

AVALIAÇÃO DE MÉTODOS DE PREPARO DE AMOSTRA PARA A SUBSEQUENTE DETERMINAÇÃO DE CLORO EM MEDICAMENTOS À BASE DE LEVOTIROXINA SÓDICA

DIRCE TAINÁ TEIXEIRA DE OLIVEIRA; FILIPE SOARES RONDAN; GILBERTO
DA SILVA COELHO JUNIOR; RODRIGO MENDES PEREIRA; VANIZE
CALDEIRA DA COSTA; MÁRCIA FOSTER MESKO

*Centro de Ciências Químicas, Farmacêuticas e de Alimentos, Universidade Federal de Pelotas –
taina.teixeira.14@hotmail.com; marciamesko@yahoo.com.br*

1. INTRODUÇÃO

A levotiroxina (L-T₄) é um hormônio sintético comumente indicado para pacientes com hipotireoidismo, que é uma doença caracterizada pela deficiência dos hormônios tireoidianos (GILMAN et al., 2005). Dessa forma, a sua reposição é extremamente importante, visto que o hipotireoidismo ocasiona uma série de reações adversas ao organismo humano (NOGUEIRA et al., 2011).

A dosagem de reposição da L-T₄ é realizada na ordem de microgramas, o que torna indispensável o controle de qualidade dos medicamentos contendo essa substância ativa, tendo em vista que subdosos ou sobredosos podem ocasionar sintomas de hipotireoidismo ou hipertireoidismo, respectivamente (PABLA, 2009). Além disso, os testes utilizados para o controle de qualidade devem incluir a determinação de impurezas. Nesse sentido, é importante salientar que, na Farmacopeia Internacional, é descrito um ensaio limite para haletos em L-T₄. Contudo, esse ensaio somente é recomendado para a substância ativa, além de não viabilizar a quantificação destas espécies, bem como a determinação dos halogênios que as compõem (WHO, 2016).

Dentre os halogênios, o cloro (Cl) é um exemplo de elemento a ser avaliado, visto que este participa da manutenção da pressão osmótica e do equilíbrio ácido-base do corpo (SERFOR-ARMAH et al., 2002). Além disso, cabe mencionar que a toxicidade do Cl também está relacionada ao seu contra íon, uma vez que o Cl é comumente ingerido na forma de um sal (WHO, 2004).

Com relação à determinação de Cl, é importante mencionar que esta não é uma tarefa fácil, pois a utilização de soluções ácidas durante a etapa de preparo de amostra pode favorecer a formação de espécies voláteis deste elemento (NÓBREGA et al., 2006). Nesse sentido, como alternativa, vem sendo proposto o uso de técnicas de combustão para o preparo de amostras visando a subsequente determinação de halogênios, especialmente, a combustão iniciada por micro-ondas (MIC). A MIC baseia-se na decomposição da matéria orgânica em frasco fechado, na presença de oxigênio, o que minimiza a ocorrência de contaminações e perdas por volatilização (FLORES et al., 2004).

Uma outra alternativa, envolve o uso de soluções alcalinas para a extração do(s) analito(s) a partir da amostra ou para a dissolução desta. Os métodos baseados no uso de soluções alcalinas podem ser realizados em sistema aberto ou fechado, com aquecimento convencional ou assistido por radiação micro-ondas, além de existir a possibilidade de utilizar fontes de energia alternativas como, o ultrassom (NÓBREGA et al., 2006).

Dentre as técnicas empregadas para a determinação de Cl, a potenciometria com eletrodo íon seletivo (ISE) destaca-se, pois apresenta instrumentação e manutenção de baixo custo. Entretanto, trata-se de uma técnica suscetível a interferências (DIMESKI et al., 2010). Diante disso, esse trabalho teve como objetivo avaliar métodos de preparo de amostra para a subsequente

determinação de Cl em medicamentos a base de L-T₄, bem como avaliar a possibilidade de realizar a determinação deste analito por ISE.

2. METODOLOGIA

Os medicamentos contendo L-T₄ (25, 50, 100 ou 150 µg/comp), produzidos na Alemanha ou México, foram adquiridos no comércio local de Pelotas-RS, cominuídos com o auxílio de um gral e pistilo e, posteriormente, secos a 60 °C por 3 h. Dentre as amostras adquiridas, o medicamento contendo 100 µg/comp de L-T₄ foi escolhido para a otimização do método.

Para as decomposições por MIC, as amostras foram pesadas (400 mg) e envolvidas por filmes de polietileno. Em seguida, os invólucros foram dispostos na base de suportes de quartzo contendo um papel filtro umedecido com 50 µl de NH₄NO₃ (6 mol l⁻¹) e, inseridos em frascos de quartzo contendo 6 ml de solução absorvedora ((NH₄)₂CO₃ 50, 100 ou 150 mmol l⁻¹). Posteriormente, os frascos foram fechados, fixados a um rotor, pressurizados com 20 bar de O₂ e submetidos ao programa de irradiação: i) 1400 W/5 min e ii) 0 W/20 min. Os digeridos foram transferidos para frascos volumétricos e o volume final foi aferido a 25 ml para posterior determinação de Cl por IC. Após a otimização do método, este foi aplicado para o preparo de medicamentos contendo variadas concentrações de L-T₄ (25; 50 e 200 µg/comp).

Por outro lado, para a avaliação da extração assistida por ultrassom, as amostras foram pesadas (400 ou 800 mg) e, em seguida, transferidas para frascos de polipropileno com 6 ou 12 ml da solução extratora (água ou (NH₄)₂CO₃ - 50 ou 100 mmol l⁻¹). Posteriormente, os frascos foram imersos no banho de ultrassom com frequência de 40 kHz (modelo USC – 2800 A, Unique, Brasil), e submetidos à temperatura de 65 °C por 45 ou 90 min, sendo realizada a homogeneização das amostras a cada 15 min. Após a extração, as soluções foram filtradas e aferidas a 25 ml para a posterior determinação de Cl por IC.

A fim de avaliar a exatidão dos métodos estudados, realizou-se um ensaio de recuperação. Para isso, previamente ao preparo das amostras por extração, foram adicionados 160 µl de uma solução de referência de Cl (1000 mg l⁻¹) em 800 mg de amostra. Adicionalmente, também foi realizada a determinação de Cl em algumas amostras por ISE.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Inicialmente, a MIC foi avaliada para a decomposição dos medicamentos à base de L-T₄, sendo investigada a solução absorvedora mais adequada para a absorção do Cl durante o processo de combustão. Nesse contexto, é importante salientar que foram avaliadas soluções de (NH₄)₂CO₃ devido existirem relatos na literatura indicando que meios levemente alcalinos proporcionam resultados exatos e precisos quando aplicados para absorção halogênios (MESKO et al., 2014). Na Tabela 1 estão apresentados os resultados obtidos para Cl por IC após a decomposição do medicamento contendo 100 µg/comp de L-T₄ por MIC, utilizando diferentes concentrações de (NH₄)₂CO₃ como solução absorvedora.

Tabela 1. Concentrações de Cl obtidas por IC para o medicamento (100 µg/comp) após decomposição por MIC, utilizando as soluções absorvedoras avaliadas (média ± desvio padrão, n = 3).

Solução absorvedora	Cl (mg kg ⁻¹)
(NH ₄) ₂ CO ₃ 50 mmol l ⁻¹	204 ± 25
(NH ₄) ₂ CO ₃ 100 mmol l ⁻¹	194 ± 13
(NH ₄) ₂ CO ₃ 150 mmol l ⁻¹	194 ± 22

De acordo com a Tabela 1, é possível perceber que não houve diferença significativa (ANOVA, 95% de confiança) entre os resultados, quando utilizadas as soluções absorvedoras avaliadas. Assim, a solução de $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$ 50 mmol l^{-1} foi selecionada para absorção de Cl durante a decomposição de medicamento à base de L-T₄ por MIC, visto que se trata da solução mais diluída dentre as soluções avaliadas. Diante disso, amostras de medicamento contendo 25, 50 ou 200 $\mu\text{g}/\text{comp}$ de L-T₄ também foram decompostas por MIC, utilizando $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$ 50 mmol l^{-1} como solução absorvedora para subsequente determinação de Cl por IC, e os resultados estão apresentados na Tabela 2.

Tabela 2. Concentrações de Cl em medicamentos à base de L-T₄ após decomposição por MIC, utilizando $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$ 50 mmol l^{-1} como solução absorvedora, e determinação por IC (média \pm desvio padrão, n = 3).

Amostra ($\mu\text{g}/\text{comp}$)	Cl (mg kg^{-1})
25	176 \pm 8
50	144 \pm 11
100	204 \pm 25
200	186 \pm 17

Como pode ser verificado na Tabela 2, as concentrações de Cl não variaram de uma forma muito expressiva, quando comparados os medicamentos com variadas dosagens de L-T₄. Diante disso, foi possível inferir que, provavelmente, a presença de Cl nas amostras está majoritariamente associada aos excipientes utilizados na produção dos medicamentos.

Em um segundo momento, a extração assistida por ultrassom também foi avaliada para o preparo das amostras, devido à possibilidade de o Cl estar na forma de um sal nos medicamentos e ser facilmente extraído para uma solução apropriada. Assim, 400 mg de amostra (100 $\mu\text{g}/\text{comp}$ de L-T₄) foram submetidos ao processo de extração durante 45 min, utilizando 6 ml de solução extratora (água ou $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$ - 50 ou 100 mmol l^{-1}). Na Tabela 3 são apresentados os resultados obtidos para Cl após a extração utilizando soluções diversas.

Tabela 3. Concentrações de Cl em medicamento à base de L-T₄ (100 $\mu\text{g}/\text{comp}$) após extração assistida por ultrassom, utilizando diferentes soluções extratoras, e determinação por IC (média \pm desvio padrão, n = 3).

Solução extratora	Cl (mg kg^{-1})
H ₂ O	184 \pm 4
$(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$ 50 mmol l^{-1}	183 \pm 3
$(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$ 100 mmol l^{-1}	174 \pm 14

De acordo com os resultados obtidos, foi possível perceber que não existe diferença significativa (ANOVA, 95% de confiança) entre as concentrações de Cl quando utilizadas as soluções extratoras avaliadas. Além disso, o resultado obtido após a extração assistida por ultrassom, utilizando água como solução extratora, não apresentou diferença significativa (teste *t-Student*, 95% de confiança) do resultado obtido após a decomposição das amostras por MIC. Assim, a água foi selecionada como solução extratora para os estudos subsequentes, os quais tiveram por objetivo aumentar a massa de amostra utilizada e, consequentemente, reduzir o limite de detecção do método. Contudo, quando utilizada uma massa de amostra de 800 mg, o resultado (100 \pm 30 mg kg^{-1}) foi concordante em apenas 50% com o resultado obtido após a MIC. Diante disso, com o intuito de melhorar a eficiência da extração, foi aumentado o volume de solução extratora (12 ml), bem como o tempo de extração (90 min), o que

culminou em um resultado ($189 \pm 3 \text{ mg kg}^{-1}$) concordante em 93% com o resultado obtido após o preparo das amostras por MIC.

Para avaliar a exatidão da extração assistida por ultrassom para a subsequente determinação de Cl em medicamentos à base de L-T₄ foi realizado um ensaio de recuperação, utilizando água como solução extratora, e a recuperação obtida foi de 93%. Além disso, os desvios padrão relativos (RSDs) obtidos foram inferiores a 4% e o limite de detecção (LOD) foi de $64,1 \text{ mg kg}^{-1}$.

Adicionalmente, as soluções obtidas utilizando as condições otimizadas para a extração assistida por ultrassom foram analisadas por ISE para a determinação de Cl e, o resultado obtido ($186 \pm 16 \text{ mg kg}^{-1}$) foi concordante em 98% com o obtido por IC. Assim, o resultado indica que a ISE pode ser adequada para a determinação de Cl em medicamentos à base de L-T₄ após o preparo das amostras por extração.

4. CONCLUSÕES

Com base nos estudos realizados, foi possível determinar Cl em L-T₄ por IC após decomposição das amostras por MIC, bem como após o preparo das amostras utilizando a extração assistida por ultrassom. Ambos os métodos de preparo de amostras avaliados proporcionaram baixos valores de branco, RSDs e LODs, além de permitirem a utilização de água ou de soluções diluídas, o que vem ao encontro das tendências da química verde.

Além disso, a possibilidade de utilizar a extração assistida por ultrassom associada à ISE, apresenta como vantagem a minimização de custos relacionados a aquisição e manutenção de equipamentos. Contudo, ainda devem ser realizados estudos com o objetivo de avaliar a exatidão da ISE para a determinação de Cl em medicamentos à base de L-T₄.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- DIMESKI, G.; BADRICK, T.; JOHN, A.S. Ion Selective Electrodes (ISEs) and interferences – A review. *Clinica Chimica Acta*, v.411, p.309-317, 2010.
- FLORES, E. M. M.; BARIN, J. S.; PANIZ, J. N. G.; MEDEIROS, J. A.; KNAPP, G. Microwave-assisted sample combustion: A technique for sample preparation in trace element determination. *Analytical Chemistry*, v.76. p.13, 3525 - 529, 2004.
- GILMAN, A. G.; Louis S. Goodman; *As Bases Farmacológicas da Terapêutica*. 10. ed. Rio de Janeiro: Mc Graw Hill, 2005. 1175-1200 p.
- INTERNATIONAL PHARMACOPEIA. Levothyroxinum sodium. Disponível em: <<http://apps.who.int/phint/en/p/docf>>. Acesso: 20. ago. 2016.
- NOGUEIRA, C.R; KIMURA, E.T; CARVALHO, G.A; SGARBI, J.A; WARD, L.S; MACIEL, L.M.Z; DIAS, S.M.R; STEIN, A.T; WAGNER, H.L; HETEM, L.A.B; NÓBREGA, 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.
- PABLA, D.; AKHLAGHI, F.; ZIA, H. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, v. 72 p. 105-110, 2009
- SERFOR-ARMAH, Y.; NYARKO, B.J.B.; AKAHO, E.H.K.; KYERE, A.W.K.; OSAE, S.; OPPONG-BOACHIE, K. Multielemental analysis of some traditional plant medicines used in Ghana. *Journal of Trace and Microprobe Techniques*, v.20. p.419 - 427, 2002.