

Productos naturales

Instituto Cubano de Investigaciones de Derivados de la Caña de Azúcar

Estudio del grado de pureza de la nitrofurazona obtenida a partir de un derivado de la industria cañera cubana

Adolfo L. Brown Gómez,¹ Calixto Díaz de Arce,² Grolamys Castillo Portela,³ Mauricio Rivas García,⁴ Mercedes Díaz Lusbet⁵ y Arelys Rodríguez Padrón⁵

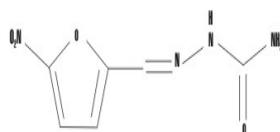
RESUMEN

Se estudió el grado de pureza a diferentes lotes de nitrofurazona sintetizados en el Instituto Cubano de Investigaciones de Derivados de la Caña de Azúcar (ICIDCA) mediante la combinación de 3 técnicas analíticas: la cromatografía de placa delgada, la cromatografía líquida de alta resolución y la calorimetría diferencial de barrido. Se obtuvieron resultados satisfactorios que permiten evaluar la calidad de los productos y compararlos con productos competitivos a escala comercial con purezas entre el 98 y 100 %

Palabras clave: Grado de pureza, nitrofurazona, calorimetría diferencial de barrido.

Al primer derivado de la serie nitrofuránica que encontró aplicación práctica en la medicina como bactericida se le dio el nombre de nitrofurazona. La forma terminada más utilizada es como tópico hidrosoluble y se vende bajo diferentes marcas (amifur, furacin, chemofuran, furesol).^{1,2}

Su fórmula global es $C_6H_6N_4O_4$; presenta un peso molecular de 198,14 g/mol y su composición atómica es de C: 36,37 %, H: 3,05 %, N:28,28 %, O: 32,30 % siendo su estructura química la siguiente:



Estructura

En Cuba fue programada su producción en un marco de 5 años,^{3,4} a pesar de que ha disminuido su consumo en el país debido a la introducción en el mercado de la sulfadiazina de plata.⁵

Este producto se presenta como un sólido de agujas amarillas que descomponen entre 236 y 240 °C, y oscurece después de una prolongada exposición a la luz. Entre sus aplicaciones presenta un amplio espectro de acción prolongada sobre la mayoría de las bacterias que provocan infecciones sobre las superficies de la piel y mucosas, lo que facilita la cicatrización de heridas y quemaduras al evitar la sobre infección bacteriana y daño tisular.

Desde 1989, el Instituto Cubano de Investigaciones de los Derivados de la Caña de Azúcar (ICIDCA), desarrolló una tecnología de producción de nitrofurazona⁶ y sus intermediarios^{7,8} que fue actualizada y recogida en un paquete tecnológico. Las informaciones bibliográficas y de patentes acopiadas en el periodo 1982-2003 en una búsqueda realizada en el Chemical Abstract Service y el motor de búsqueda SCIRUS sobre el fármaco, está recogida en un documento⁹ contenido en el Dossier de esa tecnología y posteriormente se hizo una separata con la información referida a los procedimientos analíticos.

El objetivo del presente trabajo es hacer un análisis de la pureza de los lotes producidos y comparar los resultados con los del principio activo comercial importado de China y una muestra patrón entregada por la Empresa Médico Farmacéutica de Cuba para anexar así, al paquete tecnológico, los resultados de una serie de lotes de nitrofurazona según la tecnología propuesta. Estos deben contar con la calidad requerida con vistas a una futura validación según las exigentes normas de las Farmacopeas de Estados Unidos e Inglaterra, de modo que puedan quedar homologados con los análogos que se ofertan en el mercado internacional.

La cromatografía de placa delgada (TLC) ha resultado ser un método sencillo y rápido. Como técnica analítica resulta de gran utilidad para establecer el control durante el desarrollo de una síntesis y definir la relación de componentes de una mezcla.¹⁰ Esta técnica permitió identificar primero y cuantificar después con la ayuda de la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) el grado de pureza del producto,¹¹ parámetro este que comprobará mediante el auxilio de la calorimetría diferencial de barrido (DSC), técnica termo analítica ampliamente utilizada en la detección de intermediarios e impurezas que puedan afectar la calidad del producto final.^{12,13}

MÉTODOS

La nitofurazona se sintetiza a partir de 5-nitrofurfural (698-63-5) y clorhidrato de semicarbazida (563-41-7) con altos rendimientos. Su nombre químico es 2-[(5 nitro-2-furanyl) methylene]-hydrazinecarboxamide o 5- nitro-2-furaldehyde semicarbazone.

Se utilizaron como patrones, una muestra de nitofurazona suministrada por el Laboratorio Farmacéutico “Roberto Escudero” (RE) y un producto comercial chino. Como muestras se estudiaron las sintetizadas en los laboratorios de Química Fina del ICIDCA (lote 3, 5, 6 y nuevo).

Cromatografía de Placa Delgada (TLC)

Cámaras: cubetas de vidrio 21x 21x 9 cm
Fase móvil: etanol.metanol.agua (60.20.20)
Fase estacionaria polar: sílica gel G-60
Revelador: P-dimetilaminobenzaldehido
Proceso cromatográfico: absorción.
Disolvente: acetona
Placas de 20 x 20 cm

Se utilizó una técnica ascendente monodimensional con desarrollo simple. 14 Se pesó en balanza analítica microanalítica 5 mg de muestra y se disolvió en 1 mL de acetona

analítica para una concentración de 5 mg/mL. Se aplicaron 5 µL por muestra. Se utilizó una lámpara Universal CAMAG con posibilidad de hacer observaciones de fluorescencia de UV a 254 y 366 nm.

HPLC

Se realizó un estudio de sensibilidad del sistema de manera que el pico principal en el cromatograma obtenido no fuese menor que el 50 % a escala completa del registrador. Se probaron distintos valores de rangos: 0,2; 0,1; 0,05 y 0,02 a respuesta 0,5, y se concluyó ajustar el rango a 0,02.

Se preparó la curva patrón de nitrofurazona con 3 puntos a las concentraciones siguientes: 0,00478; 0,00239; 0,00048 mg/mL. Se obtuvo un tiempo de retención medio de 2,75 min para n= 9 y el coeficiente de correlación fue de 0,999952.

Para utilizar el patrón en HPLC se pesaron 1,025 mg de la nitrofurazona y se disolvieron en 10 mL de la fase móvil. Después se realizó una posterior dilución tomándose de esta 0,5 mL en 10 mL de la fase móvil. Posteriormente se filtró por filtro de jeringuilla ISO DISC de 0,45 µm para realizar la inyección al cromatógrafo y se almacenó en frasco de color ámbar. Para la preparación de la fase móvil se utilizó: agua grado HPLC y acetonitrilo grado HPLC.

Los análisis mediante HPLC se realizaron en un Welichrom Knauer, formando por una bomba K-1001, un organizador de solventes K-1500 y un detector de arreglo de diodos K-2800.

Se empleó una fase móvil compuesta de acetonitrilo:agua (40:60), a un flujo de 1 mL/min, para lo que se utilizó una columna Hypersil ODS (5 µm, 25 x 0,4cm)TEKNOKROMA (No. de serie: C 25373); la detección se fijó a una longitud de onda de 310 nm.

DSC

Los registros del producto final fueron obtenidos a partir de un calorímetro diferencial de barrido TA 4000, suizo de la METTLER.

Se emplearon crisoles de aluminio en la evaluación del punto de fusión y el grado de pureza, con un rango de temperatura entre 30 y 400 °C a una velocidad de calentamiento de 10 0 C/min tomando como masa 5 mg del producto analizado en régimen dinámico.

Para la evaluación del grado de pureza a partir de la DSC se utilizó la ecuación (1) de Van / t Off,¹⁵ teniendo en cuenta la masa molecular del material estudiado y su temperatura de fusión según:

$$T_f = T_o - X_2 (R \times T_o^2 \Delta H_f) \quad (1)$$

donde:

T_f: temperatura de la muestra en un instante dado.

T_0 : temperatura de fusión de la sustancia pura

X_2 : fracción molar del segundo componente (impurezas)

R: constante de los gases(8,314 j/mol K)

ΔH_f : calor molar de fusión del componente principal.

RESULTADOS

Se demuestra a partir de la caracterización físico-química la eficiencia de la síntesis en la obtención de nitrofurazona.

Los resultados alcanzados por TLC demuestran la eficiencia de esta técnica a la hora de detectar a partir del valor de R_f la presencia de impurezas y la presencia del producto de interés; mostró los mejores resultados en cuanto a pureza el lote 6. Estos, fueron comparados con los resultados obtenidos a partir de HPLC y se corroboraron los criterios de pureza; el de mejor calidad resultó el lote antes mencionado.

Las técnicas de DSC demostraron que los valores de pureza son elevados y que el patrón chino tal y como se detecta por TLC y HPLC es el patrón de mejor pureza.

El estudio estadístico corrobora la reproducibilidad y eficiencia de las técnicas aplicadas en este tipo de estudios.

DISCUSIÓN

En nuestro estudio el comportamiento de elusión para la sustancia preparada estará dado por los valores de R_f^{16} que en el caso particular de la nitrofurazona esta asociado con un valor calculado para el patrón comercial de $R_f \approx 0,8$ en el sistema de solvente empleado.

Se procedió a la aplicación de la muestras según la técnica de TLC, los cromatogramas muestran los valores de R_f que aparecen reportados en la tabla 1 y la figura 1.

Tabla 1. Resultados alcanzados por TLC con sus R_f calculados

Muestras analizadas	Valor de R_f calculado
Nitrofurazona patrón	0,72
Lote 3 de nitrofurazona	0,77
Lote 5 de nitrofurazona	0,79
Lote 6 de nitrofurazona	0,80
Lote nuevo	0,80
Patrón comercial chino	0,78

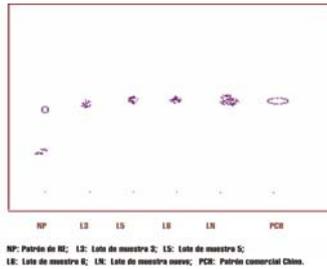


Fig.1. TLC de nitrofurazona.

A 254 nm en UV, las muestras mostraron una mancha bien definida con una coloración violeta-oscuro. A 366 nm para todos los casos, aparece una mancha amarillo-naranja. Los valores de R_f reportados en la tabla 1 y la ausencia de trazas en las muestras exceptuando el patrón NP, son evidencias de que el producto cumple con las especificaciones de calidad requeridas como se refleja en la figura 1 y en los datos que se alcanzaron por HPLC y que aparecen reportados en la tabla 2.

Tabla 2. Resultados del grado de pureza alcanzados por HPLC para las distintas muestras de nitrofurazona

Muestras	Grado de pureza (%)
Nitrofurazona patrón (RE)	93,73
Lote 3	98,50
Lote 5	99,20
Lote 6	99,50
Lote nuevo	99,20
Patrón comercial chino	98,80

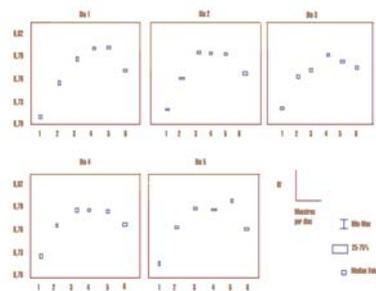


Fig. 2. Comportamiento de las muestras durante 5 días a partir de los valores de R_f .

Los valores alcanzados demuestran la calidad del producto obtenido a partir de la síntesis realizada en el ICIDCA para los diferentes lotes; el lote 6 fue el de mejor comportamiento en cuanto a grado de pureza. Coincide en todos los métodos aplicados que el menor valor de pureza reportado corresponde al patrón aportado por el laboratorio “Roberto Escudero”; el patrón comercial chino fue el más indicado a tomar como referencia.

Mediante HPLC se realizó un estudio de la pureza del patrón NP y se obtuvo un valor promedio de 93,73 %, lo cual se explica por la presencia de una traza detectada en TLC 14 asociada con un valor de $R_f \approx 0,24$.

Los análisis de las muestras estudiadas aportaron los resultados reportados en la tabla 2.

Los valores alcanzados demuestran la calidad del producto obtenido a partir de la síntesis realizada en el ICIDCA para los diferentes lotes; el lote 6 fue el de mejor comportamiento en cuanto a grado de pureza. Coincide en este caso que el valor más bajo de pureza corresponde al patrón aportado por el Laboratorio “Roberto Escudero”; nuevamente el patrón comercial chino fue el más indicado como referencia .

Los resultados de pureza alcanzados después del análisis de los termogramas por DSC en un intervalo de temperatura entre 237,2 y 238,5 °C aparecen en la tabla 3.

Tabla 3. Resultados de grados de purezas alcanzados para cada muestras por DSC

Muestras	Grado de pureza (%)
Nitrofurazona patrón	94,5
Lote 3	98,6
Lote 5	99,25
Lote 6	99,55
Lote nuevo	99,20
Patrón comercial chino	98,9

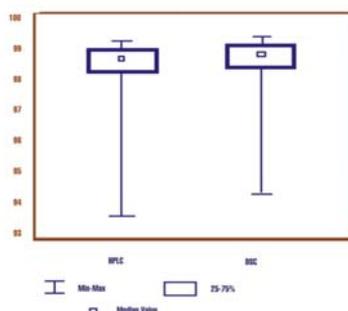


Fig. 3. Comparación de las técnicas HPLC y DSC.

Una vez más pudo corroborarse que el lote 6 resulta ser el de mejor calidad en términos de purezas y que el patrón aportado por el Laboratorio Farmacéutico “Roberto Escudero” presenta algunas impurezas muy probablemente eliminables mediante un proceso de recristalización de la muestra. Nótese que para las 3 técnicas aplicadas (TLC, HPLC y DSC), esta muestra mostró el valor más bajo reportado en cuanto a pureza. Cabe destacar que para las muestras sintetizadas en el ICIDCA los valores del grado de purezas se mantuvieron para las 3 técnicas dentro de un intervalo entre 98,5 y 99,2 %, tal y como se reporta en las tablas 2 y 3, aunque puede llegarse a un criterio semejante tomando en cuenta los valores de R_f reportados en la tabla 1.

Un análisis estadístico de los resultados alcanzados permite llegar a conclusiones muy favorables en relación con el método de trabajo empleado con las muestras y con las

técnicas aplicadas para el estudio. A continuación se muestra el comportamiento de las muestras objeto de estudio analizadas durante 5 días consecutivos, tabla 4, figura 2 (indican las tendencias que siguen las muestras).

Tabla 4. Resultados de R_f alcanzados durante 5 días consecutivos al aplicar TLC

Muestras	Rf 1	Rf 2	Rf 3	Rf 4	Rf 5	Media	DE	CV (%)
Nitrofurazona patrón	0,71	0,72	0,72	0,73	0,72	0,72	0,0070	0,97
Lote 3	0,76	0,77	0,77	0,77	0,77	0,768	0,	0,
Lote 5	0,79	0,80	0,78	0,79	0,79	0,79	0,0070	0,89
Lote 6	0,80	0,80	0,80	0,79	0,79	0,796	0,0054	0,68
Lote nuevo	0,80	0,80	0,79	0,79	0,80	0,796	0,0054	0,68
Patrón comercial chino	0,78	0,78	0,78	0,78	0,77	0,778	0,0044	0,56

En este caso para describir el comportamiento de valores de R_f vs día, se llamarán:

Muestra 1: a la nitrofurazona patrón (RE).

Muestra 2: al lote 3

Muestra 3: al lote 5

Muestra 4: al lote 6

Muestra 5: al lote nuevo

Muestra 6: patrón comercial chino.

Observando la distribución de las muestras en función de los días y los valores de R_f asociados con ellas, se puede apreciar un comportamiento muy similar. Se destacan la muestra 1 por tener valores de R_f inferiores al resto. Tomando estos criterios, se puede concluir que nuestros resultados presentan una aceptable reproducibilidad al variar los días de experimentación.^{7,18}

Si se establece una comparación de los resultados alcanzados empleando como técnicas HPLC y DSC durante 5 días consecutivos se llega a los valores que aparecen en las tablas 5 y 6.

Tabla 5. Resultados de purezas (%P) alcanzados durante 5 días consecutivos por HPLC

Muestras	% P 1	% P 2	% P 3	% P 4	% P 5	Media	DE	CV (%)
Nitrofurazona patrón	93,72	93,73	93,73	93,60	93,66	93,688	0,0572	0,06
Lote 3	98,51	98,50	98,50	98,50	98,51	98,504	0,0055	0,01
Lote 5	99,20	99,19	99,19	99,20	99,20	99,196	0,0055	0,01
Lote 6	99,5	99,5	99,5	99,5	99,5	99,5	0	0
Lote nuevo	99,20	99,20	99,18	99,19	99,20	99,194	0,0089	0,01
Patrón comercial chino	98,79	98,80	98,80	98,80	98,80	98,798	0,0044	0,004

Tabla 6. Resultados de purezas alcanzados a partir de los termogramas por DSC para una misma muestra durante 5 días

Muestras	%P 1	%P 2	%P 3	%P 4	%P 5	Media	DE	CV (%)
Nitrofurazona patrón	94,5	94,27	94,46	94,50	94,48	94,442	0,0976	0,10

Lote 3	98,52	98,57	98,6	98,57	98,6	98,572	0,0327	0,03
Lote 5	99,25	99,28	99,25	99,28	99,25	99,262	0,0164	0,02
Lote 6	99,56	99,56	99,57	99,54	99,57	99,56	0,0122	0,01
Lote nuevo	99,20	99,22	99,20	99,20	99,23	99,21	0,0141	0,01
Patrón comercial chino	98,90	98,90	98,89	98,90	98,90	98,898	0,0044	0,004

De igual forma no se aprecian diferencias significativas en los valores reportados en la tabla 5.

Si se logra relacionar estos resultados (HPLC y DSC) en la figura 3, se podrá conocer el comportamiento que siguen las muestras a partir de las potencialidades de ambas técnicas de análisis.

En la figura 3 se observa que las 2 cajas de bigotes correspondientes a cada técnica analítica son muy similares. Ambas presentan la mediana desplazada hacia la cota superior, por lo que se llega a la conclusión de que los resultados no difieren significativamente. Los valores alcanzados por DSC muestran una variedad un poco menor.

En conclusión, las técnicas analíticas utilizadas (TLC, HPLC y DSC) resultan de gran utilidad a la hora de evaluar el grado de pureza de un producto terminado. El lote 6 de nitrofurazona alcanzó valores de pureza superiores al resto de los productos evaluados, los que son competitivos con el valor establecido a escala comercial. Los resultados alcanzados permiten dar criterios acerca de la reproducibilidad de las técnicas utilizadas en nuestros estudios. En análisis de productos terminados suelen darse como buenos los coeficientes de variación inferiores al 4-5 % en el ensayo de reproducibilidad, por lo que el resultado de los métodos evaluados puede considerarse satisfactorio.

SUMMARY

Study of the purity degree of Nitrofurazone obtained from a Cuban sugar cane industry byproduct

The purity degree of different Nitrofurazone batches synthesized in ICIDCA was studied using combination of three analytical techniques: the Thin Layer Chromatography (TLC), High Performance Liquid Chromatography (HPLC) and Differential Scanning Calorimetry (DSC). Positive results were obtained that permit to evaluate quality of products and to compare them with competitive products at a market scale with 98 and 100 % purity degree.

Key words: Purity degree, Nitrofurazone, Differential Scanning Calorimetry.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Díaz de Arce C. Paquete tecnológicos para la producción de nitrofurazona. La Habana : Editorial ICIDCA; 2003.
2. The Merck Index. 11th ed. New York : Merck; 1989.
3. Grigat, H. Und Stein. M. Therapy and toxicology in human and animal. Dtsc. Apth Ztg. 1996;136(6):28-30, 33-4, 37.

4. GEQF. Listado de principios activos y aditivos necesarios para la producción de medicamentos. La Habana : GEQF; 2001. p. 6.
5. Centro para el Desarrollo de la Farmacoepidemiología. MINSAP. Formulario Nacional de Medicamentos. La Habana : Editorial Ciencias Médicas; 2003.
6. Castro I. Protocolo de sustancias activas y precursores. Nitrofurazona, Informe Interno. La Habana : Editorial ICIDCA; 1989. p. 20.
7. _____. Protocolo de sustancias activas y precursores. Clorhidrato de semicarbazida. Informe Interno. La Habana : Editorial ICIDCA; 1989 a . p. 15.
8. _____. Protocolo de sustancias activas y precursores. 5 nitrofururaldiacetato. Informe Interno. La Habana : Editorial ICIDCA; 1989 b. p. 21.
9. Díaz de Arce C. Búsquedas bibliográficas sobre aspectos analíticos de la nitrofurazona. Informe Interno. La Habana : Editorial ICIDCA; 1982-2003.
10. Espí Lacomba N. Métodos de separación y concentración. Tomo II. La Habana : Universidad de La Habana , Facultad de Química, ENPES ; 1988. p. 123-32.
11. Fried B, Sherma J. Thin Layer Chromatography. New York : Marcel Dekker; 1986. p. 4-7.
12. Viades TJ, Portilla BM, De la Vega G. Kinetic Study of Thermal Stability of penicillin by Differential Scanning Calorimetry. Rev Mex Cienc Farmaceut. 1998; 29(4):32-7.
13. Brown A, Domínguez AM. Introducción de la calorimetría diferencial de barrido. Cuidados y usos. Rev ICIDCA. 1999;33(1):11-3.
14. Kircner J.G. Thin Layer Chromatography. Techiques in Chemistry. New York : Jonh Wiley and Sons; 1978 vol. XIV.
15. Brown A, Márquez T, Besades E. Detección de los productos de la degradación y del grado de pureza en fármacos por DSC. Revista Mex Ing Quim AMIDIQ. 2004,3:241-8.
16. Bauer, K, Gros L, Saber W. Cromatografía de capa fina. Werksatz: Heidelberg, Mitterweger; 1992. p. 13-8.
17. Douglas C.M. Diseño y análisis de experimentos. Arizona: State Univ. Grupo Editorial Iberoamericana; 1991.
18. Stat Sft. INC. Ayuda de Statistica for windows. Tulsa : Stat Sft. Inc.; 1993.

Recibido: 8 de noviembre de 2005. Aprobado: 9 de diciembre de 2005.

MC. *Adolfo L. Brown Gómez*. Rodríguez No. 318 entre Luco y Justicia. Luyanó, Ciudad de La Habana, Cuba. Correo electrónico: adolfo.brown@icidca.edu.cu

¹Maestro en Ciencias.

²Licenciado en Química. Investigador Auxiliar.

³Licenciada en Química. Investigador Agregado.

⁴Licenciado en Matemáticas. Investigador Agregado.

⁵Técnica en Síntesis Orgánica.