

**DETERMINAÇÃO DE FÁRMACOS DIURÉTICOS EM ASSOCIAÇÃO POR CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA E ESPECTROFOTOMETRIA****Dênia Mendes de Sousa Valladolid\***

Departamento de Engenharia, Campus de Sinop, Universidade do Estado do Mato Grosso, 78850-000 Sinop – MT, Brasil

**Massao Ionashiro e José Zuanon Netto†**

Departamento de Química Analítica, Instituto de Química de Araraquara, CP 355, 14801-970 Araraquara – SP, Brasil

Recebido em 25/10/06; aceito em 5/7/07; publicado na web em 19/12/07

DETERMINATION OF DIURETIC DRUGS BY THIN LAYER CHROMATOGRAPHY AND SPECTROPHOTOMETRY. A rapid, sensitive and reliable thin-layer chromatography/spectrophotometry screening procedure was developed for quantitative determination of diuretics associated in pharmaceutical dosage forms. The chromatographic method employed microcrystalline cellulose and butanol : acetic acid : water (4:1:1) or amilic alcohol : ammonium hydroxide 25% (9:1) as mobile phases and detection by U.V. light. The drugs were extracted using a simple procedure and were quantified by U.V. spectrophotometry. Results varied from 97.5 to 102.5% and are similar to those obtained by conventional methods. This method of quantification of diuretics is promising for quality control of drugs.

Keywords: thin layer chromatography; quality control; diuretics.

**INTRODUÇÃO**

Diuréticos são fármacos que aumentam a eliminação de eletrólitos (especialmente sódio e íons cloreto) e água. Esses fármacos são utilizados no tratamento de edemas resultantes de uma variedade de causas, como por exemplo insuficiência cardíaca congestiva, síndrome nefrótica, doenças crônicas do fígado, em associação à hipertensão, hipercalcemia, diabetes, glaucoma etc<sup>1</sup>.

Os diuréticos comercialmente disponíveis são as tiazidas, os de alça e poupadores de potássio. Os diuréticos poupadores de potássio são considerados com fraco poder diurético, apresentando-se normalmente associados a outros diuréticos, com a finalidade de diminuir a depleção de potássio<sup>1</sup>.

A identificação e quantificação desses compostos apresenta grande importância na indústria farmacêutica.

A associação de diuréticos em formas farmacêuticas tem sido analisada por vários métodos, incluindo espectroscopia de absorção na região do ultravioleta e visível, amperometria, titulometria, todos envolvendo longo tempo de extração<sup>2-6</sup>.

Existem muitos métodos cromatográficos descritos para separação, detecção e medida quantitativa para agentes diuréticos individuais, apenas para fluidos biológicos. Estes métodos incluem a cromatografia gasosa, cromatografia gás-líquido<sup>7</sup>, cromatografia gasosa – espectrometria de massa<sup>8</sup> e cromatografia líquida de alta eficiência, sendo essa a que apresenta maior interesse na determinação de preparações farmacêuticas<sup>9,10</sup>. Publicações envolvendo a cromatografia em camada delgada restringem-se a testes qualitativos<sup>11</sup>.

Considerando a dificuldade de análise de fármacos diuréticos em associação em preparações farmacêuticas e o alto custo que envolve as análises, este trabalho objetivou estabelecer uma metodologia simples, eficiente e de baixo custo para a quantificação de fármacos diuréticos combinados, utilizando-se a cromatografia em camada delgada e a espectrofotometria.

**PARTE EXPERIMENTAL****Soluções padrão**

As soluções padrão de furosemida, hidroclorotiazida, espirolactona e cloridrato de amilorida foram preparadas em metanol em várias concentrações e então construídas suas curvas de calibração usando a espectrofotometria na região do ultra-violeta, com Espectrofotômetro Carlzeiss – Jena, Modelo Specord M 40.

**Amostras: comprimidos diuréticos obtidos no comércio**

*Furosemida – Espironolactona (Amostra A):* furosemida - 20 mg; espirolactona - 100 mg; excipiente - 380 mg.

*Furosemida – Cloridrato de Amilorida (Amostra B):* furosemida - 40 mg; cloridrato de amilorida - 10 mg; excipiente - 210 mg.

*Hidroclorotiazida – Espironolactona (Amostra C):* hidroclorotiazida - 50 mg; espirolactona - 50 mg; excipiente - 170 mg.

*Hidroclorotiazida – Cloridrato de Amilorida (Amostra D):* hidroclorotiazida - 50 mg; espirolactona - 5 mg; excipiente - 195 mg.

**Condições cromatográficas***Adsorvente*

A fase estacionária utilizada foi a de celulose microcristalina (Merck) preparada pela suspensão de 25 g para 90 mL de água destilada. As placas foram preparadas com auxílio de um espalhador regulável 0-2 mm (Desaga), sobre placas de vidro 20 x 20 cm. Uma vez preparadas foram secas ao ar por cerca de 2 h e então ativadas em estufa regulada entre 105 e 110 °C por um período de 10 min.

*Desenvolvimento*

As cromatoplasmas foram desenvolvidas em cubas de vidro 22 x 22 x 10 cm, que continham as fases móveis adequadas ao experi-

†In memoriam

\*e-mail: denia\_mv@hotmail.com

mento, num percurso de 10 cm, em um desenvolvimento unidimensional ascendente simples, em câmara saturada.

#### Fases móveis

As fases móveis foram escolhidas baseadas na melhor separação dos fármacos<sup>11</sup>, onde:

**Fase Móvel 1:** butanol: ácido acético glacial: água (4:1:1) v/v, utilizada para a análise das amostras B, C e D.

**Fase Móvel 2:** álcool amílico e hidróxido de amônio 25%, (9:1) v/v, utilizada para a análise da amostra A.

#### Agente revelador

A revelação foi feita pelo método físico da luz ultravioleta (onda curta e longa).

#### Preparo da amostra

Foi feita uma amostragem dos comprimidos, de maneira a obter o peso médio dos mesmos<sup>12</sup>; em seguida, as amostras foram pulverizadas e homogeneizadas e, então, tratadas com metanol, sob agitação por 15 min. Seguiu-se ainda, uma filtração.

#### Aplicação das amostras e padrões

As soluções padrão e as amostras foram aplicadas na linha de partida, localizada a 1,5 cm da borda inferior da cromatoplaça e distanciadas 1,5 cm entre si. As aplicações foram realizadas com auxílio de micropipetas de volume fixo.

#### Padronização

Foram elaboradas duas curvas de calibração: uma direta, a qual não passou pelo processo cromatográfico, e outra cromatografada, com soluções padrão dos fármacos em diversas concentrações, variando de 0–20 µg mL<sup>-1</sup>. Todos os ensaios foram realizados em triplicata.

#### Quantificação

Para a determinação dos fármacos, as concentrações usadas foram:

Amostra A : furosemida 4 µg mL<sup>-1</sup> – espironolactona 10 µg mL<sup>-1</sup>;  
Amostra B : furosemida 8 µg mL<sup>-1</sup> – cloridrato de amilorida 2 µg mL<sup>-1</sup>;  
Amostra C : hidroclorotiazida 4 µg mL<sup>-1</sup> – espironolactona 4 µg mL<sup>-1</sup>;  
Amostra D : hidroclorotiazida 10 µg mL<sup>-1</sup> – cloridrato de amilorida 2 µg mL<sup>-1</sup>;  
Solução padrão de furosemida : 4 e 8 µg mL<sup>-1</sup>;  
Solução padrão de hidroclorotiazida: 4 e 10 µg mL<sup>-1</sup>;  
Solução padrão de espironolactona: 4 e 10 µg mL<sup>-1</sup>;  
Solução padrão de cloridrato de amilorida: 2 µg mL<sup>-1</sup>.

A localização, realizada através da luz UV, e retirada do fármaco isolado pela cromatografia foi a base para a quantificação. Transferiu-se a parte da camada contendo o fármaco diretamente para tubos de centrífuga com tampa, com capacidade para 15 mL, adicionadas de 10 mL de metanol e então centrifugados a 1000 rpm por 2 min. O líquido sobrenadante foi transferido para cubeta de 1 cm e procedeu-se a leitura espectrofotométrica em comprimento de onda de 271 nm para furosemida, 273 nm para hidroclorotiazida,

238nm para a espironolactona e 286 nm para o cloridrato de amilorida, que são os comprimentos de onda onde a absorbância é máxima<sup>12</sup>. A Figura 1 mostra o esquema utilizado para a quantificação dos fármacos.

Ainda foi realizada a determinação dos fármacos padrão, nas mesmas concentrações das amostras, utilizando-se apenas a espectrofotometria (UV) para efeito de comparação dos resultados com aqueles obtidos pelo método proposto (cromatografia-espectrofotometria).

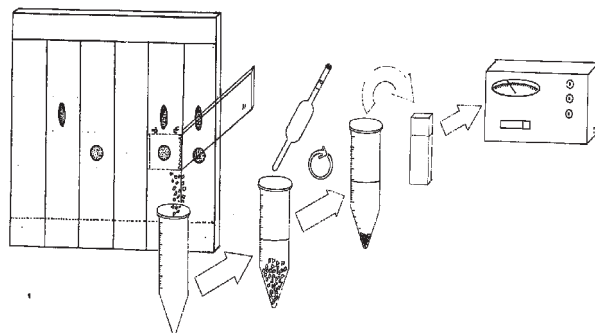


Figura 1. Esquema de quantificação dos fármacos diuréticos em associação

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Para definição do sistema cromatográfico, o principal quesito foi o estabelecimento do adsorvente a ser utilizado, uma vez que a recuperação dos fármacos para posterior quantificação era de primordial importância. Optou-se pela celulose microcristalina, pois foi o adsorvente que atendeu às exigências da metodologia proposta.

Com relação às soluções padrão dos fármacos puro, foi construída uma curva de calibração (usando somente a espectrofotometria), e outra cromatografada (utilizando a cromatografia-espectrofotometria), que apresentou uma correlação linear entre absorbância e concentração do fármaco na faixa de 2 a 20 µg mL<sup>-1</sup>, de acordo com a Lei de Lambert-Beer. Os dados destas curvas encontram-se na Tabela 1. As concentrações usadas para as análises dos fármacos associados foram baseadas na linearidade da curva de calibração e no tamanho das manchas<sup>11</sup>. Na Tabela 2, verificam-se os valores de  $R_f \times 100$  para os fármacos estudados nas condições realizadas para o experimento.

A Tabela 3 apresenta os valores de absorbância das soluções padrão dos fármacos estudados utilizando-se apenas a espectrofotometria (UV) e os valores obtidos pelo método proposto (cromatografia-espectrofotometria), onde se verifica que os dados são concordantes, demonstrando que o método pode ser utilizado.

Os ingredientes ativos das amostras foram calculados como uma função da curva de calibrações e da fórmula  $C_A = C_p \times A_A/A_p$ , respectivamente, correspondendo às concentração da amostra e do padrão, absorbâncias da amostra e do padrão, após subtração da absorbância do branco<sup>12</sup>.

A Tabela 4 apresenta os resultados de concentração dos fármacos obtidos nas preparações farmacêuticas que se apresentam em associação (amostras), verificando-se que os valores concordam com os das

Tabela 1. Valores de  $R_f \times 100$  dos fármacos estudados utilizando a celulose microcristalina e suas fases móveis

Fármacos/ Fases Móveis	Furosemida	Hidroclorotiazida	Espironolactona	Cloridrato de amilorida
1	89	58	97	37
2	5	Ponto de partida	93	Ponto de partida

**Tabela 2.** Dados experimentais obtidos das curvas de calibração das soluções padrão, utilizando a espectrofotometria na região do UV

	Furosemida	Hidroclorotiazida	Espironolactona	Cloridrato de amilorida
Faixa de concentração	0 – 20 µg mL <sup>-1</sup>	0 – 20 µg mL <sup>-1</sup>	0 – 12 µg mL <sup>-1</sup>	0 – 10 µg mL <sup>-1</sup>
λ (nm) de leitura	271	273	238	286
Equações de regressão: y = a + bx				
(a)	-0,01239 (-0,01886)*	0,00431 (0,00561)*	0,00121 (0,00160)*	-0,00179 (-0,00198)*
(b)	0,06068 (0,06001)*	0,04826 (0,04436)*	0,05087 (0,05063)*	0,05360 (0,05033)*
Coefficiente de regressão	0,9997 (0,9986)*	0,9994 (0,9980)*	0,9986 (0,9967)*	0,9998 (0,09986)*

\* os valores entre parênteses referem-se às curvas de calibração cromatografadas

**Tabela 3.** Valores de absorbância de soluções padrão de fármacos diuréticos utilizando-se o método da espectrofotometria e da cromatografia-espectrofotometria

Fármaco	Concentração (µg mL <sup>-1</sup> )	Valor de Absorbância Espectrofotometria	Valor de Absorbância Cromatografia-Espectrofotometria
Furosemida	4	0,2392	0,2362
	8	0,4710	0,4708
Hidroclorotiazida	4	0,1900	0,1880
	10	0,5245	0,5183
Espironolactona	4	0,2075	0,2060
	10	0,5292	0,5243
Cloridrato de amilorida	2	0,1194	0,1146

**Tabela 4.** Concentração encontrada nos fármacos em associação

Fármacos	Concentração Teórica (µg mL <sup>-1</sup> ) - %		Concentração Obtida (µg mL <sup>-1</sup> ) - %	
AMOSTRA A	4	100	3,99	99,7
Furosemida	10	100	9,99	99,9
Espironolactona				
AMOSTRA B				
Furosemida	8	100	7,98	99,8
espironolactona	2	100	2,05	102,5
AMOSTRA C				
Hidrolorotiazida	4	100	4,06	101,5
Espironolactona	4	100	3,91	97,8
AMOSTRA D				
Hidroclorotiazida	10	100	10,1	101,0
Cloridrato de amilorida	2	100	2,00	100

soluções padrão (tanto os obtidos diretamente pela espectrofotometria, como os obtidos pela cromatografia-espectrofotometria), o que torna o método promissor quanto a sua aplicação.

De maneira geral, as monografias oficiais estabelecem uma faixa compreendida entre 95–105% para produtos acabados<sup>12</sup> e, considerando que os ensaios foram obtidos em função da quanti-

dade de ingrediente ativo nos medicamentos, verificou-se através da Tabela 4 que as formulações se encontram dentro dos padrões oficiais.

A principal vantagem da quantificação desses fármacos associados, pela cromatografia – espectrofotometria é o baixo custo e a possibilidade de analisar preparações farmacêuticas que apresentem mais de um componente ativo, num tempo relativamente curto, comparado com outras técnicas.

## CONCLUSÃO

O método proposto é aplicável para a determinação de fármacos diuréticos em associação e nenhuma interferência foi observada com relação aos excipientes utilizados pelas indústrias farmacêuticas.

O método cromatografia - espectrofotometria apresenta vantagens em relação a outras técnicas, uma vez que permite a quantificação de múltiplos ingredientes ativos com precisão adequada, num curto período de tempo, além do seu baixo custo.

A metodologia apresenta resultados satisfatórios e promissores no que se refere à sua aplicação no controle de qualidade de medicamentos.

## AGRADECIMENTOS

Ao CNPq pelo apoio financeiro.

## REFERÊNCIAS

- Goodman, L. S.; Gilman, A.; *As bases farmacológicas da terapêutica*, 10ª ed., Guanabara Koogan : Rio de Janeiro, 2003.
- Belal, F.; Ibrahim, F.; El Brashy, A.; *Analyst* **1988**, *113*, 637.
- Erk, N.; *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2001**, *24*, 603.
- Gotardo, M. A.; Pezza, L.; Pezza, H. R.; *Eclat. Quim.* **2005**, *30*, 17.
- Magalhães, J. F.; Piro, M. G.; *Rev. Bras. Cienc. Farm.* **1971**, *8*, 273.
- Carda-Broch, S.; Esteve-Romero, J.; Ruiz, A. M. J.; Garcia, A. C. M. C.; *Analyst* **2002**, *127*, 29.
- Degen, P. H.; Schweizwe, A.; *J. Chromatogr.* **1977**, *142*, 549.
- Sanz -Nebot, V.; Toro, I.; Bergés, R.; Ventura, R.; Segura, R.; Barbosa, J.; *J. Mass Spectrom.* **2001**, *36*, 652.
- Seemaan, F. S.; Santos Neto, A. J.; Lanças, F. M.; Cavalheiro, E. T. G.; *Anal. Lett.* **2005**, *38*, 1651.
- Ruddy, D.; Sherma, J.; *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.* **2002**, *25*, 321.
- Valladão, D. M. S.; Zuanon Netto, J.; Ionashiro, M.; *Eclat. Quim.* **1994**, *19*, 57.
- US Pharmacopeial Convention, INC; *United States Pharmacopeia- The National Formulary XXXIII*, Twinbrook Parkway: Rockville, 1995.