L-T4 obtidas para o medicamento (100 µg/comp) após decomposição por MIC, utilizando as soluções absorvedoras variadas e, determinação de I⁻ por ISE (n = 3).

Solução absorvedora	I (µg/comp*)	L-T4 (µg/comp*)
H ₂ O	12,2 ± 0,4	19,1 ± 0,6
(NH ₄) ₂ CO ₃ 50 mmol l ⁻¹	58,5 ± 1,6	91,3 ± 2,6
(NH ₄) ₂ CO ₃ 100 mmol l ⁻¹	56,7 ± 3,1	88,7 ± 4,9

Os resultados obtidos para L-T4 utilizando (NH₄)₂CO₃ 50 ou 100 mmol l⁻¹ apresentaram concordâncias superiores à 88% com o valor informado pelo fabricante. Todavia, quando a água foi utilizada como solução absorvedora a concordância com o valor informado pelo fabricante foi menor que 20%. Provavelmente, esse comportamento se deve a perda do iodo pela formação de espécies (HI e I₂) voláteis em meios ácidos (NÓBREGA, 2006), visto que o pH da solução obtida após a MIC nesta condição foi 2,8.

Ainda com o propósito de avaliar a solução absorvedora mais adequada para a retenção de iodo, bem como a exatidão do método, foram realizados ensaios de recuperação através da adição de 50 µl de uma solução padrão de I⁻ (2400 mg l⁻¹) em 400 mg de amostra, previamente a decomposição por MIC. As recuperações obtidas para todas as soluções variaram de 94 a 100%, todavia, a recuperação obtida quando utilizada a água como solução absorvedora (98%) não condiz com os resultados obtidos para os estudos iniciais. Possivelmente, isso esteja associado ao iodo estar na forma de sal inorgânico quando comparado a forma com que está ligado na levotiroxina.

Assim, com o intuito de avaliar de forma mais efetiva o processo que ocorre com o I durante a combustão do medicamento contendo L-T4, foram adicionados 100 µl de uma solução padrão de L-T4 (1875 mg l⁻¹) na amostra, previamente a decomposição por MIC. As recuperações obtidas quando utilizada a água como solução absorvedora foram menores que 39%, enquanto, para as soluções de (NH₄)₂CO₃ foram verificadas recuperações entre 97% e 100%. Estes resultados mostraram um comportamento semelhante ao observado quando se utilizou somente a amostra de medicamento, indicando que a água não se trata de uma solução adequada para a absorção de I durante a decomposição de medicamentos, contendo L-T4, por MIC.

Adicionalmente, para comparação dos resultados, as soluções obtidas após a MIC, tiveram a concentração de I⁻ determinada por IC. Os resultados obtidos por ISE e IC não apresentaram diferença significativa (ANOVA, p < 0,05), indicando que os resultados obtidos por ISE são exatos. Assim, com base nos resultados obtidos foi possível comprovar que a água não garante a absorção total do I durante a MIC. Ademais, dentre as soluções absorvedoras estudadas, foi escolhido o (NH₄)₂CO₃ 50 mmol l⁻¹, visto que esta solução é mais diluída quando comparada a outra solução de (NH₄)₂CO₃ avaliada, além de viabilizar a obtenção de RSDs menores que 8% e um LOD de 11,25 µg de L-T4/ comp.

Após a otimização do método proposto, que envolve a decomposição de 400 mg do medicamento por MIC utilizando (NH₄)₂CO₃ 50 mmol l⁻¹ como solução absorvedora, este foi aplicado para avaliação de comprimidos contendo de 50, 100 ou 150 µg de L-T4. Os resultados obtidos para os comprimidos contendo 100 ou 150 µg de L-T4 demonstraram concordâncias entre 92 e 95% com os valores informados pelo fabricante, respectivamente. Estes valores encontram-se dentro da faixa estabelecida como aceitável pela Farmacopeia Americana (90-110%). Por outro lado, para os comprimidos contendo 50 µg de L-T4 foi obtida uma concordância de 87% com o valor informado pelo fabricante. Provavelmente, essa

diferença esteja associada as variações que ocorrem durante o processo de fabricação do medicamento, as quais são mais significativas em concentrações mais baixas do princípio ativo.

Adicionalmente, foi avaliada a adequabilidade do $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$ 50 mmol L^{-1} para a absorção do I presente em medicamentos com concentrações de L-T4 superiores a 100 $\mu\text{g}/\text{comp}$. Assim, foram realizados ensaios de recuperação utilizando $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$ 50 mmol L^{-1} como solução absorvedora, através da adição de 100 μl de uma solução de L-T4 (1875 mg L^{-1}) em 400 mg do medicamento contendo 150 μg do fármaco por comprimido. A recuperação obtida para L-T4 foi de 106%, indicando a adequabilidade da solução de $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$ 50 mmol L^{-1} para absorção de I durante a decomposição de medicamentos contendo até 150 μg de L-T4 por comprimido e, consequentemente, a exatidão dos resultados obtidos.

4. CONCLUSÕES

Com base nos estudos realizados pode-se desenvolver um método adequado para a quantificação indireta de L-T4 em medicamentos, através da determinação de I⁻ por ISE após a decomposição das amostras por MIC. Por meio do método desenvolvido, foi possível a obtenção de baixos valores de branco e limites de detecção. Além disso, o método proposto possui uma elevada frequência de análise, quando comparado aos métodos oficiais; apresenta exatidão e precisão satisfatórias; permite a escolha de uma solução absorvedora adequada aos analitos e a técnica de determinação, bem como a utilização de soluções diluídas, o que vem ao encontro das tendências da química verde. Ademais, através do método proposto, foi possível a avaliação de comprimidos contendo concentrações variadas de L-T4.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BRITISH PHARMACOPOEIA. 3.ed. United Kingdom: HMSO, 2001. 2v.
- COSTANZO. L. S. **Fisiologia**. Fisiologia endócrina. 3.ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2007.
- FARMACOPÉIA BRASILEIRA. Brasília: **ANVISA**. 5 ed. v 1 e 2. 2010. 13-19 p.
- HANNA. Manual do Eletrodo Íon Seletivo de Iodeto. Disponível em: <www.hannacom.pt/imgGestao/_manuais/868_HI4111.pdf>. Acesso em: 23. abril. 2015.
- HOLLER, F.J.; SKOOG, D.A.; CROUCH, S.R. **Princípios de Análise Instrumental**. 6.ed. Porto Alegre: Bookman, 2009.
- INTERNATIONAL PHARMACOPEIA. **Levothyroxinum sodium**. Disponível em: <<http://apps.who.int/phint/en/p/docf>>. Acesso: 03. dez. 2014.
- MAGALHÃES, C.E. C.; FLORES, É. M. M.; KRUG, F.J.; BARIN, J.S.; MESKO, M.F. Decomposição de materiais orgânicos por combustão. In: KRUG, F. J. **Métodos de preparo de amostras**. 1.ed. Piracicaba: CENA/USP, 2010. 208-251 p.
- NOBREGA, J.A.; SANTOS, M.C.; SOUSA, R.A.; CADORE, S.; BARNES, R.M.; TATRO, M. Sample preparation in alkaline media. **Spectrochimica Acta Part B**, v.61. p.465-495, 2006.
- NOGUEIRA, A.R.A.; MORAES, D.P.; FLORES, É.M.M.; KRUG, F.J.; KNAPP, G.; NÓBREGA, J.A.; BARIN, J.S.; MESKO, M.F. Decomposições assistidas por redação micro-ondas. In: KRUG, F.J. **Métodos de preparo de amostras**. 1.ed. Piracicaba: CENA/USP, 2010. 276-325 p.
- USP (THE UNITED STATES PHARMACOPEIA). 24. ed. 2000.