

Otimização e validação de método farmacopeico para verificar possíveis desvios de qualidade de matérias primas e cápsulas manipuladas contendo hormônios tireoidianos

Optimization and validation of the pharmacopeial method for verifying the potential quality deviations of drug raw materials and compounded oral capsules of thyroid hormones

RIALA6/1138

Blanca E.O. MARKMAN^{1*}, Maria Regina W. KOSCHTSCHAK¹, Mariângela T. AURICCHIO²

*Endereço para correspondência: ¹Instituto Adolfo Lutz, Seção de Antibióticos. Av. Dr. Arnaldo 355, CEP 01246-902. São Paulo, SP/Brasil. Fone: 3068-2928. E-mail: bmarkman@ial.sp.gov.br.

²Instituto Adolfo Lutz - Diretoria do Serviço de Medicamentos. Av. Dr. Arnaldo 355, CEP 01246-902. São Paulo, SP/Brasil. Recebido: 06/02/2007 – Aceito para publicação: 26/09/2007

RESUMO

Os hormônios tireoidianos levotiroxina (T4) e liotironina (T3), utilizados no hipotireoidismo, controlam a velocidade das funções químicas corpóreas. Os objetivos deste estudo foram otimizar e validar a técnica de CLAE-UV a partir da descrita na farmacopéia americana 28a. ed., para determinar T3 e T4 com um fator de resolução igual ou maior que 5 entre o maior componente e seu contaminante, e aplicá-la com eficiência na verificação da qualidade de formulações farmacêuticas manipuladas. A otimização do método foi alcançada com a fase móvel de 52:50 (água acidificada com ácido fosfórico: acetonitrila), temperatura 27°C e fluxo de 1,6 mL. min⁻¹, empregando-se a coluna de 250 x 4,6mm constituída de grupos nitrila ligados quimicamente a partículas de sílica porosa de 3 a 10µm e detecção em 238nm. O número de pratos teóricos acima de 8500 e a resolução de 5,12, indicam excelente eficiência do sistema cromatográfico otimizado. Foram detectados graves desvios de qualidade nas cápsulas manipuladas de T3 e ou T4, pois foram encontrados valores de super-dosagem que levaram os pacientes a internação hospitalar e mesmo a óbito por intoxicação causada por esses hormônios. Os resultados obtidos expõem as limitações técnicas dos processos de manipulação, assim como a ausência do controle de qualidade do produto acabado, o uso desses medicamentos constitui um risco sanitário.

Palavras-chave. levotiroxina, liotironina, CLAE, cápsulas manipuladas, validação.

ABSTRACT

Levothyroxine (T4) and Liothyronine (T3) have been used for hypothyroidism treatment, and these drugs control the speed of corporeal chemical functions. The present study aimed to optimize and validate the methodology described in United States Pharmacopeia 28 for T3 and T4 determination by means of HPLC-UV, in order to make it suitable for concomitant evaluation for assessing the quality of in compounded medicines. Optimization was achieved by using acidified water (phosphoric acid : acetonitrile) 52:50, in temperature at 27° C and flow of 1.6 mL min⁻¹, and 250 x 4.6mm column constituted by nitriles group bounded to 3 to 10µm porous silica particles, and detection at 238nm. The number of theoretical plates was 8500 and the obtained resolution factor was 5.12, which showed the efficiency of chromatography conditions. When this methodology was applied for testing the content uniformity in T3 and T4 compounded capsules, quality deviations were detected. The super dosage of active drug substances was one of the found deviations. Inadequate and high doses of active drugs as hormones are harmful to the patients, leading to be hospitalized, and even to death owing to drug intoxication mainly with narrow therapeutics windows drugs. The data observed in the present study demonstrate the occurrence of technical limitations in compounding pharmacy, and also a lack of appropriate quality control.

INTRODUÇÃO

Os medicamentos manipulados em farmácias surgiram como opção de terapia personalizada, porém o uso difundido deste tipo de medicamento traz dificuldades do ponto de vista da metodologia de análise, já que os compêndios oficiais, tanto o nacional como os internacionais, não contemplam monografias voltadas para medicamentos desta natureza.

As limitações técnicas para o controle do processo de manipulação e do controle físico-químico do produto acabado, na farmácia de manipulação, podem levar a desvios de qualidade significativos e com conseqüências importantes.

Os hormônios tireoidianos, bem como os hormônios de uma maneira geral, integram a categoria de medicamentos de baixa dosagem de princípio ativo. A levotiroxina e liotironina (Figura 1) secretados pela glândula tireóide, controlam a velocidade das funções químicas corpóreas, atuando no metabolismo de duas maneiras, pelo aumento de síntese protéica e do consumo de oxigênio pelas células^{1,2}. Desordens da tireóide são comuns, resultando em hipertireoidismo com produção excessiva de hormônios decorrente de várias doenças entre elas a doença de Graves, ou hipotireoidismo com pequena produção de hormônios^{1,2,3,4}.

O protocolo terapêutico do hipotireoidismo estabelece a reposição hormonal preferencialmente na forma sintética de levotiroxina sódica (T4). Quando são necessários resultados rápidos é empregada a liotironina sódica (T3). A mistura de T3 e T4 também é indicada^{1,2,3,4}.

A análise de medicamentos manipulados requer ajustes e adaptações das condições analíticas preconizadas nas monografias farmacopeicas porque, em geral, trata-se de formulações farmacêuticas em apresentações não contempladas nestes compêndios. Estas adequações podem ser mais ou menos significativas em relação ao método descrito alterando alguns parâmetros cromatográficos e, conseqüentemente, o método deverá ser validado.

A literatura reporta várias técnicas para a identificação e quantificação de levotiroxina e liotironina em formulações

farmacêuticas, matérias primas, e fluidos biológicos. A cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) empregando diferentes detectores, ultravioleta^{5,6,7,8,9,10}; eletroquímico¹¹, espectrometria de massa^{11,12}, por análise diferencial pulso polarográfica¹³, imunoensaio com fluorescência polarizada (FPIA)¹⁴, radioimunoensaio¹⁵ e por quimioluminescência^{16,17}.

O método escolhido para a avaliação dos hormônios tireoidianos está descrito na Farmacopéia Americana 28ª Ed (USP-28)⁹ utilizando CLAE-UV, o qual estabelece que o fator de resolução entre T3 e T4 do sistema cromatográfico não deve ser menor que cinco e para que este requisito fosse atendido foram necessários ajustes da composição da fase móvel, fluxo e temperatura.

Considerando-se a importância da reposição hormonal com T3 ou T4 e a gravidade das queixas de desvios de qualidade de medicamentos manipulados a base destes hormônios, apresentados pelo Sistema de Vigilância Sanitária como responsáveis por intoxicações, internações até óbitos, foram objetivos deste trabalho otimizar e validar a metodologia por CLAE-UV da USP-28⁹ para estes fármacos, com o intuito de melhorar o fator de resolução entre o maior componente e seu contaminante e aplicá-la com eficiência para matérias-primas e formas farmacêuticas manipuladas.

A validação do método foi de acordo com as recomendações da USP 28¹⁸, ICH¹⁹, RDC N° 10 de 2001 da ANVISA/MS²⁰ e INMETRO²¹.

MATERIAL E MÉTODOS

Padrões, Reagentes e Amostras

Substâncias químicas de referência: liotironina e levotiroxina de procedência da Farmacopéia Americana (USP). Reagentes: acetonitrila grau HPLC da Merck®, ácido fosfórico p.a. Merck®, unidade filtrante HV em PV com membrana DU Rapore 0,45µm de poro, 13mm não estéril, Milipore®. Amostras: cápsulas duras de T3 e T4, cápsulas com formulação para emagrecimento, sache, matérias primas concentradas

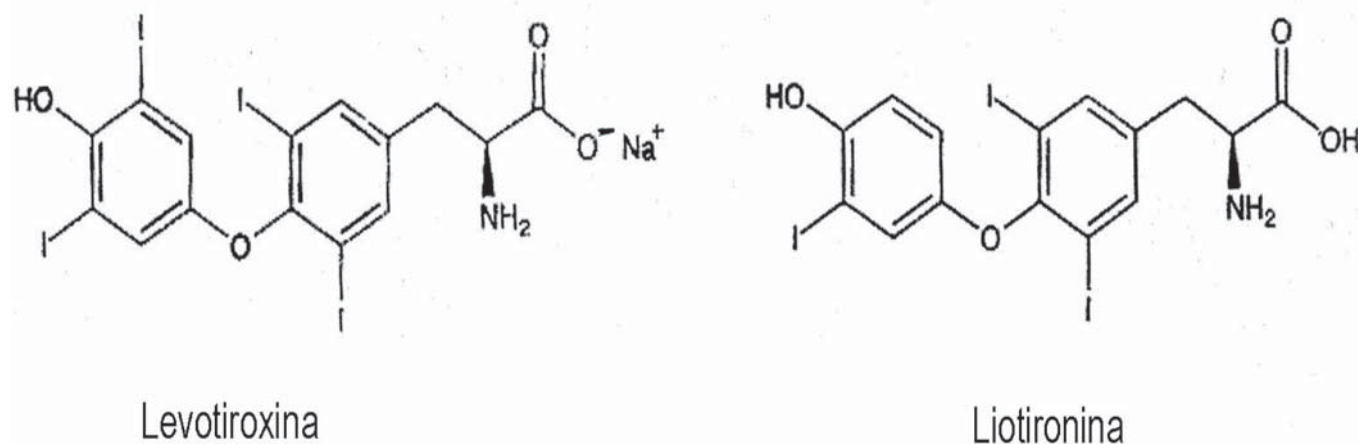


Figura 1. Estruturas químicas de Levotiroxina sódica (T4) e Liotironina (T3).

ediluídas de T3 e T4, placebo constituído de granulado com revestimento e corante azul procedente da Baldacci.

Equipamento

O equipamento HPLC Shimadzu Liquid Chromatography série LC-10A/VP, (Tokyo, Japan) foi testado e certificado pela Sinc do Brasil Instrumentação Científica Ltda, segundo os protocolos de verificação de desempenho da Shimadzu Scientific Instruments, protocolos de verificação das especificações de fábrica que a Shimadzu Corporation (Japão) proporciona, especificações e procedimentos emitidos pela N.I.S.T. O HPLC compreende uma bomba LC-10AD-VP, um detector UV-Vis SPD-10 AV-VP em 238nm, um forno CTO-10 AC-VP a temperatura de 27°C, um injetor Rheodyne (modelo 7725 I) com injeção manual e alça de 20µL, uma coluna empacotada com sílica quimicamente ligada a grupos nitrila - L10 (partículas de 5µm e 250X4,6 mm Lichrospher da Merck®) de acordo com a USP-28⁹. Os cromatogramas foram processados pelo sistema controle SCL-10A-VP. A fase móvel constituída de água acidificada com ácido fosfórico, (0,5mL para 1000mL): acetonitrila (52:50), era preparada e filtrada diariamente em membrana de 0,45µm de MF celulose

regenerada da Sartorius (Goettingem-Germany). O diluente utilizado era a fase móvel. A vazão era de 1,6mL.min⁻¹.

Preparo das Soluções

As soluções dos padrões, excipientes para comprimidos revestidos com corante utilizados como brancos para a determinação do ruído e teste de recuperação, na validação para T3 e T4, foram pesados e diluídos adequadamente com o diluente. Os conteúdos individuais das cápsulas foram diluídos adequadamente, filtrados em membrana de 22µm e 20µL dessas soluções foram injetadas no sistema cromatográfico.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Teste de Adequabilidade do Sistema

Esse teste foi utilizado para verificar que a resolução e repetibilidade do sistema cromatográfico otimizado são adequadas para as análises a serem realizadas. A Tabela 1 expressa os resultados da aplicação ao item recuperação do método otimizado do teste de adequabilidade, apresentando os parâmetros cromatográficos obtidos.

Tabela 1. Resultados do teste de adequabilidade de sistema cromatográfico, segundo USP 28 aplicado ao item recuperação do método otimizado, nas condições cromatográficas: fase móvel constituída de água acidificada com ácido fosfórico, (0,5mL para 1000mL): acetonitrila (52:50), coluna constituída de grupos nitrila ligados quimicamente a partículas de 3 a 10µm de sílica porosa, e 250 x 4,6mm, detecção em 238nm, fluxo de 1,6mL.min⁻¹ e temperatura de 27°C.

Parâmetros cromatográficos	Levotiroxina	Liotironina
Assimetria		
Média	1,17	1,18
Baixo	1,13	1,14
Alto	1,22	1,23
Desvio padrão relativo	2,70%	2,67%
Fator de capacidade		
Média	10,99	8,66
Baixo	10,98	8,64
Alto	11,02	8,68
Desvio padrão relativo	0,13%	0,16%
Número de pratos teóricos		
Média	9140,64	8895,74
Baixo	9008,51	8704,34
Alto	9264,08	9083,61
Desvio padrão relativo	0,92%	1,14%
Tempo de retenção		
Média	11,03	8,88
Baixo	11,05	8,69
Alto	11,08	8,91
Desvio padrão relativo	0,12%	0,14%
Resolução		
Média	5,12	
Baixo	5,09	
Alto	5,16	
Desvio padrão relativo	0,39%	

Validação

Limites de detecção e quantificação

Os ruídos das linhas de base foram determinados com os excipientes e os limites de detecção (LOD) foram estabelecidos na razão de 3:1 de sinal para ruído, sendo aceito um desvio padrão relativo de < 15%. Os valores individuais determinados foram: 20 e 30ng.mL⁻¹, para liotironina e levotiroxina, respectivamente.

Os limites de quantificação (LOQ) foram determinados pelo critério de 3 x LOD com aceitação de um desvio padrão relativo de < 2%. Os valores determinados foram: 60 e 80ng.mL⁻¹, para liotironina e levotiroxina, respectivamente.

Exatidão

De acordo com a recomendação do ICH²⁰ a exatidão foi determinada pela medida de três níveis de concentrações em triplicatas independentes, de cada hormônio adicionado ao excipiente em concentrações entre: 4,034 e 3,80µg.mL⁻¹, (nível I, 50 %); 8,048 e 7,612µg.mL⁻¹ (nível II, 100%); 12,072 e 11,419µg.mL⁻¹ (nível III, 150 %) para levotiroxina e liotironina respectivamente. Os valores encontrados para a recuperação nos três níveis foram: 98,52 a 102,71% e 99,32 % a 101,12, com desvios padrões relativos de

1,63%-2,10%-0,64% e 1,51%- 0,89%-1,63% para levotiroxina e liotironina respectivamente.

Precisão

De acordo com as recomendações do FDA as precisões foram determinadas por análises de replicatas (N=9) de amostras adicionadas ao placebo nas concentrações: 8,04 e 7,61µg.mL⁻¹ para levotiroxina e liotironina. Os desvios padrões relativos (%RSD) obtidos foram de: 2 % e 0,89 %, respectivamente.

Linearidade

As linearidades do método proposto foram determinadas com a utilização de 5 concentrações diferentes para T3 e T4. As faixas de 4 a 20µg.mL⁻¹ foram estabelecidos através do procedimento analítico, para T3 e T4. A plotagem da representação gráfica das áreas dos picos versus concentração originaram curvas de calibração lineares, com coeficientes de correlação de 0,9996 e 0,9995, inclinação das retas de 2,12353e⁰⁰⁵ e 2,04222e⁻⁰⁰⁵ e intersecção das retas de 0,142626 e 0,126505 para levotiroxina e liotironina, respectivamente.

O método otimizado e validado foi aplicado às amostras constituídas de cápsulas, sachê, e matérias primas de hormônios tireoidianos provenientes de farmácias de manipulação.

Tabela 2. Resultados da determinação do teor e do ensaio limite do contaminante, de cápsulas, sachê e matérias primas de T3 e ou T4 provenientes de farmácias de manipulação, obtidos com a metodologia otimizada e validada, nas seguintes condições cromatográficas: fase móvel constituída de água acidificada com ácido fosfórico (0,5mL para 1000mL): acetonitrila (52:50), coluna de 250x4,6mm constituída de grupos nitrila ligados quimicamente a partículas de 3 a 10µm de sílica porosa, detecção em 238nm, fluxo de 1,6mL.min⁻¹, e temperatura de 27°C.

VISAS Procedência	Apresentação/Teor declarado em µg ou diluição	Teor encontrado em µg/cp e % em relação ao teor declarado	Ensaio limite de T3 e ou T4 em %
Franca/SP	Cp T4-100	T4- 897 (897%)	T3-0,38%
Campinas/SP	Cp T4-50	T3- 411 (822%)	T4-2,08%
Franca/SP	Cp T4-100	T4- 8.230 (8.230%)	T3-0,30%
São Paulo/SP	Cp T3-25	T3- 1.046 (4.184 %)	T4-0,38%
Campo G/MT	Cp T3-20 +T4-20	T3- 18,81 (94%) T4- 2.276 (11.382%)	-
Cuiabá/MT	Cp T3-50	T3- 38,72 (77,44%)	T4-0,31%
São Carlos/SP	Cp T3-75	T3- 567,92 (757%)	T4-0,29%
Guarulhos/SP	Cp T4-200	T4- 84,98 (42,49%)	T3-0,36%
SB Campo/SP	Cp T4-100	T4- 81 (81%)	-
São Paulo/SP	Sachê ND	T4- 4.242	-
São Carlos/SP	MP T3-1:100	T3- 0,45:100 (45%)	T4-0,2%
Franca/SP	MP T4- ND	T4-10:100	T4-0,1%
Franca/SP	MP T4-1:100	T4-1,1:100 (109%)	T3-0,34%
Bauru/SP	MP T3-1:100	T3-0,14:100 14,7%	T4-0,40%
São Paulo/SP	MP ND	T4-97%	T3-0,31%

VISAS= Vigilâncias sanitárias municipais; cp= cápsula; MP= matéria prima; ND= não declarado; µg=microgramas; 1:100 =diluição 1 parte para 100 partes; µg/cap=microgramas por conteúdo de cápsula; valor de referência do ensaio limite de T3= até 2% em relação ao valor encontrado de T4; valor de referência do ensaio limite de T4= até 4% em relação ao valor encontrado de T3.

Tabela 3. Resultados da determinação de uniformidade de conteúdo das cápsulas de T3 e ou T4 provenientes de farmácias de manipulação, obtidos com a metodologia otimizada e validada, nas seguintes condições cromatográficas: fase móvel constituída de água acidificada com ácido fosfórico, (0,5mL para 1000mL): acetonitrila (52:50), coluna de 250x4,6mm constituída de grupos nitrila ligados quimicamente a partículas de 3 a 10µm de diâmetro de sílica porosa, detecção em 238nm, fluxo de 1,6mL.min⁻¹, e temperatura de 27°C.

VISAS Procedência	Apresentação/ Teor declarado em µg	Uniformidade de Conteúdo e desvio padrão relativo (DPR%)
Franca/SP	Cp T4-100	Entre 86 e 8.389% com DPR% 197%
Campinas/SP	Cp T4-50	Entre 673 e 973% com DPR% 12,07%
Franca/SP	Cp T4-100	Entre 7.320 e 8.995% com DPR% 8,59%
São Paulo/SP	Cp T3-25	Entre 3.920 e 4.736% com DPR% 6,71%
Campo G/MT	Cp T3-20 + T4-20	Entre 90 e 105% com DPR% 17,32%
Cuiabá/MT	Cp T3-50	Entre 67 e 96% com DPR% 14%
São Carlos/SP	Cp T3-75	Entre 733 e 1425% com DPR% 20,28%
Guarulhos/SP	Cp T4-200	Entre 35 e 73% com DPR% 26%
SB Campo/SP	Cp T4-100	-

Visas= Vigilâncias sanitárias municipais; Cp= cápsula; - = não determinado; Valor de referência da uniformidade de conteúdo: cada uma das dez unidades testadas deve conter entre 85 a 115% do teor declarado, com desvio padrão relativo (DPR%) $d \leq 6\%$.

Os compêndios oficiais estabelecem limites para a presença de T3 em formulações de T4 e limites para a presença de T4 em formulações de T3, que são considerados contaminantes, respectivamente.

Foram realizados vários experimentos como alterações da composição da fase móvel de 60:40 (água acidificada com ácido fosfórico: acetonitrila), do fluxo de 1,5ml.min⁻¹ e temperatura 25°C para otimizar os parâmetros experimentais com o intuito de conseguir uma separação cromatográfica adequada

entre o maior componente e seu contaminante. A otimização do método farmacopeico foi alcançada com o aumento da proporção de acetonitrila na fase móvel de 40 para 50 tornando-a menos polar, com a elevação da temperatura para 27°C e aumento do fluxo para 1,6ml.min⁻¹, estas alterações provocarão aumento do tempo de retenção relativo de T3 e T4 em relação ao método original da USP-28, porém permitiram uma resolução de 5,12 (Figura 2) entre o maior componente e seu contaminante, conforme exigência do método oficial da USP-28.

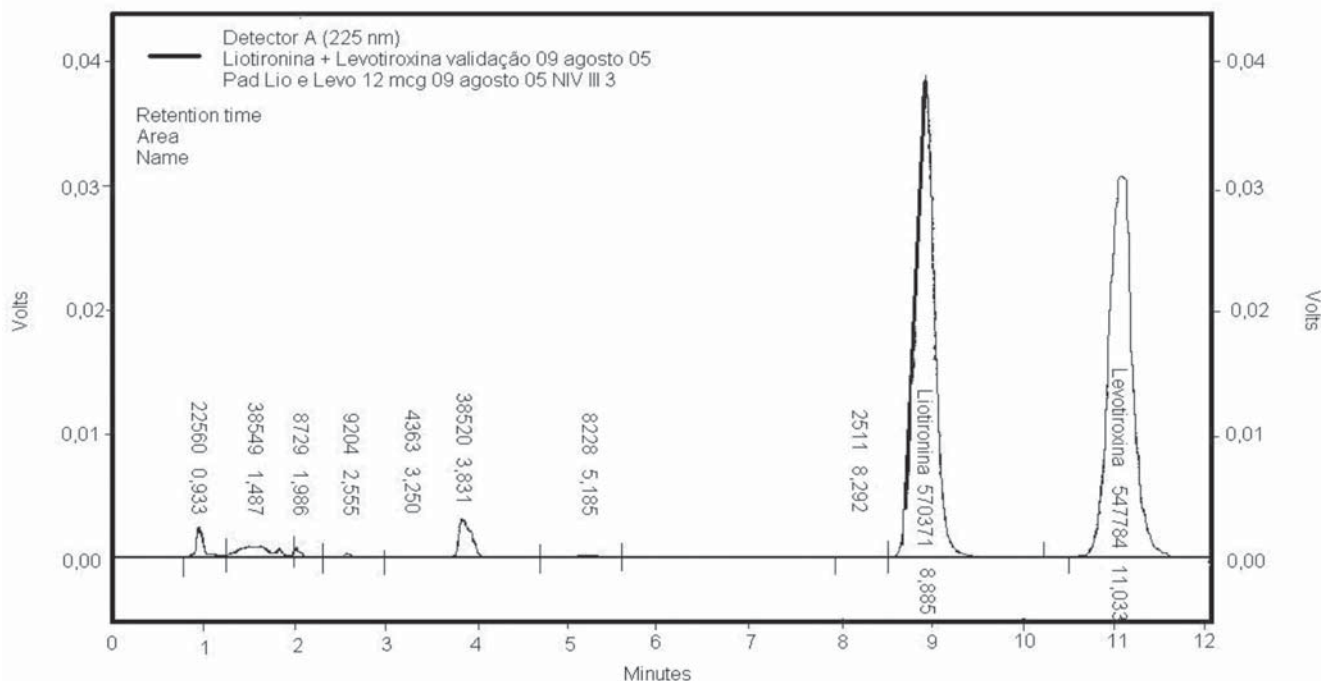


Figura 2. Cromatograma apresentando a separação de Liotironina(T3) e Levotiroxina (T4) no sistema cromatográfico otimizado com fase móvel constituída de: água acidificada com ácido fosfórico (0,5mL para 1000mL): acetonitrila (52:50), coluna de 250x4,6mm com grupamentos nitrila ligados quimicamente a partículas de 3 a 10µm de sílica porosa, detecção em 238 nm, fluxo de 1,6 mL.min⁻¹, e temperatura de 27°C.

Entre as características de avaliação de desempenho do sistema cromatográfico otimizado é a verificação da eficiência do sistema através do teste de adequabilidade. A essência do teste está no conceito de que o equipamento, as amostras e as operações analíticas constituem um sistema único, quando submetido a um teste funcional geral. Os parâmetros cromatográficos apresentados na Tabela 1 como o número de pratos teóricos acima de 8500 e a resolução de 5,12 indicam uma excelente eficiência do sistema cromatográfico otimizado, expressada através dos fatores de retenção ou capacidade (k) e dos fatores de assimetria.

Os resultados obtidos da validação do método otimizado para a determinação simultânea de T3 e T4 atendem aos requisitos estabelecidos para as aplicações propostas, tanto em formulações farmacêuticas como em matérias primas, uma vez que abrangeram as concentrações dos ensaios limites dos contaminantes.

Das 5 amostras constituídas de matérias primas 4 apresentaram desvios de qualidade. Duas matérias-primas apresentaram teor abaixo do teor declarado, 2 não declaravam o teor. As formas farmacêuticas cápsula (9) e sachê (1) apresentaram valores com desvios que confirmaram as queixas relatadas. Quatro amostras de cápsulas apresentaram valores abaixo do teor declarado justificando a queixa de ineficácia terapêutica. Em cinco amostras constituídas de cápsulas e 01 de sachê, foram encontrados valores de superdosagem destes hormônios, confirmando as queixas de intoxicação, internação em UTIs e até óbitos dos usuários destas formulações farmacêuticas.

Os valores encontrados para os contaminantes, determinados como ensaios limites, embora estejam dentro do especificado na USP-28 de até 2% para liotironina em relação ao valor encontrado para T4, e até 4% para levotiroxina em relação ao valor encontrado de T3, são extremamente altos levando-se em conta as superdosagens dos hormônios encontradas nas cápsulas. A quantidade de cápsulas enviadas de cada amostra permitiu, somente, a realização dos ensaios de determinação do teor, ensaio limite do contaminante e uniformidade de conteúdo. Este último ensaio segundo a Farmacopéia Brasileira²² determina o teor individual do hormônio em cada uma das 10 cápsulas analisadas, e permite avaliar como é distribuído o princípio ativo em cada cápsula, sendo que os valores encontrados refletiram uma variação significativa expressa através dos desvios padrões relativos encontrados de até 197%, ultrapassando o valor de referência de 6% para T3 e T4, além da superdosagem.

Os desvios de qualidade verificados nas cápsulas manipuladas com T3 e ou T4, são graves pois foram encontrados valores de superdosagem que levaram os pacientes à internação e até ao óbito por intoxicação causada por estes hormônios, as farmácias que manipulam fármacos com baixo índice terapêutico e alta potência devem ter uma fiscalização rigorosa por parte das autoridades reguladoras, que agora poderão contar com os subsídios da RDC n° 214²³ de 12/12/2006, que a partir

de 03/07 substituirá as RDC n° 33²⁴ e n° 354²⁵ da ANVISA/MS, que estabelece critérios rígidos para a manipulação de fármacos de baixo índice terapêutico, aperfeiçoando as ações de controle sanitário na área de medicamentos na busca de proteção da saúde da população.

Os resultados obtidos expõem as limitações técnicas nos processos de manipulação, assim como a ausência do controle de qualidade no produto acabado, por questões financeiras que somados provocam riscos sanitários no uso destes medicamentos.

REFERÊNCIAS

1. Farwell PA, Braverman LE. Thyroid and Antithyroid Drugs In: The Goodman e Gilman's. Pharmacological Basis of Therapeutics, 9th ed. New York: Pergamon Press; 1996, p. 1391-7
2. Martindale. The complete drug reference. 34.ed. London: The Royal Pharmaceutical Society of Great Britain. 2005, 1594-6; p. 1600-4.
3. The Merck Manual of Medical Information-Home Edition: Merck Research Laboratories, Division of Merck & Co.,Inc. Whitehouse Station, N.J. 1997, p. 704-11.
4. Bricarello S. Hormônios da Tireóide e Drogas Antitireoidianas. In: Zanini AC, Oga S. Farmacologia Aplicada. 5.ed. São Paulo: Ed Atheneu; 1994, p. 616-21.
5. Garnick RL, Burt GF, Long DA, Bastian JW, Alfred JP. High-performance liquid chromatographic assay for sodium levothyroxine in tablet formulations: Content uniformity applications. J Pharm Sci. 1984;73:75-7.
6. Richheimer SL, Amer TM. Stability-indicating assay, dissolution and content uniformity of sodium levothyroxine in tablets. J Pharm Sci. 1983;72:1349-51.
7. Brower JF, Toler DY, Reepmeyer JC. Determination of sodium levothyroxine in bulk, tablet, and injection formulations by high-performance liquid. J Pharm Sci. 1984; 73: 1315-17.
8. British Pharmacopéia, Her Majesty's Stationery Office (HMSO), London, 2004, p 1166-8.
9. United States Pharmacopéia 28 ed. Rockville: United States Pharmacopéal conventions. 2005;1137-39; p. 1126-9.
10. Lovell G, Corran PH. Determination of L-thyroxine in reference serum preparations as the o-phthalaldehyde-N-acetylcysteine derivative by reversed-phase liquid chromatography with electrochemical detection. J Chromatogr Biomed Appl. 1990;525:287-96.
11. Kazemifard AG, Moore DE, Aghazadeh A. Identification and quantification of sodium-thyroxine and its degradation products by LC using electrochemical and MS detection. J Pharm Biomed Anal 2001; 25:697-711.

12. Siekmann L. Measurement of thyroxin in human serum by isotope dilution mass spectrometry. *Definitive methods in clinical chemistry*. V. *Biolog Mass Spect*. 1987;14:683-8.
13. Holak W, Shostak D. Differential pulse polarographic analysis of thyroid hormone: determination of iodine, thyroxine, and liothyronine. *J Pharm Sci*. 1979; 68:338-42.
14. Armbruster MD, Harris R, Scarbrough R, Tamez C. Total triiodothyronine by fluorescence polarization immunoassay (FPIA). *J Clin Lab Anal*. 1988; 2: 3-6.
15. Kobuke L, Specker JL, Berm HA. Thyroxine content of eggs and larvae of coho salmon, *Oncorhynchus kisutch*. *J Exp Zool*. 1987;242:89-94.
16. Bigos ST, MacLean J, Butler B. Comparison of serum free thyroxine measurements by chemiluminescence and equilibrium dialysis. *J Biolum Chemilum*. 1989; 4:627-34.
17. Waseem A, Yaqoob M, Nabi A. Determination of thyroxine in pharmaceuticals using flow injection with luminol chemiluminescence inhibition detection. *Lumin*. 2006;21:174-8.
18. US Pharmacopeia 28. Validation of compendia methods. United States Pharmacopeal Convention, Rockville, MD, 2005, 2748-51 p.
19. ICH Q2B: Text on validation of analytical procedures methodology (International Conference on Harmonization of Technical Requirements for the Registration of Drugs for Human Use, Geneva, Switzerland, March 1979). Published in *Federal Register*, 62(96), 19 May 1997,27463-7 p.
20. Brasil, RDC N° 10 Anexo V de 2 de Janeiro de 2001, Resolução da Diretoria Colegiada da Agência Nacional de Vigilância Sanitária do Ministério da Saúde. Aprova o Regulamento Técnico para Medicamentos Genéricos e estabelece Guia para validação de Métodos Analíticos. Disponível em: <http://legis.anvisa.gov.br/leisref/public/showAct.php?=19777&word>. Acesso em 20/09/2007.
21. Inmetro (Instituto Nacional de Metrologia. Normalização e Qualidade Industrial). Orientações sobre Validação de Métodos e Ensaios Químicos. DOQ-CGCRE-008, Revisão: 00, 2002, 31 p.
22. Farmacopéia Brasileira 4ª Ed. Uniformidade de Doses Unitárias. Parte II, Primeiro fascículo, Atheneu Editora São Paulo Ltda, 1996.
23. Brasil, RDC n° 214 de 12 de Dezembro de 2006, Resolução da Diretoria Colegiada da Agência Nacional de Vigilância Sanitária do Ministério da Saúde. Dispõe sobre as Boas Práticas de Manipulação de Medicamentos para Uso Humano em farmácias. Disponível em <http://legis.anvisa.gov.br/leisref/public/showAct.php?id=25128&mode=Print>. Acesso em 23/2/2007.
24. Brasil, RDC n° 33 de 19 de abril de 2000, Resolução da Diretoria Colegiada da Agência Nacional de Vigilância Sanitária do Ministério da Saúde. Aprova Regulamento Técnico de Boas Práticas de Manipulação em Farmácias. *Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Poder Executivo*, Brasília, DF, 24 de abril 2000. Seção 1, n° 78-E, p. 27.
25. Brasil, RDC n° 354 de 18 e Dezembro de 2003, Resolução da Diretoria Colegiada da Agência Nacional de Vigilância Sanitária do Ministério da Saúde. Estabelece a manipulação de produtos farmacêuticos em todas as formas farmacêuticas de uso interno, que contenham substâncias de baixo índice terapêutico definidas no Anexo I. Disponível em <http://www.anvisa.gov.br/Legis/resol/2003/rdc/t354?rdc.htm> Acesso em 29/12/03.