

## Scientific Electronic Archives

Issue ID: Sci. Elec. Arch. 8:2 (2015)

June 2015

Article link:

<http://www.seasinop.com.br/revista/index.php?journal=SEA&page=article&op=view&path%5B%5D=173>

Included in DOAJ, AGRIS, Latindex, Journal TOCs, CORE, Discoursio Open Science, Science Gate, GFAR, CIARDRING, Academic Journals Database and NTHRYS Technologies, Portal de Periódicos CAPES.



## Separação e identificação do fármaco nimorazol em comprimidos por cromatografia em camada delgada

### Separation and identification of nimorazole in drugs by thin layer chromatography

D. M. S. Valladão<sup>1\*</sup>, C. R. Andrighetti<sup>1</sup>, A. P. Muller<sup>1</sup>, B. C. Warmling<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Universidade Federal de Mato Grosso – Campus Sinop

\*Author for correspondence: [deniavalladao@gmail.com](mailto:deniavalladao@gmail.com)

**Resumo.** Este trabalho descreve o comportamento cromatográfico do medicamento nimorazol em associação empregando dois adsorventes, vinte e sete fases móveis e quatro agentes de detecção. Nestas condições, a cromatografia em camada delgada permitiu a separação e identificação dos fármacos nimorazol, cloranfenicol e nistatina utilizando uma técnica simples, eficaz e de baixo custo.

**Palavras-chave:** Nimorazol, cromatografia em camada delgada, separação e identificação.

**Abstract.** This paper describes the chromatographic behavior of nimorazole combined medicine employing two adsorbents, twenty-seven four mobile phases and detection agents. Accordingly, the thin layer chromatography allowed the separation and identification of drugs nimorazole, chloramphenicol and nystatin using a simple, effective and inexpensive technique.

**Keywords:** Nimorazole, Thin layer chromatography, Separation and identification

### Introdução

Os agentes quimioterápicos, da classe dos nitroimidazólicos apresentam atividade amebicida, giardicida, tricomonocida (Brunton et al., 2012). Possuem relevância médica no combate às doenças endêmicas no Brasil e em todo mundo, particularmente em locais de superpopulação, pobreza e baixas condições de higiene (Lima, 1992, SanyaL, 1995, Rang & Dale, 2011). Muitos desses fármacos apresentam-se associados a outros fármacos, como antibióticos e antifúngicos.

O mecanismo de ação dessa classe de medicamentos esta associado ao grupo nitro, que se comporta como acceptor de elétrons para proteínas transportadoras de elétrons. As formas reduzidas produzem lesões bioquímicas, tais como a perda da estrutura helicoidal do DNA, ruptura do cordão e inibição resultante da síntese de ácidos nucléicos, que leva à morte da célula do protozoário (Brunton et al., 2012).

O nimorazol, embora possua atividade para protozoários, apresenta interesse clínico para as atividades radiosensibilizantes (Lau et al., 1992,

Freydiere, 1979). Estudos in vitro sugerem que esse fármaco em combinação com radiação, pode atuar sobre células hipóxicas em tumores para aumentar a resposta à terapia antineoplásica (Henk, 2003).

A produção dos medicamentos é garantida pelo controle de qualidade, que deve garantir a identidade, o teor e a pureza dos medicamentos que são produzidos. Os testes oficiais de identificação embora específicos, nem sempre são suficientes para estabelecer prova de identidade absoluta. Por outro lado, estes testes, de maneira geral não são aplicáveis a misturas de substâncias e quando os são apresentam um alto custo devido ao fato de serem utilizados equipamentos sofisticados.

A cromatografia em camada delgada (CCD) é uma das técnicas mais utilizadas para a separação e identificação de produtos sendo amplamente empregada para o controle de qualidade analítico (Collins, 2006; Valladão, 2008; Farmacopeia Brasileira, 2010, Yano, 2011, Kogawa, 2013). A técnica permite a detecção de substâncias que podem estar associadas a outros princípios

ativos, bem como produtos de degradação de princípios ativos, produtos de síntese, solventes residuais, etc. A grande vantagem da CCD é que trata-se de uma técnica simples, flexível e de baixo custo (Collins, 2006; Valladao, 2008).

O nimorazol, apresenta-se associado a outros fármacos, sendo desta maneira, essencial a sua separação para posterior determinação. Não há relatos de trabalhos envolvendo a identificação do nimorazol em produtos farmacêuticos. Os artigos disponíveis na literatura tratam de fármacos relacionados, da classe dos imidazólicos, e que utilizam técnicas instrumentais, necessitando de equipamentos sofisticados, (Begg & Grimmet, 1972, Kamel & Maksoud, 1984, Patel et al., 1998, Kulik, et al., 2011). Dentro desse contexto, o trabalho buscou estabelecer uma metodologia simples, eficiente e de baixo custo para a separação e identificação do nimorazol em preparações farmacêuticas utilizando-se a cromatografia em camada delgada.

## Métodos

### *Fármacos empregados como substância de referência*

Foram utilizados como padrões os fármacos nimorazol, cloranfenicol e nistatina, de grau farmacêutico, fornecidos pelas indústrias farmacêuticas.

### *Preparações comerciais*

Comprimidos contendo nimorazol em associação foram obtidos no comércio. Os comprimidos apresentaram 0,250g de nimorazol; 0,250g de nistatina e 100.000 UI de cloranfenicol.

### *Preparo das amostras*

Os comprimidos contendo nimorazol foram pesados individualmente, calculado o peso médio dos mesmos e então triturados e homogeneizados (Farmacopeia Brasileira, 2010).

Uma amostra correspondendo a 1,0 g de nimorazol foi pesada e tratada com aproximadamente 40,0 mL de metanol (Synth) durante 30 minutos em frasco envolto com papel alumínio em agitador magnético. Em seguida, filtrou-se para balão volumétrico e completou-se o volume para 50,0 mL, obtendo-se soluções com 20,0 mgmL<sup>-1</sup> de nimorazol. Um volume de 5 µL foi aplicado nas cromatoplas fornecendo uma concentração de 100 µg de nimorazol por mancha.

### *Preparo dos padrões*

Foram preparados soluções à 1% em metanol (m/v) dos fármacos padrão (nimorazol, cloranfenicol e nistatina).

### *Adsorventes e preparo das camadas*

Os adsorventes utilizados foram a sílica gel G (Merck) e a celulose microcristalina (Merck). As camadas foram preparadas em espalhador (Desaga), sobre placas de vidro 20x20cm. Após

terem sido preparadas, as camadas foram secas ao ar livre e então ativadas a 105°C – 110°C por 30 minutos no caso da sílica gel G e por 10 minutos, no caso da celulose microcristalina.

### *Fases móveis*

As fases móveis utilizadas (grau analítico, Synth), em desenvolvimento unidimensional ascendente simples, em câmara saturada, foram:

- clorofórmio: metanol: água (20:22:10)
- n-butanol: água: ácido acético (200:200:05)
- acetato de etila: metanol (100:15)
- n-butanol: ácido acético: água (03: 03: 01)
- n-butanol: ácido acético: água (12: 03: 05)
- n-butanol: etanol: água (4:1:5)
- n-butanol: piridina: água (1:1:1)
- clorofórmio: metanol (9:1)
- clorofórmio: metanol: ácido fórmico (90:5:5)
- clorofórmio: metanol: ácido fórmico (90:10:5)
- clorofórmio: metanol: ácido fórmico (90:12:5)
- clorofórmio:metanol:hidróxido de amônio (75:25:1)
- n-butanol: propanol: água (25:50:25)
- clorofórmio: metanol (98:2)
- benzeno: acetona (3:2)
- hexano: acetona: etanol (19:6:1)
- metanol: isopropanol (7:3)
- clorofórmio: acetona: metanol (17:5:1)
- metanol:acetona (1:1)
- clorofórmio: dietilamina (9:1)
- clorofórmio:etanol:dietilamina:água (80:10:10:1)
- acetato de etila:hidróxido de amônio:metanol (10:1:1)
- benzeno: metanol (7:3)
- tolueno: metanol (7:3)
- clorofórmio: metanol: água (180:15:1)
- acetona
- acetato de etila: dietilamina (19:1)

### *Agentes reveladores*

Foram utilizados os agentes reveladores:

- Luz ultravioleta (onda curta e longa)
- Solução etanólica de ácido fosfomolibdico a 5,0% (m/v) seguida de aquecimento a  $\pm 105^{\circ}\text{C}$ ;
- Solução a 5,0% (v/v) de anisaldeído em metanol contendo 5,0% (v/v) de ácido sulfúrico;
- Solução sulfúrica de dicromato de potássio a 5,0% seguida de aquecimento a  $\pm 105^{\circ}\text{C}$  durante 30 minutos (placas de Silicagel GF<sub>254</sub>) e 90°C durante 2 minutos (placas de celulose microcristalina).

### *Aplicação das amostras e padrões*

Foram utilizadas micropipetas de 5µL das soluções padrão e amostras. As diferentes soluções foram aplicadas na linha de partida localizada a 1,5 cm da borda inferior da cromatoplasca e distanciadas 1,5 cm entre si. O desenvolvimento foi ascendente simples, num percurso de 10 cm.

### Resultados e discussão

A identificação de fármacos em preparações farmacêuticas são ensaios fundamentais no controle de qualidade, tendo como principal requisito, a especificidade. A monografia para o fármaco nimorazol matéria prima esta disponível na farmacopeia italiana (Farmacopea, 1996) e é necessário realizar dois ensaios para garantir a identificação do fármaco além de serem necessárias várias etapas para sua realização, o que se perde em especificidade, principalmente em amostras complexas como comprimidos contendo mais de um fármaco, além dos excipientes presentes.

Os resultados obtidos com as fases móveis, com exceção da fase móvel número 17 (metanol: isopropanol), foram válidos apenas para nos direcionar quanto à fase estacionária e aos agentes reveladores, pois nenhuma delas merece destaque esquemático porque as separações efetivas foram obtidas de forma isolada. Quando se

cromatografava a mistura de fármacos havia superposição das manchas.

Com relação às fases estacionárias, as cromatoplasmas de celulose, embora em alguns casos tenha apresentado resultados satisfatórios para o nimorazol, quando associados aos outros fármacos, não o foram, além do tempo de desenvolvimento ser relativamente maior (20-40 minutos para a sílicagel GF<sub>254</sub> e 90-110 para a celulose).

O resultado de algumas das fases móveis utilizando a sílica gel GF<sub>254</sub> é mostrado na Tabela 1.

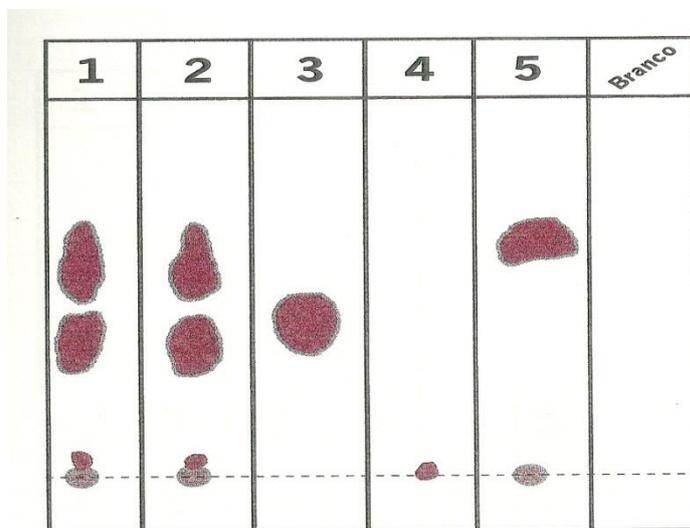
A maior dificuldade no processo de separação dos fármacos entre si foi com relação a nistatina, pois as manchas apresentavam-se difusas, com extensa cauda. A nistatina não pode ser evidenciada pela luz UV quando utilizou-se as fases móveis 25 e 26, provavelmente em função da concentração aplicada, que foi equivalente a que aparece nos comprimidos.

**Tabela 1.** Valores de Rf para algumas das fases móveis utilizadas com as fases estacionárias de sílica gel GF<sub>254</sub>

Fase móvel	Fármacos	Valores de RF
1	Nimorazol Cloranfenicol Nistatina	0,80
		0,71
		0,22
		0,25
		0,95
12	Nimorazol Cloranfenicol  Nistatina	0,83
		0,0
		0,64
		0,0
		0,62
13	Nimorazol Cloranfenicol Nistatina	0,94
		0,54
		0,74
		0,0
		0,35
14	Nimorazol Cloranfenicol Nistatina	0,43
		0,45
		0,53
		0,15 (c)
		0,0
15	Nimorazol Cloranfenicol Nistatina	0,0
		0,47
		0,61
		0,71
		0,37 (c)
16	Nimorazol Cloranfenicol Nistatina	0,0
		0,37
		0,0
		0,67
		0,01
17	Nimorazol Cloranfenicol Nistatina	0,0
		0,08
		0,15
		0,0
		0,10
		0,20
		0,32
0,35		
17	Nimorazol Cloranfenicol Nistatina	0,55
		0,05
		0,05

Das fases móveis estudadas, a única que apresentou uma boa separação, tanto dos fármacos isolados, quanto dos fármacos associados nas preparações comerciais, sendo inclusive promissora para estudos quantitativos foi a fase móvel 17 (metanol: isopropanol; 7:3), como pode ser visto na

Figura 1, uma vez que as manchas se apresentam suficientemente separadas e uniformes em forma e dimensão. Os valores de R<sub>f</sub> para a fase móvel 17 são: 0,05 para a nistatina; 0,35 para o nimorazol e 0,55 para o cloranfenicol.



**Figura 1.** Representação do cromatograma obtido em camada de sílica gel GF<sub>254</sub> pelo desenvolvimento da fase móvel nº 17 (metanol: isopropanol; 7:3), e revelado pela luz UV. B) Branco; 1) amostra comercial; 2) amostra comercial; 3) nimorazol; 4) nistatina e 5) cloranfenicol.

Com relação aos reveladores, a Tabela 2 mostra as cores obtidas das manchas, evidenciando que a luz ultravioleta é o melhor método para revelação, não destruindo a amostra, o que a torna promissora em estudos quantitativos. Outra vantagem da utilização deste método de revelação é o fato de não usar reagentes, o que diminui os gastos numa análise.

Quanto a cromatografia, embora haja necessidade de um padrão específico para comparação, é uma técnica bastante útil para a análise qualitativa de fármacos. O trabalho permitiu a detecção do nimorazol associado a outros fármacos em comprimidos, além de ser uma técnica de baixo custo, rápida, simples e acessível a todos os laboratórios.

**Tabela 2.** Cores das manchas das soluções padrão de princípios ativos contido no medicamento estudado frente aos diferentes reveladores utilizados (diferentes adsorventes e fases móveis)

Fármaco	Ag. Rev. 1 GF <sub>254</sub>	Ag. Rev. 1 celulose	Ag. Rev. 2 GF <sub>254</sub>	Ag. Rev. 2 Celulose	Ag. Rev. 3 GF <sub>254</sub>	Ag. Rev. 3 celulose
Nimorazol	violeta	violeta	amarela	amarela	castanha	castanha
Nistatina	parda	azul claro	cinza escuro	cinza escuro	castanha	castanha
Cloranfenicol	violeta	violeta	cinza	cinza	castanha	castanha

Agente revelador (Ag. Rev.). Ag. Rev. 1: luz ultravioleta, ondas curtas e longas; Ag. Rev. 2: ácido fosfomólibdico; Ag. Rev. 3: dicromato de potássio.

### Conclusão

Com a cromatografia em camada delgada, utilizando o desenvolvimento ascendente simples foi possível separar e identificar os fármacos nimorazol, cloranfenicol e nistatina quando se apresentam associados em comprimidos. Verificou-se que dependendo do (s) fármaco(s) em estudo, podem ser selecionadas outras fases móveis e, optar-se por diferentes reveladores, o que faz com que possamos adequar o processo às disponibilidades do laboratório de trabalho.

Ainda, utilizando-se as fases móveis e estacionárias adequadas é possível associar a cromatografia em camada delgada a outras

técnicas, como por exemplo, a espectrofotometria, e tentar a quantificação desses fármacos.

### Referências

BEGG, C. G., GRIMETT, M. R. The separation and identification of imidazoles by gas-liquid and thin layer chromatography. *Journal of Chromatography* 73 (1): 238-242, 1972.

BRUNTON, L. L., CHABNER, B. A., KNOLLMANN, B. C. Goodman: as bases farmacológicas da terapêutica de Goodman & Gilman. 12. ed. Artmed Porto Alegre, Brasil. 2112 p. 2012.

- COLLINS, C. H., BRAGA, G. L., BONATO, O. S. Fundamentos de cromatografia. Editora da Unicamp Campinas, Brasil. 452 p. 2006.
- FARMACOPEA UFFICIALE DELLA REPUBBLICA ITALIANA. 9.ed. Ministero della Sanita Primo Piano, Italia, p.1138-1140, 1996.
- FARMACOPEIA BRASILEIRA. 5. ed. Brasília: Agência Nacional de Vigilância Sanitária Brasília, Brasil. 2010.
- FREYDIERE, A. M., GILLE, Y., MARCEL, J. P., VINCENT, P. Activité des Nitroimidazoles sur *Clostridium erfringens*. CMI et CMB de cinq Antibiotiques: Metronidazole, Tinidazole, Ornidazole, Nimorazole et Ternidazole. *Medecine et Maladies Infectieuses* 9(10): 533-537, 1979.
- Henk, J. M., Bishop, K., Shepherd, S. F. Treatment of head and neck cancer with CHART and nimorazole: phase II study. *Radiotherapy and Oncology* 66: 65-70, 2003.
- KAMEL, M. Y., MAKSOU, S. A. Microeletrophoretic and chromatofocusing techniques for the quantitative separation and identification of imidazole derivatives. *Journal of Chromatography* 283: 331-340, 1984.
- KOGAWA, A. C., SALGADO, H. R. N. Desenvolvimento de métodos analíticos qualitativos para análise de darunavir comprimidos. *Revista Ciências Farmacêuticas Aplicada Básica* 34 (2): 207-213, 2013.
- KULIK, A., BIALECKA, W., PODOLSKA, M., KWIATKOWSKA-PUCHNIARZ, B., MAZUREK, A. HPLC method for identification and quantification of benzimidazole derivatives in antiparasitic drugs. *Acta Polonica Pharmaceutica – Drug Research* 68 (6): 823-829, 2011.
- LAU, A. H., LAM, N. P., PISCITELLI, S. C., WILKES, L., DANZIGER, L.H. Clinical pharmacokinetics of metronidazole and other nitroimidazole anti-infectives. *Clinical Pharmacokinetics* 23(5): 328-364, 1992.
- LIMA, D. T. Manual de farmacologia clínica, terapêutica e toxicológica. Guanabara Koogan Rio de Janeiro, Brasil. 1992.
- PATEL, Y., DHORDA, U. J., SUNDARESAN, M., BHAGWAT, A. M. Separation and estimation of Five imidazoles by packed column supercritical fluid chromatography. *Analytica Chimica Acta* 362: 271-277, 1998.
- RANG, H. P., DALE, M. M., RITTER, J. M., FLOWER, R. J.; HENDERSON, G. *Farmacologia*. Elsevier Rio de Janeiro, Brasil, 2011.
- SANYAL, S. M., DATTA, A. K., CHAKRABARTI, A. Stability indicating TLC method for the quantification of tinidazole in pharmaceutical dosage forms – I. V. fluid. *Drug Development and industry pharmacy* 18(19): 2095-2100, 1995.
- VALLADÃO, D. M. S., IONASHIRO, M., ZUANON NETO, J. Determinação de fármacos diuréticos por cromatografia em camada delgada e espectrofotometria. *Química Nova* 31(1): 44-46, 2008.
- YANO H. M., GUARDIA, R. C. A., FARIAS, F. F., SANTOS, A. P., AURICCHIO, M. T. Identificação de corticoides e piroxicam por cromatografia em camada delgada em medicamentos manipulados falsificados. *Bepa* 8 (95): 4-13, 2011.