



UNICAMP

Instituto de Química



Grupo de Pesquisas em
Química Analítica e Educação

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
INSTITUTO DE QUÍMICA
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA ANALÍTICA

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

**QUANTIFICAÇÃO DE NITROFUZONA E DE NITROFURANTOÍNA EM
MEDICAMENTOS POR ESPECTROFOTOMETRIA DE REFLETÂNCIA DIFUSA
E DE TRANSMISSÃO**

Candidato: MARCIO DAS NEVES PALUMBO

Orientador: PROF. DR. MATTHIEU TUBINO

Campinas, 2011

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA POR SIMONE LUCAS - CRB8/8144 - BIBLIOTECA
DO INSTITUTO DE QUÍMICA DA UNICAMP

| | |
|-------|--|
| N414q | <p>Palumbo, Marcio das Neves (1972-). Quantificação de nitrofurazona e de nitrofurantoína em medicamentos por espectrofotometria de refletância difusa e de transmissão / Marcio das Neves Palumbo. – Campinas, SP: [s.n.], 2011.</p> <p>Orientador: Matthieu Tubino. Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Química.</p> <p>1. Refletância. 2. Nitrofurazona. 3. Nitrofurantoína. 4. Transmitância. 5. Espectrofotometria. I. Tubino, Matthieu. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Química. III. Título.</p> |
|-------|--|

Informações para Biblioteca Digital

Título em inglês: Measurement of nitrofurazone and nitrofurantoin drugs in spectrophotometric diffuse reflectance and transmittance

Palavras-chave em inglês:

Reflectance
Nitrofurazone
Nitrofurantoin
Transmittance
Spectrophotometry

Área de concentração: Química Analítica

Titulação: Mestre em Química na área de Química Analítica

Banca examinadora:

Matthieu Tubino [Orientador]
Helena Redigolo Pezza
Adriana Vitorino Rossi

Data de defesa: 12/09/2011

Programa de pós-graduação: Química

*O valor das coisas não está no tempo em que elas duram,
mas na intensidade com que acontecem.
Por isso existem momentos inesquecíveis,
coisas inexplicáveis e pessoas incomparáveis.*

Fernando Pessoa

Existe apenas um bem, o saber, e apenas um mal, a ignorância.

Sócrates

Dedicatória

Aos meus pais, Norival e Isilda por se mostrarem como uma só entidade por muitos anos, inabaláveis e indestrutíveis nas convicções ao longo da minha vida.

Minha esposa Karin, perseverante, alicerce, tranquilizadora e, em 2011, mãe da Bia.

Minha filha Beatriz, mudou minha vida para sempre, mesmo antes de nascer.

Agradecimentos

Ao professor Tubino, exemplo de competência, sabedoria, conduta, caráter e bondade, um dos melhores seres humanos que tive a honra de conviver na vida.

A Patrícia Sampaio, pela ajuda na adaptação à instituição e o companheirismo na vida profissional e que juntamente com a Marta e a Acácia, fazem parte das pessoas que mais convivi e que mais me incentivaram e ajudaram nos momentos tempestuosos.

Aos colegas Luis, Rafael, Felipe e Danilo que ajudaram a analisar, fotografa e preparar experimentos durante o projeto, pensaram saídas para os momentos de impasses junto comigo.

Aos colegas que colaboraram para tornar o ambiente do nosso laboratório uma extensão da casa da gente.

À professora Adriana cuja dedicação e compromisso são exemplos para todos os membros do Gpquae.

Aos meus coordenadores prof. Boni Yavo, profa. Maria Lúcia, profa. Paula Knox de Souza e prof. Marcio Ferrarini que me apoiaram, estimularam a enfrentar a jornada de trabalho e o curso de mestrado.

Aos alunos do Colégio Lumière-SP, USCS – São Caetano do Sul, Unianchieta-Jundiaí e Uniabc-Santo André que fizeram com que minha vida profissional fosse repleta de alegrias acabando por incentivar o meu desenvolvimento profissional docente.

À minha família e meus amigos, que se confundem, imersos na questão educacional brasileira há mais de três décadas e cercados de exemplos acadêmicos de competência, são espelhos que balizam as minhas atitudes.

MARCIO DAS NEVES PALUMBO

OBJETIVO

Ministrar aulas no ensino superior nas grandes áreas de Ciência Química como Geral, Inorgânica, Físico-Química, Analítica, Orgânica e Análise Instrumental; inclusive Laboratórios.

EXPERIÊNCIA

1991–1994 **Colégio Salete** **São Paulo – SP**

Professor de Química – Ensino Fundamental e Médio

- Aulas teóricas de todas as áreas da disciplina.
- Organização e metodologia de funcionamento do Laboratório.
- Coordenação do curso preparatório para o Vestibular.

1995/atual **Colégio Lumière** **São Paulo – SP** Campinas - SP

Professor de Química e Coordenador da Área de Exatas.

Ensino Fundamental e Médio.

- Projeto e supervisão da construção dos laboratórios de Química, Física e Biologia em 1998.
- Aulas teóricas e práticas em todas as áreas de atuação da disciplina no ensino médio.
- Elaboração de material próprio para o ensino em aulas práticas de laboratório e demonstrativas em sala de aula.
- Supervisão de projetos participantes nos Congressos Brasileiros de Química, da Associação Brasileira de Química, em São Luiz-MA, Goiânia-GO, Recife-PE, Porto Alegre-RS, Rio de Janeiro-RJ e Ouro Preto-MG, Fortaleza-CE.
- Coordenador do curso Pré – Vestibular.

2003/atual – Universidade Imes - USCS **São Caetano do Sul – SP**

Professor da Área Química do Curso de Farmácia.

- Professor concursado, ministrando as disciplinas Química Geral e Inorgânica e Química Orgânica, Química Analítica, Físico-Química e Física Industrial.
- Supervisão de trabalhos de TCC

2006 – Universidade Paulista – Unip **São Paulo – SP**

Professor da Área Química Geral do Curso de Biologia.

- Professor de Química Geral I e II.

2007/2011 Universidade Padre Anchieta – UniAnchieta – Jundiaí – SP

Professor da Área Química do Curso de Farmácia.

- Disciplinas Química Geral e Inorgânica, Físico-Química, Química Analítica Qualitativa, Química Analítica Quantitativa e Química Analítica Instrumental.

- Confecção de material para aulas práticas.
- Supervisão de trabalhos de TCC e participação de colóquios da instituição.

2010/2011 Universidade do Grande ABC – Uniabc - Santo André - SP

Professor das disciplinas Química Geral e Inorgânica, Físico-Química, Química Orgânica I e II e Química Analítica Instrumental.

FORMAÇÃO

— **1997-2000 Universidade Mackenzie São Paulo – SP**

- Licenciatura e Bacharel com atribuições Tecnológicas em Química.

2001 – Abril 2002 Faculdades Oswaldo Cruz São Paulo – SP

- Pós-Graduação – Química para o Ensino Superior.

2007/2011 - Universidade de Campinas – Unicamp Campinas – SP

- Mestrado em Química – Área de concentração Química Analítica.
- Defesa em 12/09/2011.

Título da Dissertação: Quantificação de Nitrofurazona e Nitrofurantoína em Medicamentos por Espectrofotometria de Refletância Difusa e de Transmissão.

DADOS PESSOAIS

Estado Civil : Casado

RG : 19 417 638-1

Data Nascimento : 24/06/1972

Telefone Cel :(11) 8644-0085

Res: (11) 2414-0375

Com: (11) 3791-4809

Endereço:

Rua Cabo João Teruel Fregoni, 307 casa 20 Quadra 03

Ponte Grande – Guarulhos; CEP 07032000.

e-mail: mpalumbo@ibest.com.br

RESUMO

QUANTIFICAÇÃO DE NITROFUZONA E DE NITROFURANTOÍNA EM MEDICAMENTOS POR ESPECTROFOTOMETRIA DE REFLETÂNCIA DIFUSA E DE TRANSMISSÃO

A nitrofurazona e a nitrofurantoína são substâncias derivadas dos nitrofuranos e comercializadas em preparações farmacêuticas com ação bactericida, antifúngica e antimicrobiana com um amplo espectro de aplicação. Apresentam coloração amarela e comprimento de onda de máxima absorção em 370 nm. A maior parte das substâncias pertencentes ao grupo dos nitrofuranos, tem baixíssima solubilidade em água o que dificulta o desenvolvimento de métodos analíticos, sem o uso de solventes orgânicos. Neste trabalho foi desenvolvida metodologia para a determinação do teor de nitrofurazona e de nitrofurantoína em medicamentos por refletância difusa. Para a nitrofurantoína a medida é direta no fármaco, sem uso de qualquer solvente, enquanto que, para nitrofurantoína dissolve-se o fármaco em polietilenoglicol e mede-se a refletância em seguida. A técnica de refletância envolveu, para fins de comparação, a utilização de dois equipamentos distintos: (I) um espectrofotômetro Shimadzu UV-2450 com acessório de refletância e; (II) um refletômetro portátil construído em nosso laboratório. Também foram desenvolvidos duas metodologias para a análise quantitativa dos dois fármacos por transmissão em solução aquosa. Ambos os métodos na região uv-visível do espectro. Os resultados dos dois procedimentos foram comparados entre si e também com aqueles obtidos pela método oficial em high performance liquid chromatography (HPLC), usando o método estatístico *t* pareado de Student e o teste **F** de Snedecor. Foi observada total concordância entre os diferentes procedimentos em nível de confiança de 95%. Entre os métodos utilizados, o de refletância difusa apresenta a maior simplicidade operacional podendo ser recomendado o seu uso para quantificação das substâncias estudadas em fármacos. Foram obtidos desvios padrão relativos (DPR) de 3,9 (I) e 5,2% (II) para a nitrofurazona e de 3,4 (I) e 8,0% (II) para nitrofurantoína, enquanto que pelo HPLC os DPR foram 4,4 e 1,8% respectivamente. O método de refletância apresenta significativa vantagem para

determinação de nitrofurazona em pomadas em relação ao método oficial pela grande simplicidade operacional. Uma característica interessante do método refletométrico proposto para nitrofurazona é que, apesar de ser quantitativo, não há necessidade de pesagem de alíquota. Quanto ao método de transmitância o DPR ficou em 1,0% para nitrofurazona e 2,2% para nitrofurantoína.

ABSTRACT

QUANTIFICATION OF NITROFUZAZONE AND NITROFURANTOIN IN MEDICATIONS BY SPECTROPHOTOMETRIC OF DIFFUSE REFLECTANCE AND TRANSMISSION

Nitrofurazone and nitrofurantoin are derivatives substances from nitrofurans and are traded in pharmaceutical preparations with bactericidal, antifungal and antimicrobial actions with a broad spectrum of application. They have yellow coloration and a wavelength of maximum absorption at 370 nm. Most of the substances that belong to the group of nitrofurans have very low solubility in water which complicates the development of analytical methods, without the use of organic solvents. This research developed methodology for the determination of nitrofurazone and nitrofurantoin in drugs by diffuse reflectance. For nitrofurantoin the measure is directly on the drug, without using any solvent, whereas nitrofurantoin is dissolved in polyethylene glycol and the reflectance is measured after. The reflectance techniques involved, for comparison purposes, the use of two different equipment (I) a Shimadzu UV-2450 spectrophotometer with accessory of reflectance and (II) a portable reflectometer constructed in our laboratory. We have also developed two methodologies for quantitative analysis of the two drugs in aqueous solution by transmission. Both methods in the uv-visible region of the spectrum. The results of both procedures were compared between each other and also with those obtained by official method in high performance liquid chromatography (HPLC), using the statistical method t paired of Student and the F test and F of Snedecor. It was observed complete agreement between the different procedures in a accuracy level of 95%. Among the methods used, the diffuse reflectance has the highest

operational simplicity and it can be recommended its use for quantification of the substances studied in drugs. It was obtained relative standard deviation (RSD) of 3.9 (I) and 5.2% (II) for nitrofurazone and 3,4 (I) and 8.0% (II) for nitrofurantoin, while at the HPLC RSD were 4.4 and 1.8% respectively. The method of reflectance has a significant advantage for the determination of nitrofurazone ointments in relation to the official method due to the great operational simplicity. An interesting feature of the

refletometric method proposed to nitrofurazone is that, despite being quantitatively, there is no need to weigh the aliquot. As the method of transmittance the DPR was 1.0% to nitrofurazone 2.2% to nitrofurantoin.

SUMÁRIO

| | |
|--|-------------|
| Índice de Tabelas | Xvi |
| Índice de Figuras | Xvii |
| 1. INTRODUÇÃO | 01 |
| 1.1. NITROFUZONA: CARACTERÍSTICAS E PROPRIEDADES | 03 |
| 1.2. NITROFURANTOÍNA: CARACTERÍSTICAS E PROPRIEDADES | 05 |
| 1.3. PREPARAÇÕES COMERCIAIS ANALISADAS | 07 |
| 1.3.1. Nitrofurazona | 07 |
| 1.3.2. Nitrofurantoína | 08 |
| 1.4. REVISÃO DOS MÉTODOS ANALÍTICOS DE QUANTIFICAÇÃO DOS FÁRMACOS | 08 |
| 1.4.1. Nitrofurazona | 08 |
| 1.4.2. Nitrofurantoína | 10 |
| 1.5. CONSIDERAÇÕES ACERCA DA REFLETÂNCIA DIFUSA | 11 |
| 2. OBJETIVOS | 18 |
| 3. PARTE EXPERIMENTAL | 19 |
| 3.1. REAGENTES | 19 |
| 3.2. EQUIPAMENTOS | 20 |
| 3.3. NITROFUZONA | 21 |
| 3.3.1. Tratamento das amostras | 21 |
| 3.3.1.1. Curva analítica e análise das amostras comerciais | 21 |
| 3.3.1.1.1. Método de Refletância Difusa | 21 |
| 3.3.1.1.2. Método de Transmissão | 24 |
| 3.3.1.1.3. Método HPLC | 24 |
| 3.4. NITROFURANTOÍNA | 26 |
| 3.4.1. Tratamento das amostras | 26 |
| 3.4.1.1. Curva analítica e análise das amostras comerciais | 26 |
| 3.4.1.1.1. Procedimentos preliminares | 26 |

| | |
|--|-----------|
| 3.4.1.1.2. Método de Refletância Difusa | 29 |
| 3.4.1.1.3. Método de transmissão | 34 |
| 3.4.1.1.4. Método HPLC | 35 |
| 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO | 37 |
| 4.1. NITROFUZAZONA | 37 |
| 4.1.1. Refletância difusa | 37 |
| 4.1.2. Transmissão | 39 |
| 4.1.3. HPLC | 41 |
| 4.1.4. Discussões | 42 |
| 4.2. NITROFURANTOÍNA | 46 |
| 4.2.1. Características da amostra do fármaco e o processo de Refletância Difusa | 46 |
| 4.2.2. Transmissão | 51 |
| 4.2.3. HPLC | 52 |
| 5. CONCLUSÕES | 56 |
| 5.1. NITROFUZAZONA | 56 |
| 5.2. NITROFURANTOÍNA | 56 |
| 5.3. Consideração | 57 |
| 5.4. Perspectivas | 57 |
| 6. REFERÊNCIAS | 58 |

LISTA DE TABELAS

| | | |
|-----------------|---|-----------|
| Tabela 1 | Soluções de nitrofurazona em polietilenoglicol preparadas para a construção da curva analítica. | 21 |
| Tabela 2 | Soluções de nitrofurantoína em polietilenoglicol preparadas para a construção da curva analítica, a partir de mistura sólida (contendo amido, talco e lactose anidra) de concentração 272,92 mg g ⁻¹ . | 30 |
| Tabela 3 | Soluções aquosas de nitrofurantoína em polietilenoglicol preparadas para a construção da curva analítica do método por transmissão. | 34 |
| Tabela 4 | Determinação de nitrofurazona em preparações farmacêuticas, por refletância difusa, por transmissão em solução aquosa e por HPLC. | 43 |
| Tabela 5 | Determinação de nitrofurazona em pomadas comerciais: Comparação entre os valores de concentração e suas precisões, obtidos por métodos de refletância difusa, transmissão e de HPLC usando o teste-t de Student e do teste-F. Valor t tabulado para o grau de liberdade (ν) 4 é 2,78 ($\alpha= 0,05$) e 4,60 ($\alpha= 0,01$); $\nu= n_1 + n_2 - 2$ e $n_1 = n_2 = 3$ nesse caso. Para o F tabulado o valor é 19,0 ($\alpha=0,05$) e 99,0 ($\alpha=0,01$) ⁴⁸ . | 44 |
| Tabela 6 | Determinação de nitrofurantoína em cápsulas de preparação farmacêutica, por refletância difusa, por transmissão em solução aquosa e por HPLC. | 53 |
| Tabela 7 | Determinação de nitrofurantoína em cápsulas: Comparação entre os valores obtidos por métodos de refletância difusa, transmissão e de HPLC usando teste-t de Student e do teste-F. Valor t tabulado para o grau de liberdade (ν) 4 é 2,78 ($\alpha= 0,05$) e 4,60 ($\alpha= 0,01$) $\nu= n_1 + n_2 - 2$ e $n_1 = n_2 = 3$ nesse caso. Para o F tabulado o valor é 19,0 ($\alpha=0,05$) 99,0 ($\alpha=0,01$) ⁴⁸ . | 54 |

LISTA DE FIGURAS

| | | |
|------------------|--|-----------|
| Figura 1 | Estrutura geral dos nitrofuranos, onde o grupamento R diferencia cada substância da classe. | 03 |
| Figura 2 | Fórmula estrutural da nitrofurazona. | 04 |
| Figura 3 | Esquema da síntese da nitrofurazona. | 04 |
| Figura 4 | Fórmula estrutural da nitrofurantoína. | 05 |
| Figura 5 | Esquema da síntese da nitrofurantoína. | 07 |
| Figura 6 | Reflexão de raios de luz difusa e regular. | 13 |
| Figura 7 | Relação entre a radiação incidente, absorvida e refletida de forma difusa, característica dos fármacos estudados neste trabalho. | 14 |
| Figura 8 | Radiação incidente seguida de reflexão por parte da amostra, deve-se considerar todas as direções possíveis para os diversos feixes de luz refletidos e as suas respectivas reflexões sucessivas, ampliando o número de feixes de radiação que passam pelo detector. | 15 |
| Figura 9 | Acessório de refletância Shimadzu (esquerda) e esquema de integração da radiação luminosa (direita), através de uma cela de integração (foto multiplicador); | 16 |
| Figura 10 | A - cela de refletância portátil; B - LED aceso e resistor detector de luz [LDR] na parte interna da cela; C - conjunto de refletância alimentado por pilhas fornecendo 4,5 V e acoplado ao multímetro. | 20 |
| Figura 11 | (A)- Espalhamento da pomada comercial ou da solução preparada em polietilenoglicol em papel manteiga; (B)- Amostra após a difusão em papel facilitada pela sua “fusão” na estufa e separação das duas faces do papel com lâmina de PVC; (C) - posicionamento da amostra na cela de refletância Shimadzu. | 23 |
| Figura 12 | Fármaco Macrodantina®, após cuidadosa trituração em almofariz. Na fotografia podem ser vistos, dispersos no medicamento, resíduos de materiais escuros usados para a formação dos macrocristais da preparação farmacêutica. | 26 |

- Figura 13** Cella de refletância difusa para material sólido. (A) - Preparação comercial triturada em almofariz; (B) - Branco (amido, talco e lactose na proporção 1:1:1m/m); (C) - Mistura sólida nitrofurantoína preparada de com excipiente de amido, talco e lactose, estes na proporção 1:1:1: m/m. **28**
- Figura 14** Espalhamento, sobre o papel manteiga, da solução da preparação farmacêutica em polietilenoglicol. **31**
- Figura 15** Visão do lenço de papel usado para a retirada do excesso da solução em polietilenoglicol colocada sobre o papel manteiga. Os destaques indicam os grânulos escuros, retirados com a passagem do lenço de papel juntamente com “pasta” contendo o fármaco. **32**
- Figura 16** (A) - Separação das duas folhas da dobradura por uma lâmina de PVC preto; (B) - Posicionamento da amostra no equipamento de refletância. **33**
- Figura 17** Curva analítica para o processo de refletância para nitrofurazona obtida com o equipamento ShimadzuUV-2450. **38**
- Figura 18** Curva analítica obtida na análise dos padrões de nitrofurazona no refletômetro portátil³⁹. **39**
- Figura 19** Curva analítica das soluções padrão de nitrofurazona para o processo de transmissão. **40**
- Figura 20** Curva analítica da nitrofurazona para o método HPLC. **41**
- Figura 21** Espectros de absorção em processo de transmitância (solução aquosa $8,28 \times 10^{-3} \text{ mg g}^{-1}$) e em processo de refletância (solução em polietilenoglicol, $3,00 \text{ mg g}^{-1}$) da nitrofurazona de 300 a 500 nm. **45**
- Figura 22** Diferença dos aspectos e da coloração da mistura preparada a partir do analito puro (esquerda) com concentração de $272,6 \text{ mg g}^{-1}$ e do fármaco comercial (direita) com concentração aparente de nitrofurantoína da ordem de $274 \pm 1 \text{ mg g}^{-1}$. **46**

- Figura 23** Espectros de absorvância em refletância difusa, para amostras de nitrofurantoína sólidas. Não há boa correspondência entre a concentração da amostra preparada de $272,6 \text{ mg g}^{-1}$, com absorvância ao redor de 0,3 e do fármaco com concentração de $274 \pm 1 \text{ mg g}^{-1}$ absorvância ao redor de 0,4. Espectrofotômetro Shimadzu UV-2450. **47**
- Figura 24** Curva analítica obtida no processo de refletância difusa para a nitrofurantoína, no equipamento Shimadzu. **49**
- Figura 25** Curva analítica do sinal de resistência elétrica em função da concentração da solução de nitrofurantoína para o equipamento de refletância portátil. **50**
- Figura 26** Curva analítica obtida através do método de transmissão para nitrofurantoína. **51**

1. INTRODUÇÃO

O setor industrial da Química Fina e suas vertentes no Brasil está associado a um conjunto de empresas especializadas na fabricação de uma grande variedade de matérias primas essenciais às atividades humanas, com elevado conteúdo tecnológico e valor agregado. São produtos relacionados a áreas estratégicas para o desenvolvimento sustentável e autônomo do País, dentre os quais se destacam fármacos, medicamentos, vacinas, defensivos agrícolas e animais, catalisadores industriais, corantes, aditivos e as demais especialidades da química fina^{1,2}.

Dentre as áreas estratégicas da Química Fina, destaca-se a farmacêutica, onde o avanço do conhecimento na área da Química Farmacêutica têm contribuído para introdução de novos agentes terapêuticos com uma freqüência nunca vista. A evolução das etapas de isolamento, manipulação, produção, armazenamento, embalagem e controle de qualidade de tais agentes se desenvolve em um ritmo acelerado, comparável à velocidade em que se descobre aplicabilidade para estas novas substâncias e suas composições. Este setor gera produtos de composição definida e de altíssima pureza que estão relacionados a um alto valor agregado, movimentando no Brasil mais de U\$12 bilhões, correspondendo, em valores aproximados, a 21% do setor Químico nacional². Dentre as substâncias produzidas encontram-se diversas matérias primas para indústria farmacêutica como princípios ativos e adjuvantes utilizados na formulação de um grande número de medicamentos.

Embora usadas comumente como sinônimos, as palavras fármaco e medicamento são diferenciadas entre si, assim como os termos princípio ativo e preparação farmacêutica. Princípio ativo e fármaco têm o mesmo significado podendo ser entendidos como sendo substâncias isoladas industrializadas ou não, seja com fins terapêuticos, preventivos, curativos ou ainda como agente de diagnóstico ou veneno. Medicamento ou preparação farmacêutica reúne o conceito de produtos formados pelo fármaco e produzidos de maneira industrial ou em manufatura e associados a outras substâncias em doses ou concentrações terapêuticas^{1,3,4}. São diversas classes de

substâncias classificadas pelo termo fármaco, normalmente estas substâncias originam-se de um grupo de ação farmacológica.

Os nitrofuranos são uma categoria de substâncias definidas como fármacos que apresentam propriedades antibacteriana, antifúngica e controlam a ação de protozoários. São agentes de amplo espectro, caracterizados pela eficácia contra bactérias gram-positivas e gram-negativas, incluindo espécies de *salmonella*. Este grupo de medicamentos também é eficaz contra *giardia*, *amebas*, *tricomonas* e algumas espécies de *coccídios*. Alguns nitrofuranos são carcinogênicos e o seu uso futuro é questionável. Porém, alguns compostos deste grupo têm sido utilizados correntemente como medicamento humano e veterinário³.

Os nitrofuranos são, na maior parte dos casos, bacteriostáticos, embora em doses elevadas possam ser bactericidas. Essas drogas são mais ativas em ambientes ácidos (pH ideal é 5,5). Sua eficiência é diminuída quando em utilização sistemática. Este grupo de substâncias são administrados via oral, tópica e raramente por via parenteral. A absorção pelo trato gastrointestinal é deficitária, pois o fármaco é eliminado muito rapidamente.

Além da carcinogênese, outros efeitos tóxicos têm sido atribuídas a diversos nitrofuranos, incluindo distúrbios do sistema nervoso central e gastrintestinais, baixo ganho de peso e espermatogênese reduzida³⁻⁶.

Apesar de seus mecanismos básicos de ação permanecerem obscuros, os nitrofuranos tendem a inibir muitos sistemas de enzimas microbianas, incluindo aqueles envolvidos no metabolismo dos carbo-hidratos. São metabolizados pelas nitrorredutases que levam à formação de radicais que inibem a tradução genética, o processo ribossômico mRNA, não deixando formar a cadeia Polipeptídica^{6,7}.

Como estrutura eles apresentam um grupo nitro na posição 5 do anel furano e uma associação com outros grupos orgânicos na posição 1, deste mesmo composto. A figura 1 mostra a estrutura fundamental dos nitrofuranos, onde R representa os grupamentos que podem se ligar a estrutura de modo a formar os principais nitrofuranos utilizados como antibióticos e antifúngicos conhecidos, onde se destacam a furazolidona, a furaltadona, a nitrofurantoína e a nitrofurazona⁸.

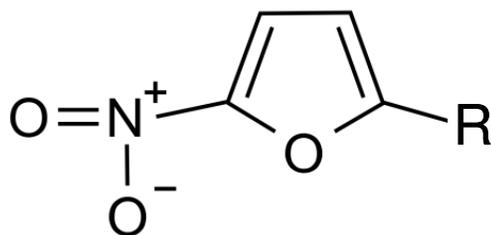


Figura 1. Estrutura geral dos nitrofuranos, onde o grupamento R diferencia cada substância da classe.⁸

1.1. NITROFUZONA: CARACTERÍSTICAS E PROPRIEDADES

A nitrofurazona, 2-[(5-nitro-2-metileno)furanilcarboxamida]hidrazina, foi o primeiro fármaco derivado do nitrofurano. Sua introdução na clínica médica foi em 1946 para o tratamento oral das infecções bacterianas e para o tratamento da doença de Chagas. Entretanto, graves efeitos tóxicos foram observados e, particularmente, na doença de Chagas, os resultados terapêuticos foram insatisfatórios³. Nos dias de hoje ela é usada em tratamentos tópicos através da aplicação de pomadas ou soluções. A substância apresenta grande espectro de ação contra fungos⁹ e bactérias gram-positivas e gram-negativas. Sua atividade desinfetante favorece a cicatrização de feridas produzidas por traumatismos, por queimaduras e por procedimentos cirúrgicos. Também pode ser usada para o tratamento de infecções bacterianas causadas por epidemia de infecções hospitalares, cutâneas e úlceras⁴.

A fórmula molecular da nitrofurazona é $C_6H_6N_4O_4$ (massa molar $198,136 \text{ g mol}^{-1}$) e sua fórmula estrutural é mostrada na figura 2. Apresenta como características: a cor amarela ($\lambda_{\text{max}} = 375 \text{ nm}$), é inodora e muito pouco solúvel em água ($1:4200 \text{ m/v}$)^{5,7,10}.

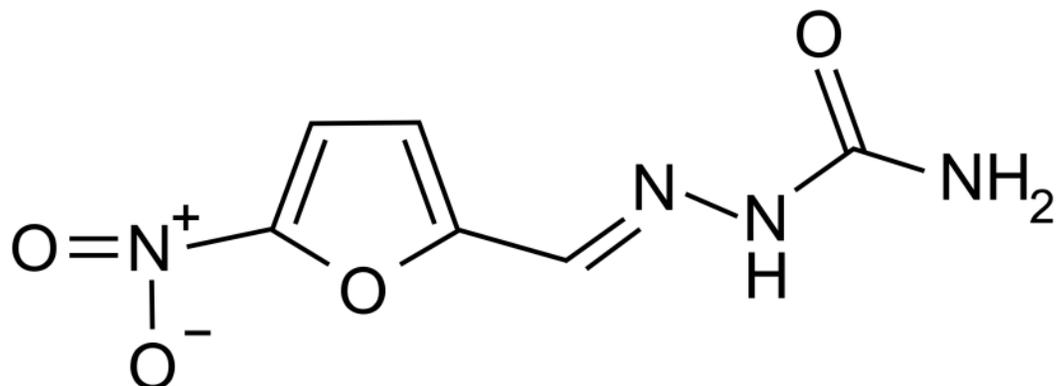


Figura 2. Fórmula estrutural da nitrofurazona.^{5,10}

A produção de nitrofurazona pode ser feita utilizando diversas matérias primas, como o diacetato-5-nitrofurfural, 5-nitro-2-furaldeído, 2-furaldeído ou nitrofurfuraloxima¹¹. O procedimento mais utilizado é a partir do 2-furaldeído. Ele pode ser resumido pela sequência de reações e insumos constantes da figura 3. Neste processo o 2-furaldeído sofre inicialmente reação de nitração no carbono 5, enquanto que o grupo aldeído reage com o anidrido acético¹¹. Em reação posterior com o cloridrato de semicarbazida resulta a nitrofurazona.

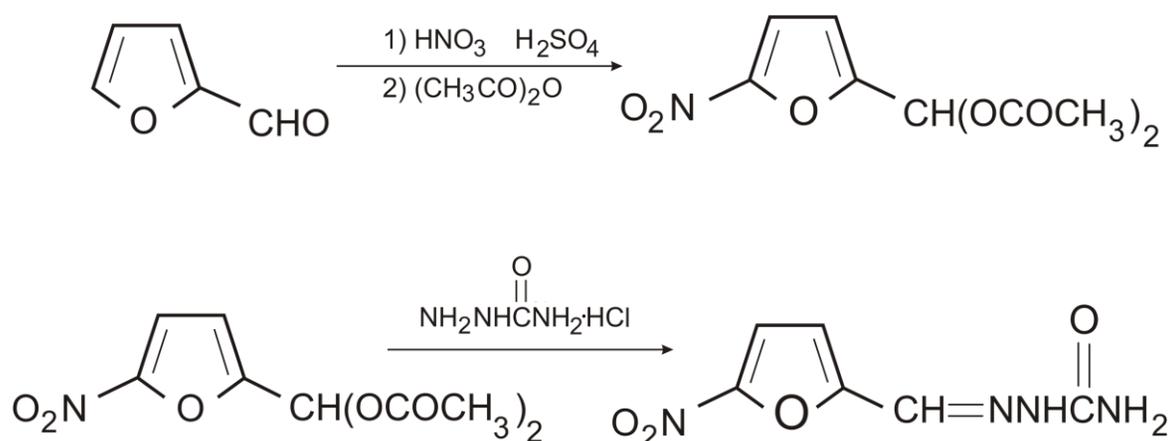


Figura 3. Esquema da síntese da nitrofurazona.¹¹

1.2. NITROFURANTOÍNA: CARACTERÍSTICAS E PROPRIEDADES

A nitrofurantoína [1-[[[(5-Nitro-2-furanil)metileno]amino]-2,4-imidazolidinediona] é utilizada na prevenção e tratamento de infecções do trato urinário⁴. Apresenta atividade antibacteriana, em especial para as espécies *Escherichia coli*, *Streptococcus faecalis* e *Staphylococcus aureus*. O mecanismo de ação é único entre os agentes antibacterianos. Ao entrar em contato com as bactérias a nitrofurantoína é reduzida em flavoproteínas bacterianas, que são intermediários reativos que inativam ou modificam proteínas ribossomais bacterianas. Esta alteração provoca a inibição de processos bioquímicos vitais para o metabolismo energético aeróbico e síntese de ácido desoxirribonucléico bacteriano (ADN), ácido ribonucléico (RNA) e proteínas da parede celular^{3-5,12}.

A fórmula molecular da nitrofurantoína é $C_8H_6N_4O_5$ (massa molar $318,16 \text{ g mol}^{-1}$). Sua fórmula estrutural é apresentada na figura 4. As principais características são: cor amarelo-limão ($\lambda_{\text{max}} = 370 \text{ nm}$), sensível à luz e apresenta ausência de odor e sabor² e solubilidade muito baixa em água ($1:5000 \text{ m/v}$)⁵.

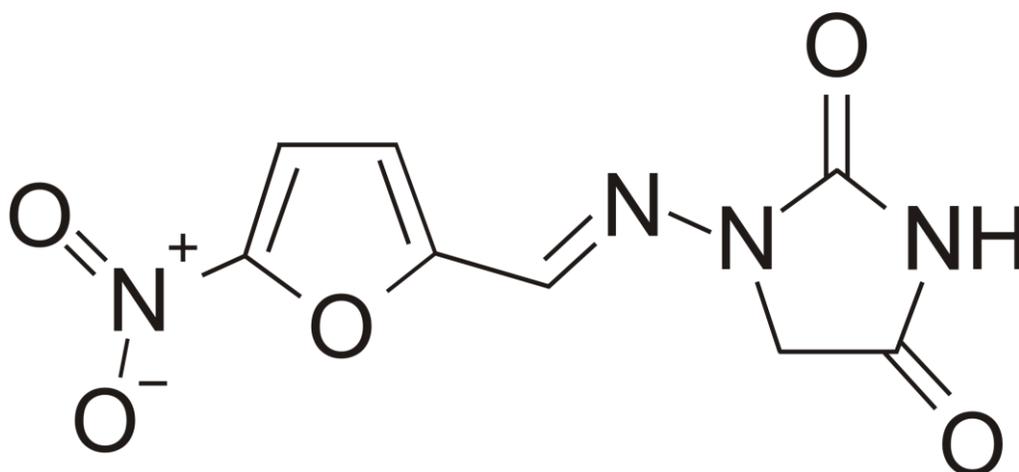


Figura 4. Fórmula estrutural da nitrofurantoína.⁵

Tanto a nitrofurantoína quanto a nitrofurazona apresentam baixa solubilidade em água devido à difícil polarização das moléculas em meio aquoso, a presença de átomos

de oxigênio próximo aos átomos de nitrogênio reduzem a densidade eletrônica deste último dificultando a captura de prótons e com isso impossibilitam a formação de dipolos elétricos capazes de solubilizar as substâncias em questão⁵.

Em meio aquoso contendo macromoléculas solúveis em água, a solubilidade destas substâncias pode-se elevar significativamente, como por exemplo em reações de complexação com ciclodextrinas que deixam a parte mais apolar da molécula do fármaco dispersa em seu interior⁵. Mais simplesmente pode-se aumentar a solubilidade em água das moléculas envolvidas no estudo fazendo-as interagir com macromoléculas solúveis em água, como o polietilenoglicol.

A razão para a nitrofurantoína funcionar quase que exclusivamente no tratamento de infecções do trato urinário está relacionada com as suas características farmacocinéticas. A substância é rapidamente absorvida no intestino e metabolizada no fígado. A excreção é muitíssimo acelerada o que torna a sua concentração na corrente sanguínea muito baixa. Os níveis de concentração somente se elevam quando ocorre o acúmulo do fármaco nas vias urinárias, atingindo a concentração letal para as bactérias na urina^{6,12}.

Um efeito colateral que ocorre comumente com a administração oral de nitrofurantoína é sensação enjoô, podendo gerar, ainda, dores de cabeça e vômitos. Uma forma de evitar este efeito colateral é a utilização de nitrofurantoína macrocristalina conforme divulgado nos EUA Pat. N^o 3.401.221 emitida Borgmann, Hayes, Paul & Paul em 10 de setembro de 1968. A nitrofurantoína macrocristalina provou ser uma excelente droga para o tratamento das infecções urinárias com mínimos efeitos colaterais⁶.

A inovação descrita em 1968 envolve uma combinação de liberação sustentada para administração oral de nitrofurantoína compreendendo, em uma cápsula, uma primeira camada de uma mistura de partículas de polivinilpirrolidona a 10%, nitrofurantoína a 85%, e carboxivinilpolímero a 5% seguida de uma segunda camada de uma mistura de partículas granuladas com pequenas variações percentuais entre as substâncias envolvidas, este granulado é a forma macrocristalina⁶.

A produção de nitrofurantoína se dá pela condensação entre o nitrofurano e o 1-aminoidantoína^{13,14}. As matérias primas para o processo são o 2-furaldeído e o

cloridrato de semicarbazida. Primeiramente ocorre a nitração do carbono 5 do 2-furaldeído, bem como a acetilação do grupamento aldeído do composto, processo idêntico ao já citado na formação de nitrofurazona. A substância resultante reage em presença da forma cíclica do cloridrato de semicarbazida, (1-aminoidantoína) condensando-se em nitrofurantoína, a figura 5 apresenta a sequência descrita no processo.

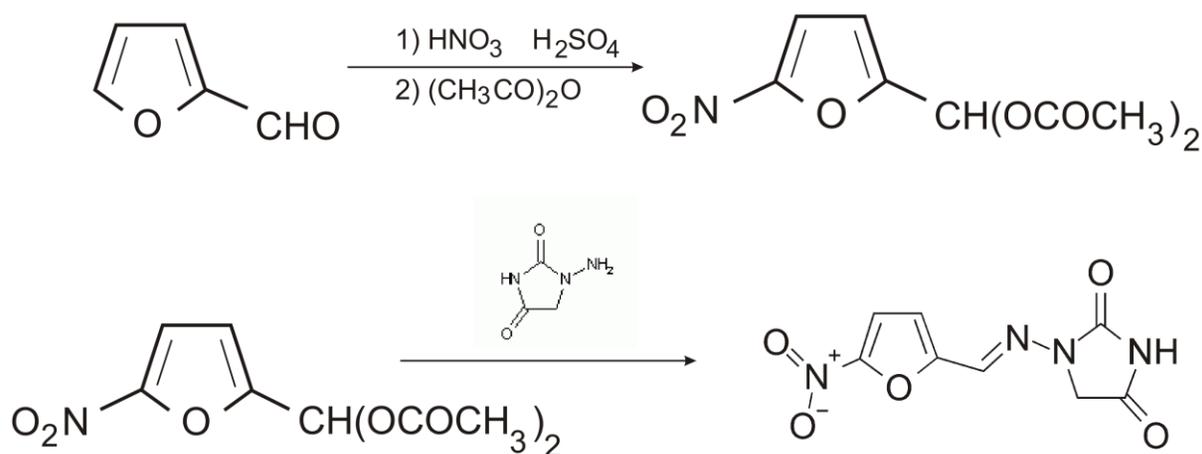


Figura 5. Esquema da síntese da nitrofurantoína.¹³

1.3. PREPARAÇÕES COMERCIAIS ANALISADAS

1.3.1. Nitrofurazona

As preparações farmacêuticas da nitrofurazona disponíveis no mercado são em forma de soluções ou pomadas para uso tópico, contendo 0,2 % m/m de nitrofurazona. No caso das pomadas de **Furacin®** e **Sensiderme®** analisadas neste trabalho a nitrofurazona encontra-se dissolvida em polietilenoglicol.

1.3.2. Nitrofurantoína

A nitrofurantoína está disponível em cápsulas que contêm, cada uma, 100 mg do princípio ativo (**Macrofantina®**). O fármaco se apresenta na forma de cristais macroencapsulados, de lenta liberação, o que retarda a absorção do mesmo, inibindo efeitos colaterais como náusea e vômitos comuns à utilização do medicamento⁶. Os demais constituintes da formulação são lactose, amido e talco em proporção não revelada pelo fabricante.

1.4. REVISÃO DOS MÉTODOS ANALÍTICOS DE QUANTIFICAÇÃO DOS FÁRMACOS

Vários métodos são descritos na literatura para a análise de nitrofurazona e de nitrofurantoína na matéria-prima e/ou em preparações farmacêuticas utilizando técnicas como: espectrofotometria¹⁵⁻¹⁹; cromatografia^{15,20-24}; voltametria²⁴⁻²⁹; quimioluminescência³⁰, fluorescência³¹. O método recomendado pela USP¹⁵ para a determinação de nitrofurazona em pomadas e nitrofurantoína encapsulada presentes em produtos farmacêuticos baseia-se na técnica de HPLC. Neste procedimento são utilizadas grandes quantidades de solventes orgânicos, além de um tempo de manipulação da amostra superior a 35 minutos¹⁵.

1.4.1. Nitrofurazona

Na recomendação do método espectrofotométrico para a determinação de nitrofurazona na forma pura é necessário dissolver a amostra em dimetilformamida e, posteriormente, diluir em água. Ao ajustar as condições experimentais as detecções são feitas de absorbância em 375 nm. Para as pomadas de nitrofurazona o procedimento por HPLC é o oficial¹⁵.

AGRAWAL e Patel¹⁷ desenvolveram um método onde a nitrofurazona reage com hidroximetilamina em meio alcalino produzindo ácido hidroxâmico, após a reação deste ácido com os íons ferro(III), em meio ácido forma-se um complexo de cor roxa cuja identificação e concentração podem ser investigadas por espectrofotometria.

Sastry et al¹⁸ propuseram quatro métodos espectrofotométricos baseados na formação de espécies coloridas. O primeiro diz respeito à determinação de um produto formado pela redução da nitrofurazona com 3-metilbenzotiazolin-2-umhidrazona (MBTH, $\lambda_{\text{max}} = 600 \text{ nm}$). O segundo e o terceiro métodos empregam a reação do produto de hidrólise da nitrofurazona com ácido tiobarbitúrico ($\lambda_{\text{max}} = 440 \text{ nm}, 520 \text{ nm}$), e com ácido barbitúrico ($\lambda_{\text{max}} = 440 \text{ nm}$). O outro método implica na oxidação de nitrofurazona com excesso de N-Bromossuccinimida (NBS) e determina a NBS consumida usando ácido metol-isonicotínico hidrazida ($\lambda_{\text{max}} = 620 \text{ nm}$).

Um método colorimétrico simples para a determinação de seis derivados do grupo nitro, ou seja, furazolidona, nifuroxima, niridazola, nitrazepam, nitrofurantoína e nitrofurazona, foi descrita por Walsh et al¹⁹. O método sugerido depende da formação de cor laranja a roxa, quando estes grupos nitro reagem com o hidróxido de tetrabutílamônio em dimetilformamida.

A cromatografia em papel foi utilizada por Shajahan et al.^{20,21} para a separação de algumas substâncias, dentre elas destacou-se a nitrofurazona. No entanto, para a determinação quantitativa do analito, a etapa de extração do papel emprega, necessariamente, solvente orgânico. Após a extração, a determinação da absorbância é feita em 375 nm.

Métodos voltamétricos têm sido relatados²⁵⁻²⁷, porém são muito sensíveis a interferências.

O método de fluorescência descrito por Belal³¹, pode ser aplicado para a análise de várias drogas derivadas do nitrofurano, inclusive a nitrofurazona que envolve, dentre outras preparações, a dissolução em dimetilformamida antes da determinação em 445 nm ($\lambda_{\text{max}} = 245 \text{ nm}$). O sinal analítico é linear de 4×10^{-3} a $5 \times 10^{-2} \mu\text{g mL}^{-1}$.

1.4.2. Nitrofurantoína

O método oficial para determinação de nitrofurantoína pura é o HPLC, com detector ultravioleta ajustado a 254 nm e coluna de 300 mm de comprimento e 3,9 mm de diâmetro interno, empacotada com sílica quimicamente ligada a otadecilsilano (5 μm), mantida à temperatura ambiente, os parâmetros operacionais são ajustados para que o tempo de retenção do pico da nitrofurantoína seja por volta de 8 minutos^{22,23}.

A nitrofurantoína pode ser analisada na forma pura através de espectrofotometria UV com comprimento de onda de 367 nm, neste procedimento utiliza-se dimetilformamida como solvente para a amostra a ser analisada e, posteriormente água¹⁵.

Muth³² descreve um método de quantificação de nitrofurantoína em urina e plasma sanguíneo que envolve a extração líquido-líquido do fármaco com acetato de etila, seguido de evaporação e reconstituição em fase móvel, com detecção em 370nm. O limite de quantificação de nitrofurantoína foi de 0,010 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para o plasma e na urina a nitrofurantoína foi quantificadas até 0,380 $\mu\text{g mL}^{-1}$.

Belal³¹ desenvolveu um método simples, rápido, seletivo e sensível de fluorescência que foi descrito para a análise de três drogas nitrofurano, ou seja, nifuroxazide, nitrofurantoína e nitrofurazona. O método envolveu a hidrólise alcalina dos medicamentos em estudo pelo aquecimento com hidróxido de sódio 0,1 mol L^{-1} seguida de diluição com água destilada por nitrofuraxazide ou 2-propanol para nitrofurantoína e nitrofurazona. Os fluoróforos formados foram medidos em 465 nm (λ_{Ex} 265 nm), 458 nm (λ_{Ex} 245 nm) e 445 nm (λ_{Ex} 245 nm) para os três fármacos, respectivamente. Os parâmetros experimentais foram estudados e otimizados. A análise de regressão mostrou boa correlação entre a intensidade de fluorescência e concentração durante os intervalos de 0,08 a 1,00, de 0,02 a 0,24 e de 0,004 a 0,050 mg mL^{-1} para nifuroxazide, nitrofurantoína e nitrofurazona, respectivamente. Os limites de detecção do método foram 8,0, 1,9 e 0,3 ng mL^{-1} para nifuroxazide, nitrofurantoína e nitrofurazona, respectivamente. O método proposto foi validado em termos de exatidão, precisão e especificidade, e foi aplicado com sucesso para o ensaio das três

nitrofuranos em suas diferentes formas farmacêuticas. Neste método, não foi observada interferência do comum adjuvantes farmacêuticos.

A quantificação de nitrofurantoína pode ser feita por voltametria cíclica²⁸ ou por voltametria de onda quadrada, como concluíram Pires⁸ e Ghoneim²⁹. Este último desenvolveu uma metodologia eletroanalítica para a determinação nitrofurantoína foram investigados com eletrodos dopados com boro. O uso da voltametria de onda quadrada com os parâmetros otimizados demonstrou uma boa relação linear entre a corrente de pico e a concentração de nitrofurantoína para uma ampla gama de concentração. A aplicabilidade do procedimento proposto foi testado utilizando uma formulação comercial de produtos farmacêuticos derivados do fármaco, e os resultados foram comparados com o procedimento recomendado pela Farmacopéia Britânica. O procedimento proposto foi sensível, exato e preciso para a análise da nitrofurantoína e não exigem uma preparação complexa ou renovação da superfície do eletrodo. Isto apresenta a vantagem de eliminar os resíduos de mercúrio e minimizando os problemas de adsorção relacionados ao uso de outros eletrodos superficiais sólidos.

1.5. CONSIDERAÇÕES ACERCA DA REFLETÂNCIA DIFUSA

O desenvolvimento de métodos de análise simples e rápidos é sempre interessante. A espectrofotometria de refletância difusa na região das radiações visível e ultravioleta do espectro permite a análise quantitativa direta de analitos com o mínimo de tratamento, com conseqüente diminuição na manipulação e no uso de solventes orgânicos e de reagentes químicos³³⁻³⁸.

O uso da espectrofotometria de refletância como uma técnica analítica quantitativa é muito menos popular que a de transmissão. A dificuldade na preparação homogênea das superfícies refletoras do analito e o efeito do tamanho de partícula podem ser considerados como importantes fatores que contribuem para o pouco uso desta técnica na análise quantitativa^{34,39}. No entanto, as medidas de refletância são rápidas e fáceis de serem conduzidas³³.

A espectrofotometria de refletância é baseada nos fenômenos que ocorrem quando a luz atinge a superfície onde está o analito. Ao incidir sobre um material, a luz pode ser refletida, transmitida ou absorvida pelo mesmo. A intensidade e ocorrência destes fenômenos dependem da natureza do material e, também, do comprimento de onda da radiação utilizada. Materiais opacos não transmitem qualquer comprimento de onda e, portanto, apenas os fenômenos de reflexão e absorção estão associados a eles. Já os objetos translúcidos refletem, transmitem e absorvem radiação⁴⁰.

A refletância é uma técnica espectroscópica baseada na relação entre a energia luminosa refletida por uma superfície refletora e a energia luminosa que incide sobre ela. O fenômeno de reflexão envolvido nesta técnica consiste no retorno da radiação, sem alteração do comprimento de onda, após esta ter atingido a superfície.

O uso de espectrofotometria de refletância no visível como técnica analítica foi, durante certo tempo, quase que limitado à análises qualitativas. Isto pode ser entendido pelo fato do tamanho das partículas e a superfície da amostra, por exemplo, apresentarem variações no fenômeno de refletância, dificultando a reprodutibilidade das medidas. Por outro lado, análises utilizando espectrofotômetro, equipado com acessório de refletância difusa com esferas integradoras, podem fornecer bons resultados quantitativos de maneira simples e rápida³⁴.

Em espectrofotometria de transmissão, qualquer turbidez causada por emulsões, implica em uma interferência que irá prejudicar e até invalidar o resultado da análise. Tal situação pode ser facilmente contornada em processo de refletância³⁸.

Quando a radiação é direcionada para a superfície de uma amostra sólida ou em suspensão numa solução, dois tipos de reflexão da radiação podem ocorrer: a reflexão regular (especular) e a reflexão difusa.

Se a radiação refletida mantém o mesmo paralelismo dos raios de luz incididos, o fenômeno recebe o nome de *reflexão regular* (ou especular). Este fenômeno ocorre em superfícies lisas e polidas como, por exemplo, a de um espelho ou de um lago calmo. A simetria com que a radiação se reflete nestas superfícies resulta na formação de imagens dos objetos colocados diante delas.

Quando os raios refletidos perdem o paralelismo entre si e, então, espalham-se desordenadamente em todas as direções, o fenômeno recebe o nome de *reflexão*

difusa. Superfícies irregulares são responsáveis por este tipo de reflexão. Os dois tipos de reflexão estão representados na figura 6.

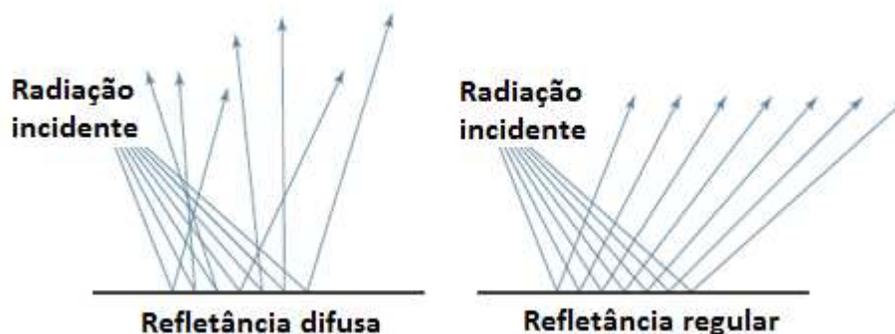


Figura 6. Reflexão da radiação difusa e regular.

Em medidas de refletância, a leitura realizada pelo espectrofotômetro é um sinal da radiação transmitida refletida, também chamada de força de reflexão ou de refletância, T_R , a qual é análoga à transmitância em espectroscopia. A densidade óptica para medidas de refletância é dada, analogamente à absorvância, por:

$$A_R = -\log T_R$$

A refletância, T_R , é dada por:

$$T_R = I/I_0$$

sendo I_0 a intensidade de energia incidente e I a intensidade de energia refletida pelo meio.

Os resultados das medidas de refletância dependem das condições das medidas, principalmente do comprimento de onda da radiação incidente, do ângulo de incidência e do tamanho das partículas refletoras.

Como a maioria das superfícies dos materiais apresenta estruturas irregulares, a espectroscopia de refletância difusa acaba sendo mais empregada e explorada do que a de refletância especular. A espectroscopia de refletância difusa é empregada quando o fenômeno de espalhamento da radiação é muito pronunciado, o que geralmente ocorre em espécies sólidas ou em suspensão com áreas superficiais elevadas, nas regiões do IV, do visível e do UV³⁴.

As amostras de produtos farmacêuticos envolvidos neste estudo se encaixam perfeitamente nesta descrição, tanto a nitrofurazona, quanto a nitrofurantoína apresentam-se em suspensão ou como espécies sólidas, deixando os suportes empregados com características irregulares de superfície. Essas características geram dois fenômenos de interesse na quantificação dos fármacos: a absorção e a reflexão. Parte da amostra analisada absorve a radiação incidente e, simultaneamente reflete parte dessa radiação com um espalhamento significativo nesses raios de luz refletidos pelas as amostras, como mostra a figura 7.

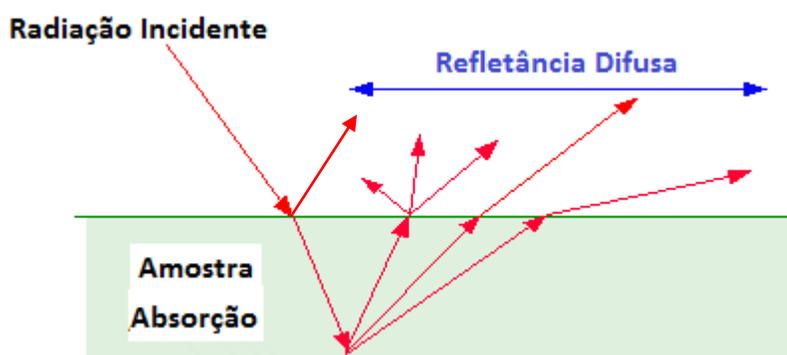


Figura 7. Relação entre a radiação incidente, absorvida e refletida de forma difusa, característica dos fármacos estudados neste trabalho.

Quanto maior o espalhamento da luz incidente maior é a queda do sinal analítico. Superfícies muito irregulares tendem a espalhar mais a luz refletida o que diminui a intensidade do sinal luminoso que chega ao detector, levando à menor sensibilidade^{41,42}. Se a superfície apresentar cor, o que é função da quantidade da substância colorida presente, dependendo do comprimento de onda utilizado, a absorção de luz também estará relacionada com a concentração dessa substância^{34,39}.

Para melhorar a sensibilidade dos aparelhos e a análise quantitativa por métodos refletométricos, pode-se multiplicar o sinal que chega ao detector através do uso de uma cela de integração, como observado na figura 8.

Ao incidir sobre uma amostra de superfície irregular, um feixe de radiação, uma parte desta é absorvida e outra parte é refletida de modo difuso já que as superfícies dos anteparos são irregulares. No interior da esfera de integração, os diversos feixes de

radiação sofrem múltiplas reflexões sucessivas, terminando por atingir o detector, ampliando-se, assim, a quantidade de radiação que o atinge.

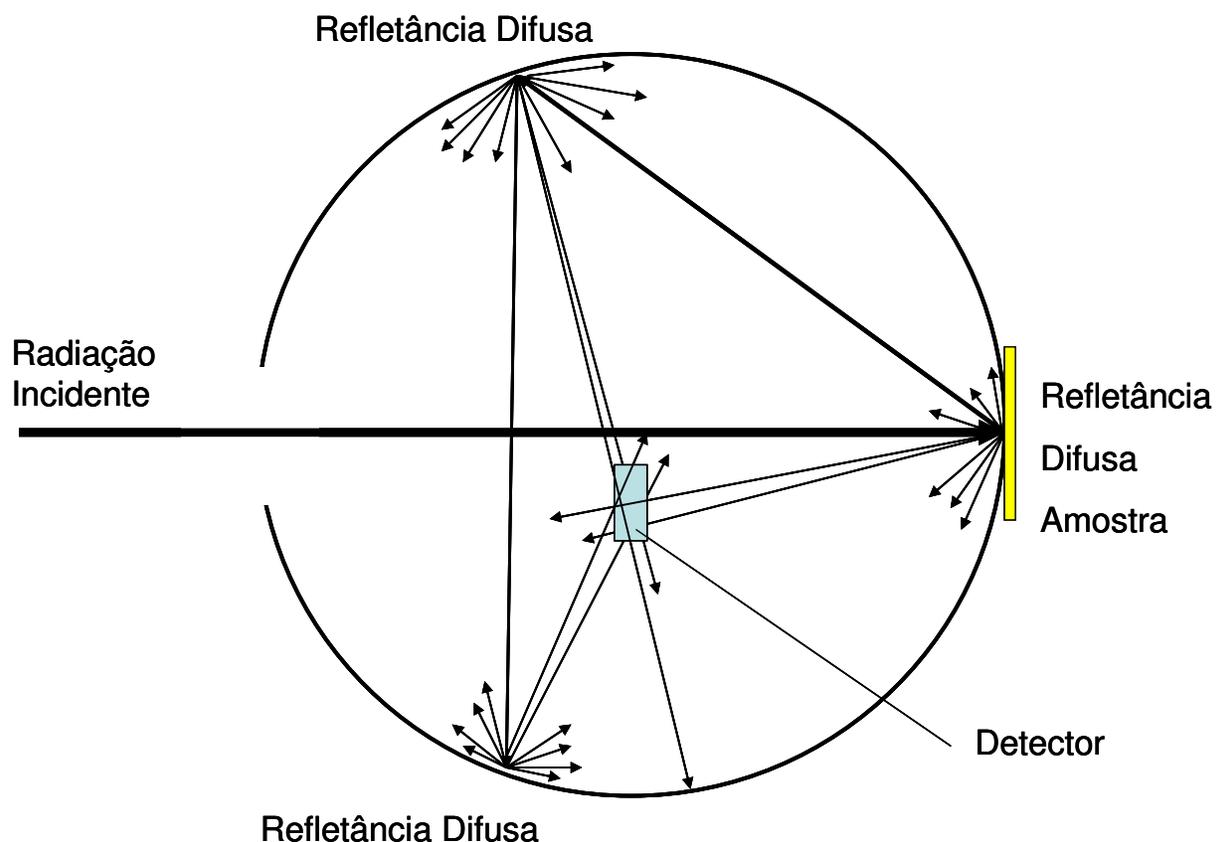


Figura 8. Radiação incidente seguida de reflexão por parte da amostra. Deve-se considerar todas as direções possíveis para os diversos feixes de luz refletidos e as suas respectivas reflexões sucessivas, ampliando o número de feixes de radiação que passam pelo detector.

A esfera de integração, como acessório para refletância difusa, têm como função diminuir a perda da radiação que atinge o detector, em função do espalhamento do feixe luminoso sobre a superfície da amostra. O sistema consiste de uma câmara geometricamente projetada, totalmente revestida com material reflexivo de pigmentação

branca, dióxido de titânio, por exemplo, que têm como função refletir sucessivamente em todas as direções os feixes de luz provenientes da superfície da amostra. Desta maneira aumenta-se a intensidade de radiação que alcança o detector melhorando a sensibilidade do equipamento^{43,44}.

Os diversos modelos de cela de integração amplificam estes sinais aumentando a sensibilidade dos aparelhos em geral.

A figura 9 mostra o acessório de refletância para o aparelho Shimadzu UV 2450, de feixe duplo, utilizado neste trabalho, onde pode ser vista a esfera de integração e as posições da amostra e do branco.

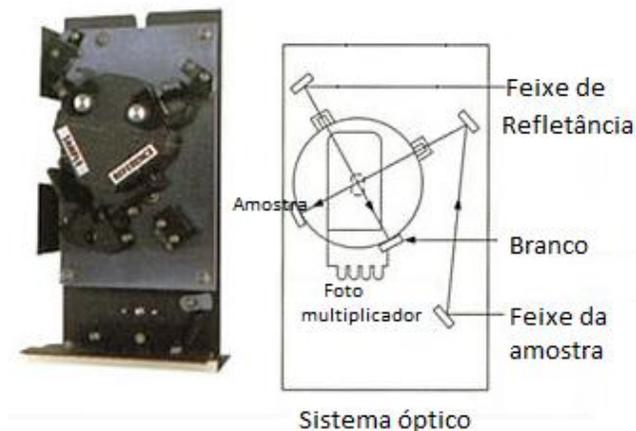


Figura 9. Acessório de refletância Shimadzu (esquerda) e esquema de integração da radiação luminosa (direita), através de uma cela de integração (foto multiplicador).

O modelo teórico de Kubelka e Munk para o fenômeno de refletância, foi desenvolvido para descrever em termos quantitativos, e de um modo relativamente simples, a intensidade de luz refletida por uma superfície³⁴.

A teoria de Kubelka-Munk simplifica os processos que ocorrem quando a luz incide sobre um material (absorção, reflexão e transmissão), estabelecendo que o material absorve parcialmente a luz que recebe, sendo o restante refletido. A proporção de luz absorvida depende do coeficiente de absorção do material (**K**) e a de luz refletida depende do fator de dispersão do material (**S**). O fundo sobre o qual se situa a amostra

que está sendo observada (se é transparente ou translúcido) e a espessura da amostra (densidade de empacotamento) exercem influência sobre os parâmetros K e S .

Kubelka e Munk deduziram uma equação que permite obter a seguinte relação entre a luz refletida (T_R) e os coeficientes de absorção (K) e de dispersão (S):

Equação 1

$$f(T_R) = \frac{(1 - T_R)^2}{2T_R} = \frac{K}{S}$$

Como K possui uma relação linear com a concentração ($K = \varepsilon \times C$, sendo ε a absortividade molar da amostra) é possível escrever a equação acima em função da concentração:

Equação 2

$$\frac{(1 - T_R)^2}{2T_R} = \frac{\varepsilon \times C}{S}$$

A aplicação da Equação de Kubelka-Munk estabelece uma relação linear entre a concentração da amostra e a função ($f(T_R)$) para concentrações altas e moderadas. No entanto observa-se desvio de linearidade para baixas concentrações. Em virtude disto, muitas vezes, as curvas analíticas são obtidas de forma a se ter um resultado com boa linearidade, isto é, constroem-se os gráficos que relacionam, por exemplo, $\log(T_R - T_R')$ vs. $1/C$ (onde T_R é a refletância da amostra e T_R' é a refletância do suporte utilizado).

É bom ressaltar que a validade da equação de Kubelka-Munk envolve aproximações, uma vez que considera o valor de refletância da referência igual a 1, ou máximo de radiação incidente 100%.

2. OBJETIVOS

Este projeto teve como objetivo o desenvolvimento e validação de métodos analíticos quantitativos para a quantificação de nitrofurazona e nitrofurantoína em amostras farmacêuticas, usando as técnicas de refletância difusa e de transmissão, na região uv-visível do espectro, comparando-os posteriormente com o método oficial por HPLC, recomendado pela farmacopéia americana.

3. PARTE EXPERIMENTAL

3.1. MATERIAIS E REAGENTES

- Metanol grau HPLC (Tedia);
- Acetonitrila 99,9% v/v HPLC (Sigma-Aldrich);
- Acetanilida grau analítico (Merck).
- Dimetilformamida (Vetec);
- Trietilamina(Sigma-Aldrich);
- Ácido fosfórico P.A.(Merck);
- Fosfato de potássio (Merck);
- Hidróxido de sódio (Sigma-Aldrich);
- Água destilada (destilador de vidro) e deionizada (Milli Q Plus);
- Polietilenoglicol I.P. 40000, fornecido pela Mantecorp;
- Nitrofurazona, produto certificado 99,0 %, gentilmente fornecida pela Mantecorp Indústria Química e Farmacêutica Ltda.
- Nitrofurantoína 99%, Sigma- Aldrich, grau analítico.
- Papel de filtro qualitativo - Qualy 14 μ m de porosidade;
- Filtros de membrana Millipore 0,45 μ m;
- Cromatógrafo Shimadzu Prominece com coluna C18 (Varian, Microsorb MV) e detector com arranjo de diodos SPD-M20A;
- Balança analítica Mettler Toledo AX205 Delta Range, $\pm 0,01$ mg.
- Balança analítica Shimadzu AX-200, $\pm 0,1$ mg.

3.2. EQUIPAMENTOS

- Equipamento de HPLC Shimadzu Prominence SPP-M20, coluna C18 - μ Bonbapac, de comprimento 300 mm, ID 3,9 milímetros, tamanho de partícula 10 μ m; \varnothing - 125 angstroms.
- Espectrofotômetro de ultravioleta visível Shimadzu UV-2450 equipado com um acessório de refletância.
- Refletômetro manual: A cela de refletância já foi descrita em detalhes (Matias *et al.*, 2003)³⁹ e neste artigo é mostrada na figura 10. No presente caso é composta por um LED azul E1L31-3G0A2 Toyoda Gosei Co. Ltd. com \varnothing 3 mm ED; com ângulo de visão de 15° e um resistor detector de luz (LDR) de 5 mm de diâmetro.

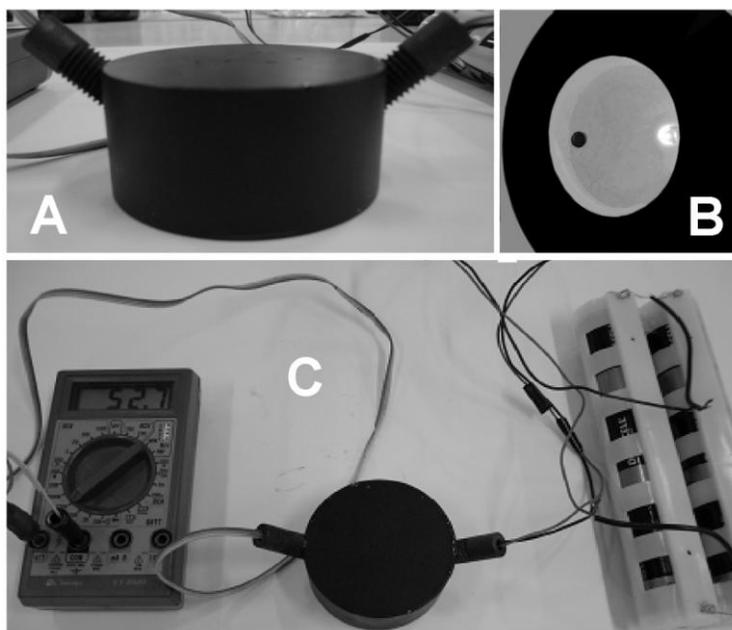


Figura 10. **A** - cela de refletância portátil; **B** - LED aceso e resistor detector de luz [LDR] na parte interna da cela; **C** - conjunto de refletância alimentado por pilhas fornecendo 4,5 V e acoplado ao multímetro.

3.3. NITROFURAZONA

3.3.1. Tratamento das amostras

3.3.1.1. Curva analítica e análise das amostras comerciais

3.3.1.1.1. Método de Refletância Difusa

Para a construção das curvas analíticas, soluções de nitrofurazona padrão foram preparadas dissolvendo-se o analito em polietilenoglicol (grau de polimerização 4×10^4) em relação m/m. Estas amostras foram acondicionadas em um frasco de vidro âmbar de 50 mL.

A mistura foi aquecida em banho de água a 60 °C durante 5 minutos. Após a “fusão” do solvente, a homogeneização da solução foi feita com um bastão de vidro e agitação manual. Ao esfriar, as soluções adquiriram o aspecto homogêneo de uma pomada. A tabela 1 apresenta os valores de concentração das soluções de nitrofurazona preparadas em polietilenoglicol, para a construção da curva analítica.

Tabela 1. Soluções de nitrofurazona em polietilenoglicol preparadas para a construção da curva analítica.

| Solução | Massa de Nitrofurazona / (g) | Massa de polietilenoglicol / (g) | Concentração / (mg g^{-1}) |
|---------|------------------------------|----------------------------------|---------------------------------------|
| A | 0,0200 | 20,0024 | 1,000 |
| B | 0,0251 | 20,0011 | 1,255 |
| C | 0,0301 | 20,0023 | 1,505 |
| D | 0,0350 | 20,0021 | 1,750 |
| E | 0,0400 | 20,0023 | 2,000 |
| F | 0,0499 | 20,0027 | 2,495 |
| G | 0,0596 | 20,0016 | 2,980 |

Estas concentrações apresentavam valores adequados de modo a ajustar a curva de analítica acima e abaixo da concentração nominal do fármaco nas preparações farmacêuticas comerciais, com a finalidade de simplificar a análise das mesmas.

Cada uma das soluções de nitrofurazona foi colocada sobre o suporte, papel manteiga com dimensões de 4x8 cm $L \times h$, sem necessidade de pesagem e espalhada como se observa na figura 11A. O papel foi dobrado, seguindo aquecimento por 5 minutos a 60 °C em estufa. Na seqüência, abriu-se o papel e o excesso da pomada foi retirado manualmente utilizando-se papel absorvente, por exemplo, lenço de papel. Uma folha de PVC preto (cloreto de polivinila) foi colocada entre as duas partes do papel (figura 11B) e a absorbância da amostra foi determinada em 385 nm em espectrofotômetro Shimadzu (figura 11C) ou no dispositivo portátil construído em nosso laboratório utilizando um diodo emissor de luz azul de acordo com o instrumento descrito por Matias *et al.*³⁹, apresentado anteriormente na figura 10.

As amostras de nitrofurazona provenientes das preparações farmacêuticas comerciais foram analisadas diretamente, sem necessidade de pesagem ou diluição, seguindo o procedimento de espalhamento e difusão no papel como apresentado para as amostras que resultaram a curva analítica.

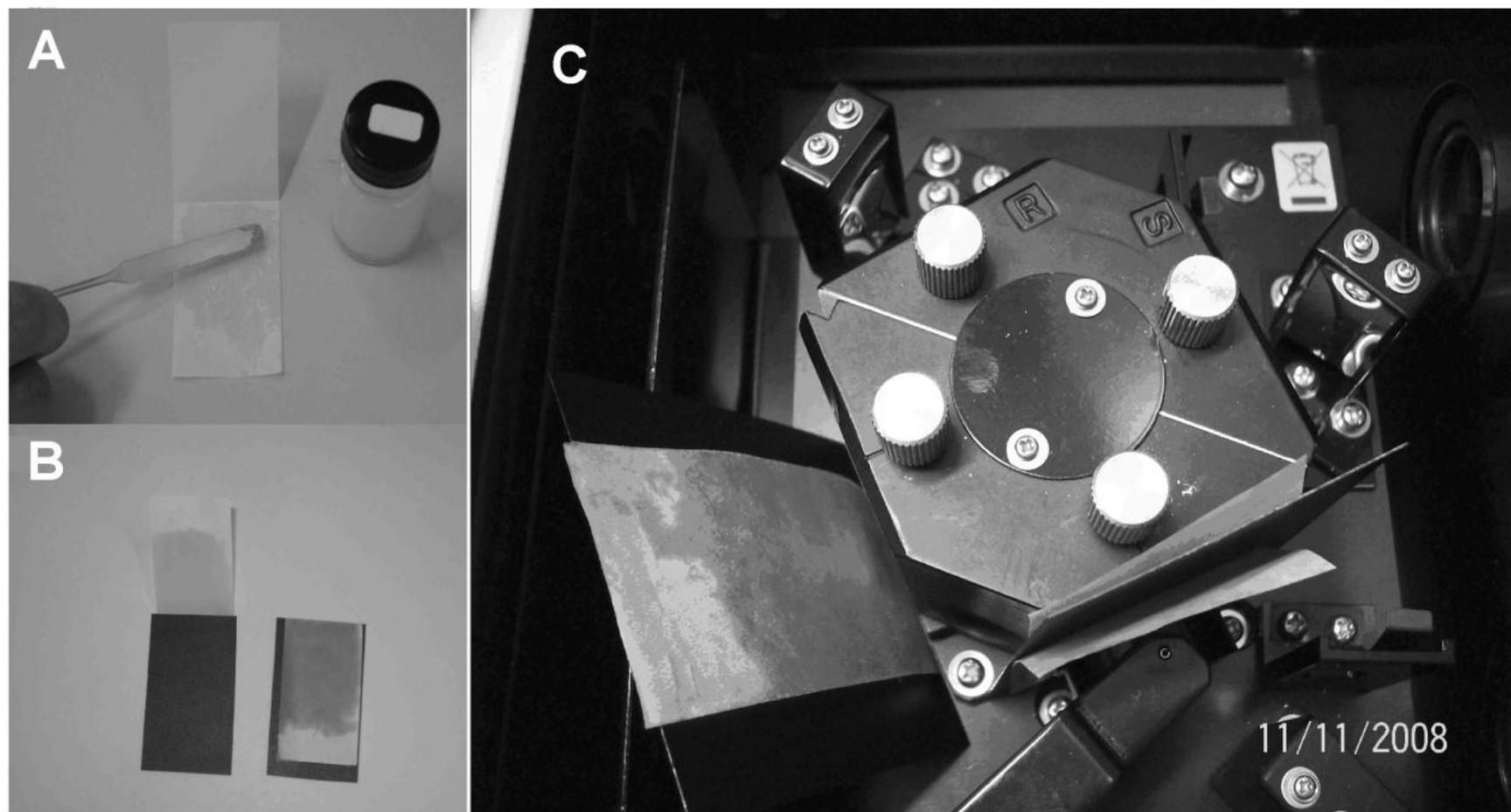


Figura 11. (A)- Espalhamento da pomada comercial ou da solução preparada em polietilenoglicol em papel manteiga; (B)- Amostra após a difusão em papel facilitada pela sua “fusão” na estufa e separação das duas faces do papel com lâmina de PVC; (C) - posicionamento da amostra na cela de refletância Shimadzu.

3.3.1.1.2. Método de Transmissão

Observou-se neste trabalho, que a nitrofurazona dissolvida em polietilenoglicol, tem a sua solubilidade muito aumentada em água, o que permite a preparação de soluções aquosas. Assim, foram preparadas soluções de concentrações conhecidas de nitrofurazona em água.

Foram pesadas cuidadosamente, num frasco âmbar de 50 mL, em uma balança analítica, alíquotas ao redor de 0,200g da solução padrão B (1,255 mg g⁻¹), utilizada no procedimento de refletância difusa, descrita na página 29. A seguir adicionou-se água a fim de obter as concentrações desejadas (mg de nitrofurazona por grama de solução). A curva analítica foi obtida a partir de 12 soluções cujas concentrações variaram entre $2,0 \times 10^{-3}$ mg g⁻¹ e 14×10^{-3} mg g⁻¹. As absorvâncias foram medidas a 375 nm utilizando cubetas de quartzo de 1,00 cm de caminho óptico.

As concentrações das soluções obtidas a partir da preparação farmacêutica comercial, foram ajustadas na sua preparação de modo a se incluírem nos limites da curva analítica e, posteriormente, tiveram sua absorvância analisada de maneira análoga.

3.3.1.1.3. Método HPLC

O método recomendado pela USP¹⁵ para quantificação de nitrofurazona é o de HPLC. Primeiramente foi preparado um tampão de trietilamina¹⁵, onde 100 mL deste solvente orgânico foram colocados em um balão de 1000 mL. Na seqüência 800 mL de água resfriada foram adicionados. Após homogeneização, 80 mL de ácido fosfórico concentrado foram cuidadosamente adicionados sob agitação constante. Depois que a solução atingiu a temperatura ambiente (25 °C) o volume foi completado e parte da solução obtida foi filtrada através de um filtro de nylon com porosidade 0,5 µm.

Uma solução solução-padrão de nitrofurazona¹⁵ foi preparada dissolvendo 50,0 mg de nitrofurazona em um balão de 50,0 mL, com 10,0 mL de dimetilformamida. O volume foi completado com etanol e a solução homogeneizada. 10,0 mL desta solução

foram transferidos para um balão de 100,0 mL, completando novamente o volume com etanol. Outra alíquota de 10,0 mL foi retirada desta solução e transferida para um balão de 100,0 mL contendo 15,0 mL de etanol, e o volume foi completado com água. Esta solução foi filtrada através de um filtro de nylon com porosidade 0,5 μm . Esta solução apresentava concentração $11,3 \times 10^{-3} \text{ mg g}^{-1}$ de nitrofurazona e foi analisada como uma das soluções problema.

A curva analítica foi construída a partir de diluições oriundas da preparação B ($1,255 \text{ mg g}^{-1}$; vide tabela 1) de nitrofurazona resultando em concentrações de $4,43 \times 10^{-3}$, $7,12 \times 10^{-3}$, $8,56 \times 10^{-3}$, $12,1 \times 10^{-3}$, $12,7 \times 10^{-3}$, $13,6 \times 10^{-3}$ e $13,7 \times 10^{-3} \text{ mg g}^{-1}$.

As soluções das preparações comerciais do fármaco foram feitas da seguinte forma. Alíquotas de nitrofurazona de massa aproximada de 1 mg pesadas em uma balança analítica, foram transferidas quantitativamente para um balão de 100,0 mL. Na sequência 0,2 mL de dimetilformamida e 25 mL de etanol foram adicionados. Essas soluções foram tratadas com ultra-som durante 30 minutos. O volume foi completado com água e as soluções finais foram filtradas através de um filtro de nylon com 0,5 μm de porosidade.

As condições cromatográficas utilizadas durante o procedimento foram: uma coluna C-18 octadecilsilano, $\mu\text{Bondapak C18}$ (3,9 x 300 mm) da Waters de 5 μm de tamanho das partículas; fase móvel formada por uma solução contendo água, acetonitrila e tampão trietilamina na proporção 790:200:10 v/v/v; vazão de 2 mL min^{-1} ; volume de injeção 20 μL ; tempo de eluição cerca de 8 minutos. A detecção foi feita em 375 nm segundo a norma da farmacopéia americana¹⁵.

3.4. NITROFURANTOÍNA

3.4.1. Tratamento das amostras

3.4.1.1. Curva analítica e análise das amostras comerciais

3.4.1.1.1 Procedimentos preliminares

A nitrofurantoína é apresentada no comércio farmacêutico encapsulada em macrocristais que, como pode ser observado na figura 12, são formados por substâncias de cor marrom escura (a nitrofurantoína é amarela).



Figura 12. Amostra do fármaco Macrodantina®, após cuidadosa trituração em almofariz. Na fotografia podem ser vistos, dispersos no medicamento, resíduos de materiais escuros usados para a formação dos macrocristais da preparação farmacêutica.

Os conteúdos de 10 cápsulas da preparação comercial foram pesados, obtendo-se a massa média de $0,3642 \pm 0,0015$ g por cápsula. A mistura destes conteúdos foi usada para as análises.

Num primeiro ensaio com o intuito de preparar padrões de refletância do medicamento, foi feita uma mistura de nitrofurantoína com excipientes comuns à formulação comercial (Mantercop). Para fins de diluição foi usada uma mistura de amido, talco e lactose anidra, na proporção de 1:1:1 em massa. Um padrão de nitrofurantoina foi preparado com cuidadosa trituração em almofariz, para boa homogeneização, resultando em concentração de $272,6 \text{ mg g}^{-1}$.

A preparação farmacêutica adquirida junto ao comércio, foi cuidadosamente triturada em almofariz com pistilo. A concentração de nitrofurantoína neste medicamento é de $274 \pm 1 \text{ mg g}^{-1}$, levando em conta o valor nominal de 100 mg e a massa média de cada comprimido.

Essas misturas sólidas foram usadas em estudos preliminares de refletância difusa no espectrofotômetro Shimadzu UV-2450. Para isso foram usados suportes para sólidos que podem ser observados na figura 13. Os resultados obtidos não permitiram correlação entre a radiação absorvida em processo de refletância e a concentração do analito. Isto ocorreu, provavelmente, devido às diferenças na granulação das misturas, além de diferenças na compactação das mesmas no suporte (cela de refletância) e, principalmente, da presença de grânulos escuros existentes na preparação comercial (13A) provenientes do macro encapsulamento, inexistentes na preparação feita no laboratório (13C).

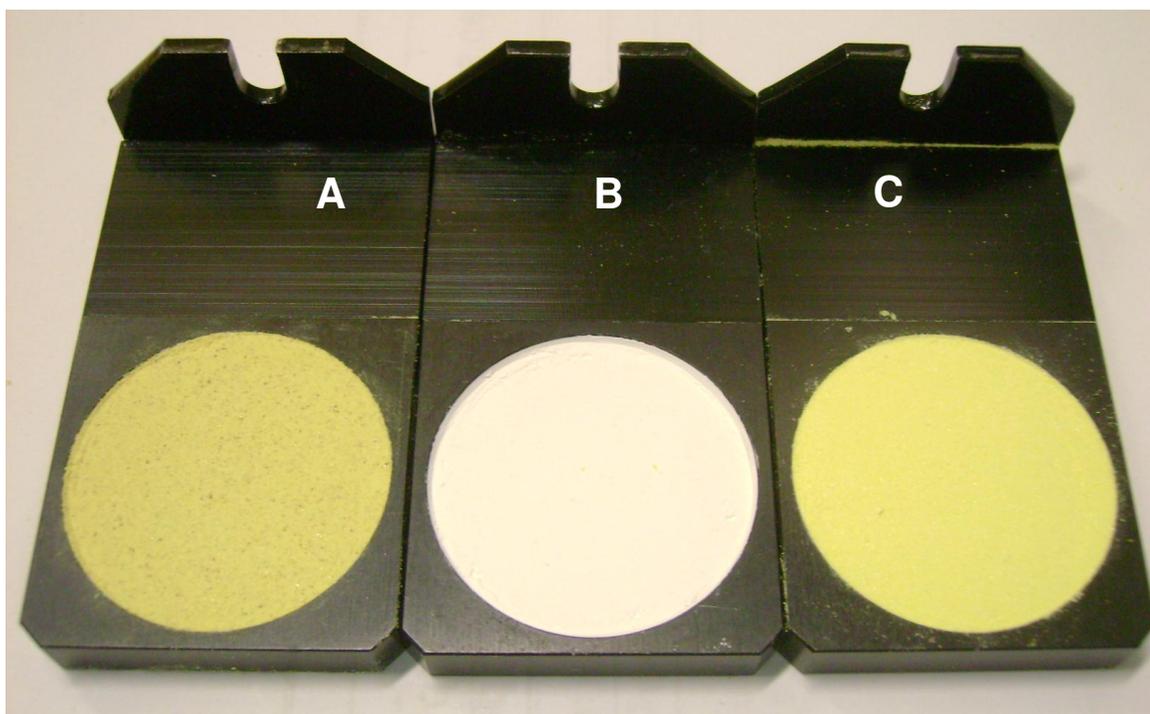


Figura 13. Cella de refletância difusa para material sólido. **(A)** - Preparação comercial triturada em almofariz; **(B)** - Branco (amido, talco e lactose na proporção 1:1:1m/m); **(C)** - Mistura sólida nitrofurantoína preparada de com excipiente de amido, talco e lactose, estes na proporção 1:1:1: m/m.

Como esperado, os resíduos dos materiais usados para a formação dos macrocristais permanecem misturados na amostra mesmo após trituração severa. Estes grãos, além de gerarem maior absorvância e, também, dispersão da luz incidente, retêm parte do analito na forma encapsulada o que prejudica seriamente a quantificação, não se observando correspondência entre os valores de refletância, ou de transmissão, e a concentração de analito na amostra.

A partir deste ponto, com o intuito solucionar o problema, pensou-se que, como a nitrofurantoína apresenta boa solubilidade em polietilenoglicol, este, ao ser usado como solvente do fármaco levaria a uma solubilização do princípio ativo, separando-o do material não solúvel presente na amostra.

Visando a obtenção de soluções de nitrofurantoína em polietilenoglicol, dissolveu-se 150,8 mg da preparação comercial em 4,4575 g de polietilenoglicol, resultando numa solução de concentração estimada, considerando o declarado no medicamento comercial, de $8,99 \pm 0,04 \text{ mg g}^{-1}$. Uma mistura de nitrofurantoína com excipientes (amido, talco e lactose anidra) foi dissolvida em polietilenoglicol resultando em uma concentração $13,52 \pm 0,05 \text{ mg g}^{-1}$ (miligramas do fármaco por grama da solução). Quando estas duas soluções foram analisadas no espectrofotômetro Shimadzu UV-2450, aplicando-se procedimento de preparo da amostra similar ao utilizado na quantificação da nitrofurazona, sobre papel manteiga, foi observada correlação entre absorvância e concentração.

Preparou-se uma nova mistura sólida da nitrofurantoína com seus respectivos excipientes que resultou em uma concentração de $272,92 \text{ mg g}^{-1}$. Esta mistura serviu de estoque para confecção de outras misturas preparadas e utilizadas no procedimento.

3.4.1.1.2. Método de Refletância Difusa

Com o objetivo de construir a curva analítica, a partir de nitrofurantoína em relação m/m, foram preparadas soluções de diversas concentrações utilizando-se como solvente o polietilenoglicol, com índice de polimerização ao redor de 4×10^4 .

As soluções foram preparadas com relação massa/massa e os valores de concentração obtidos encontram-se na tabela 2.

Tabela 2. Soluções de nitrofurantoína em polietilenoglicol preparadas para a construção da curva analítica, a partir de mistura sólida (contendo amido, talco e lactose anidra) de concentração $272,92 \text{ mg g}^{-1}$.

| Solução | Massa da mistura nitrofurantoína e excipiente / (g) | Massa total da solução em Polietilenoglicol / (g) | Concentração / (mg g^{-1}) |
|---------|---|---|---------------------------------------|
| A | 0,0159 | 3,0274 | 1,43 |
| B | 0,0233 | 3,0243 | 2,10 |
| C | 0,0293 | 3,0336 | 2,64 |
| D | 0,0380 | 3,0389 | 3,41 |
| E | 0,0448 | 3,0135 | 4,06 |

A mistura sólida de nitrofurantoína com os excipientes foi pesada, dentro de um frasco âmbar de 60 mL onde foi introduzido e pesado o polietilenoglicol. A homogeneização foi feita aquecendo a mistura até $60 \text{ }^{\circ}\text{C}$ e misturando com um bastão de vidro. Com a diminuição da viscosidade do polietilenoglicol ocorre a dissolução do soluto e, portanto, a homogeneização é feita facilmente.

As soluções de nitrofurantoína utilizadas para construção da curva analítica foram preparadas seguindo procedimento semelhante ao empregado na análise da nitrofurazona. Foram espalhadas sem necessidade de pesagem, no suporte (papel manteiga). O papel foi dobrado e aquecido em estufa a 60°C por 5 minutos. Na sequência, ele foi aberto e o excesso de pomada foi retirado manualmente utilizando-se papel absorvente. A folha de PVC foi inserida entre as duas partes do papel e a absorbância das amostras, pelo processo de refletância difusa, foram determinadas em 385 nm no espectrofotômetro Shimadzu ou no dispositivo portátil construído em nosso laboratório utilizando um diodo emissor de luz azul de acordo com o instrumento descrito por Matias *et al.*³⁹.

Utilizando estas soluções foi obtida uma curva analítica que foi usada para a determinação da concentração de nitrofurantoína em amostras de Macroantina® (Mantercop) compradas em farmácias locais.

Devido à presença de grânulos escuros nas amostras trituradas de nitrofurantoína, que impediram a análise direta em fase sólida das preparações farmacêuticas, decidiu-se estudar a possibilidade de solubilizar as amostras em polietilenoglicol e suportá-las em papel manteiga, da mesma forma como feito no caso na nitrofurazona.

Nesse procedimento, pequena quantidade de macrocristais escuros permanecia no papel. No entanto, devido à posterior limpeza com lenço de papel, estes cristais foram facilmente removidos o que possibilitou as medidas de refletância.

Na figura 14 pode ser vista a solução em polietilenoglicol espalhada no papel manteiga. Deve-se impregnar o papel, como no caso da nitrofurazona, no lado mais áspero já que do lado liso há uma camada de cera que dificulta a difusão da solução pelo papel.

Dobra-se a seguir, de modo que a solução fique na parte interna do papel. Não há necessidade de pesagem da alíquota colocada sobre o papel.



Figura 14. Espalhamento, sobre o papel manteiga, da solução da preparação farmacêutica em polietilenoglicol.

Em seguida, o papel impregnado deve ser levado à estufa, ajustada em 60 °C onde deve ficar por cerca de cinco minutos. Este procedimento diminui a viscosidade do solvente e facilita a difusão da solução do fármaco no papel.

Depois de retirar o papel da estufa, abre-se a dobradura. O excesso de pasta é retirado com o auxílio de uma folha de papel macio e absorvente, por exemplo, lenço de papel, como mostra a foto na figura 15. Os cristais do material de encapsulamento por não se dissolverem no polietilenoglicol foram retirados simplesmente pela passagem do lenço de papel.

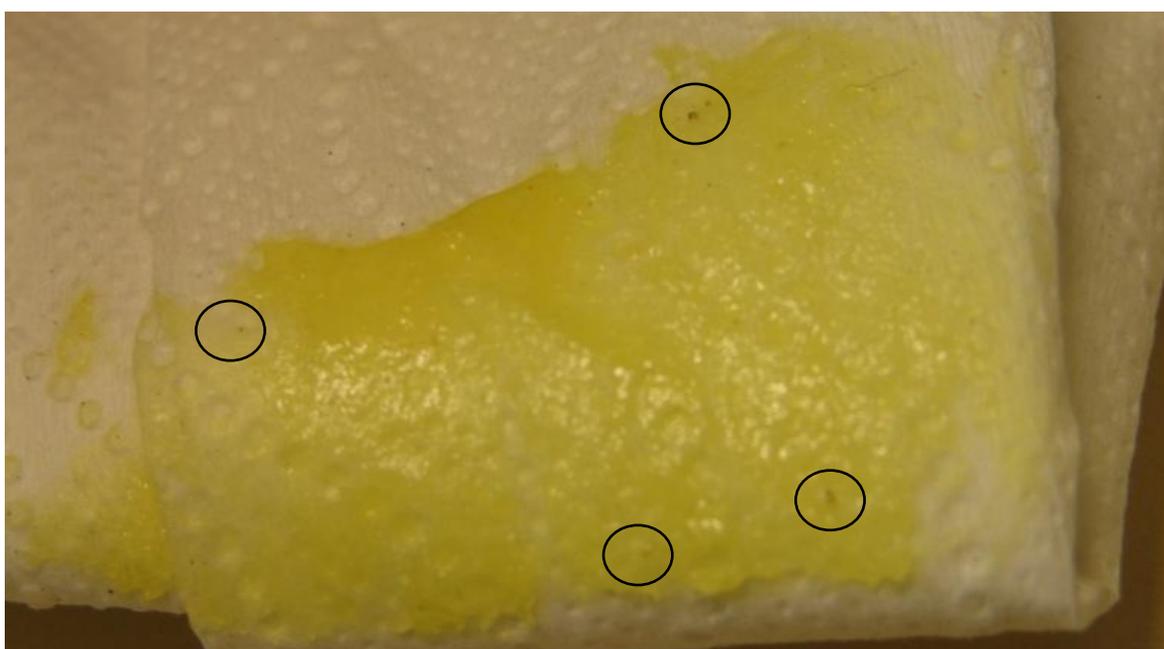


Figura 15. Visão do lenço de papel usado para a retirada do excesso da solução em polietilenoglicol colocada sobre o papel manteiga. Os destaques indicam os grânulos escuros, retirados com a passagem do lenço de papel juntamente com “pasta” contendo o fármaco.

Em seguida, uma lâmina de PVC preto é inserida no interior do papel separando as duas partes da dobradura (figura 16A). Isto é feito para evitar a eventual reflexão da radiação na segunda face do papel, fazendo com que não se obtivesse boa correlação entre refletância e concentração.

O papel contendo a amostra, depois de aquecido e retirado o excesso do medicamento, está suficientemente seco. Neste estado, é levado ao refletômetro, onde são obtidos os espectros de absorbância, em processo de refletância (figura 16B) em 385 nm em espectrofotômetro Shimadzu. No dispositivo portátil construído em nosso laboratório é obtida a refletância medida em ohm (unidade de resistência elétrica)^{39, 45,46}.

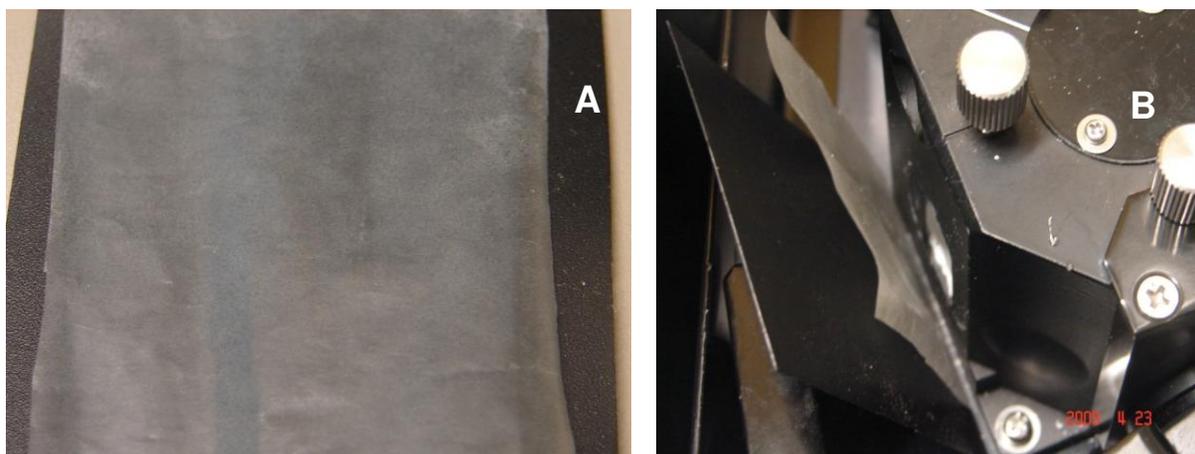


Figura 16. (A) - Separação das duas folhas da dobradura por uma lâmina de PVC preto; **(B)** - Posicionamento da amostra no equipamento de refletância.

Livre da interferência dos grânulos as amostras comerciais de nitrofurantoína foram analisadas quantitativamente, obtendo-se coerência nos resultados.

Alternativamente, podem-se fazer as medidas em um comprimento de onda fixo, 385 nm. Neste trabalho, porém, como se trata de desenvolvimento de método, foram obtidos os espectros de refletância entre 300 nm e 500 nm com intenção de verificar possíveis alterações espectrais em função do aquecimento e, também, em função da variação da concentração.

3.4.1.1.3. Método de transmissão

A solubilidade da nitrofurantoína em água é muito pequena, sendo porém muito alta em polietilenoglicol. No entanto, dissolvendo em água a solução de nitrofurantoína em polietilenoglicol, resulta uma solução aquosa estável por, pelo menos, 72 horas. Após este período nota-se o surgimento de turvação, seguida de material particulado em suspensão que provavelmente é o fármaco precipitado.

As soluções usadas para a construção da curva analítica foram feitas a partir de solução em polietilenoglicol preparada para a análise por refletância difusa. Utilizou-se a solução B, de concentração $2,10 \text{ mg g}^{-1}$ de nitrofurantoína em excipientes e polietilenoglicol (vide tabela 2).

A partir da solução B de nitrofurantoína em polietilenoglicol, pesou-se em balança analítica, dentro de um frasco, as quantidades necessárias de modo a obter as concentrações desejadas na solução final em mg g^{-1} . A água foi também adicionada no mesmo frasco e pesada. A tabela 3 relaciona as soluções aquosas preparadas.

Tabela 3. Soluções aquosas de nitrofurantoína em polietilenoglicol preparadas para a construção da curva analítica do método por transmissão.

| Solução | Solução de Nitrofurantoína em polietilenoglicol / g | Massa final da Solução / g | Concentração / $10^{-3} \text{ mg g}^{-1}$ |
|---------|---|----------------------------|--|
| I | 0,0160 | 20,2094 | 1,67 |
| II | 0,0307 | 23,2489 | 2,78 |
| III | 0,0404 | 21,7468 | 3,91 |
| IV | 0,0546 | 20,7955 | 5,52 |
| V | 0,0662 | 20,7956 | 6,69 |
| VI | 0,0846 | 20,2090 | 8,80 |

As absorvâncias das soluções foram medidas em 368 nm em espectrofotômetro usando cubetas de quartzo de 1,00 cm de caminho óptico, resultando daí uma curva analítica.

As amostras provenientes de preparações farmacêuticas comerciais, que foram utilizadas na determinação de nitrofurantoína por refletância difusa, serviram de base para o preparo das soluções aquosas que foram analisadas pelo método da transmitância. Estas soluções tiveram a ordem de grandeza de suas concentrações ajustadas para se inserirem na curva analítica do método.

Ao analisar com atenção as soluções aquosas produzidas a partir da preparação comercial, percebeu-se que os grãos escuros, provenientes do encapsulamento, permanecem em parte como interferentes nas medidas podendo, se necessário, serem separados facilmente por filtração ou por centrifugação.

3.4.1.1.4. Método HPLC

O método recomendado pela USP¹⁵ para quantificação de nitrofurantoína é o HPLC. A primeira parte do processo investigativo se dá pela preparação do tampão fosfato pH 7,0, onde foram pesados em balança analítica 6,8 g de fosfato de potássio monobásico que foram dissolvidos em 500 mL de água deionizada. Adicionou-se à solução, hidróxido de sódio $1,0 \text{ mol L}^{-1}$ (preparado a partir de 4,0 g de NaOH em um balão de 100 mL) suficiente para ajustar o pH da solução em 7,0. Ao final, diluiu-se com água deionizada em um balão volumétrico até a marca de 1,0 L.

A fase móvel utilizada no HPLC foi preparada pela mistura de tampão fosfato pH 7,0 e acetonitrila na proporção 88:12 v/v. A fase móvel foi devidamente filtrada e degaseificada.

A solução resultante da dissolução de 0,5016 g de acetanilida em 500 mL de água deionizada, a fim de se chegar em 1 mg de acetanilida por mL de água, serviu de padrão interno.

Para preparar a solução padrão de nitrofurantoína, dissolveu-se 0,04996 g de nitrofurantoína RS (Sigma Aldrich de grau analítico) em 40,0 mL de dimetilformamida

(Vetec – UV/HPLC Espectroscópico) e adicionaram-se 50,0 mL da solução do padrão interno.

Para as amostras provenientes da preparação comercial de nitrofurantoína, transferiu-se uma alíquota equivalente a cerca de 50 mg de nitrofurantoína para um frasco de vidro com 250mL de capacidade. Adicionou-se 40,0 mL de dimetilformamida utilizando-se uma bureta. A seguir, adicionou-se 50,0 mL de solução do padrão interno, usando-se uma bureta, misturou-se e resfriou-se à temperatura ambiente. Filtrou-se uma pequena porção da solução através de um filtro de nylon 0,45 μm de porosidade, rejeitando os primeiros mililitros do filtrado. A amostra estava pronta para ser injetada no cromatógrafo.

As condições cromatográficas envolvidas na análise foram compostas do cromatógrafo Shimadzu Prominence LC-20AT acoplado a um sistema de detecção por arranjo de diodos modelo SPD-M20A da Shimadzu, ajustado a 254 nm. Utilizou-se, como coluna analítica octadecilsilano, $\mu\text{Bondapak C18}$ (3,9 x 300 mm) da Waters e a vazão foi de 1 mL por minuto.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. NITROFURAZONA

4.1.1. Refletância difusa

No procedimento de refletância difusa, diversos materiais foram testados como suportes para as soluções em polietilenoglicol: vários tipos de papel além de polímeros. Resultados promissores foram obtidos com diferentes qualidades de papel, incluindo os de filtro qualitativo e quantitativo, além de cromatográficos. Surpreendentemente, porém, os melhores resultados experimentais foram obtidos com papel manteiga comprado numa papelaria local. É importante salientar que a intenção foi desenvolver um método que pudesse oferecer resultados quantitativos usando diretamente a preparação farmacêutica na forma em que é comercializada.

É muito interessante notar que neste processo de refletância a pesagem das alíquotas, no momento de colocá-las no papel, é desnecessária. Este fato pode ser facilmente entendido já que a quantidade da substância é determinada pelas dimensões do papel na qual a reflexão ocorre e, também, por ela estar correlacionada diretamente pela concentração do analito na preparação farmacêutica. Se a substância foi sempre distribuída homoganeamente sobre o papel, o sinal analítico será proporcional à sua concentração.

A curva analítica obtida com papel manteiga, no espectrofotômetro Shimadzu, é descrita pela equação de primeiro grau $A = 0,1006 + 0,05067 C$, onde C é a concentração de nitrofurazona em miligrama por grama de solução (pomada) e A é a absorvância medida (processo de refletância) em 385 nm e está representada na figura 17. O coeficiente de correlação observado $r = 0,9987$, limite de quantificação, LOD $\cong 0,25 \text{ mg g}^{-1}$; limite de detecção, LOQ $\cong 0,75 \text{ mg g}^{-1}$.

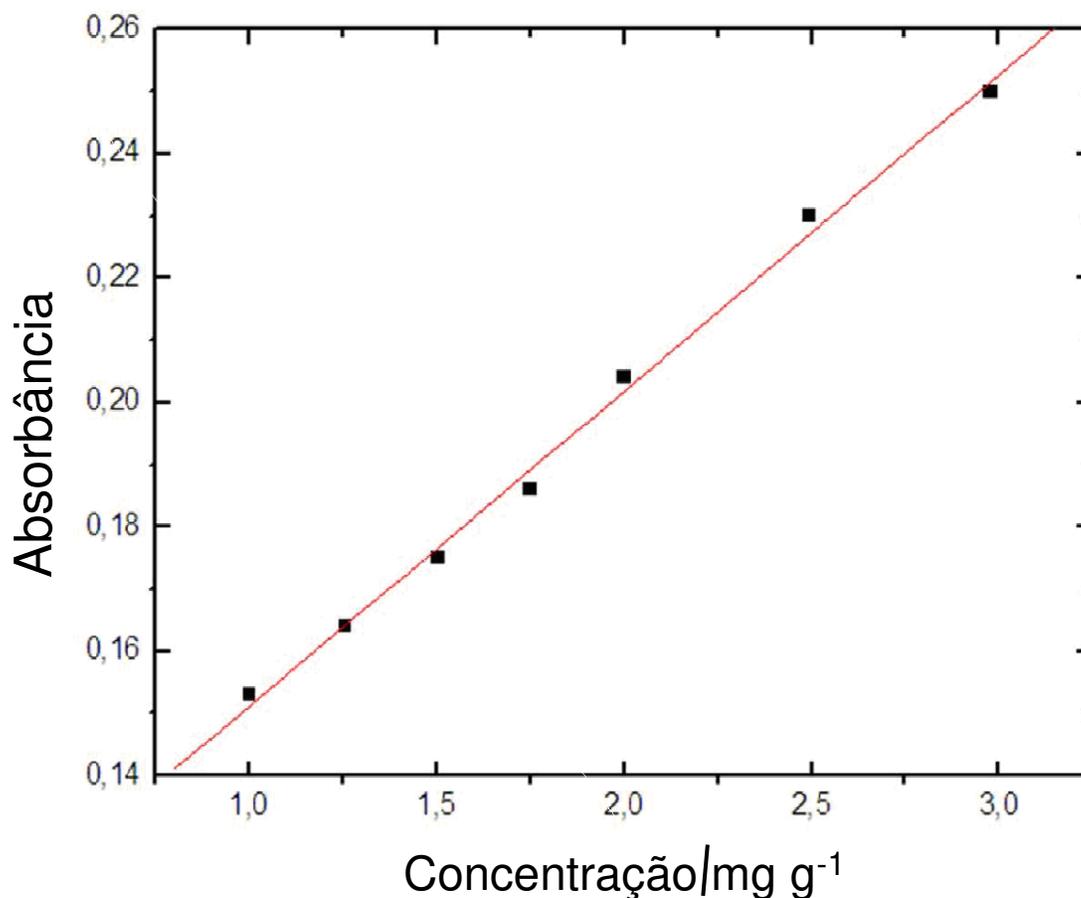


Figura 17. Curva analítica para o processo de refletância para nitrofurazona obtida com o equipamento Shimadzu UV -2450.

Com o refletômetro portátil construído no laboratório^{39,45,46} foi obtida a curva analítica com a seguinte equação $\rho = 106,0 + 8,912 C$, onde ρ é a resistência em ohms obtida no LDR, a partir da luz emitida pelo LED e C é a concentração de nitrofurazona em mg g^{-1} . A figura 18 representa a curva analítica obtida; o coeficiente de correlação linear (r) = 0,9995; LOD \cong 0,35 mg g^{-1} e LOQ \cong 1,1 mg g^{-1} .

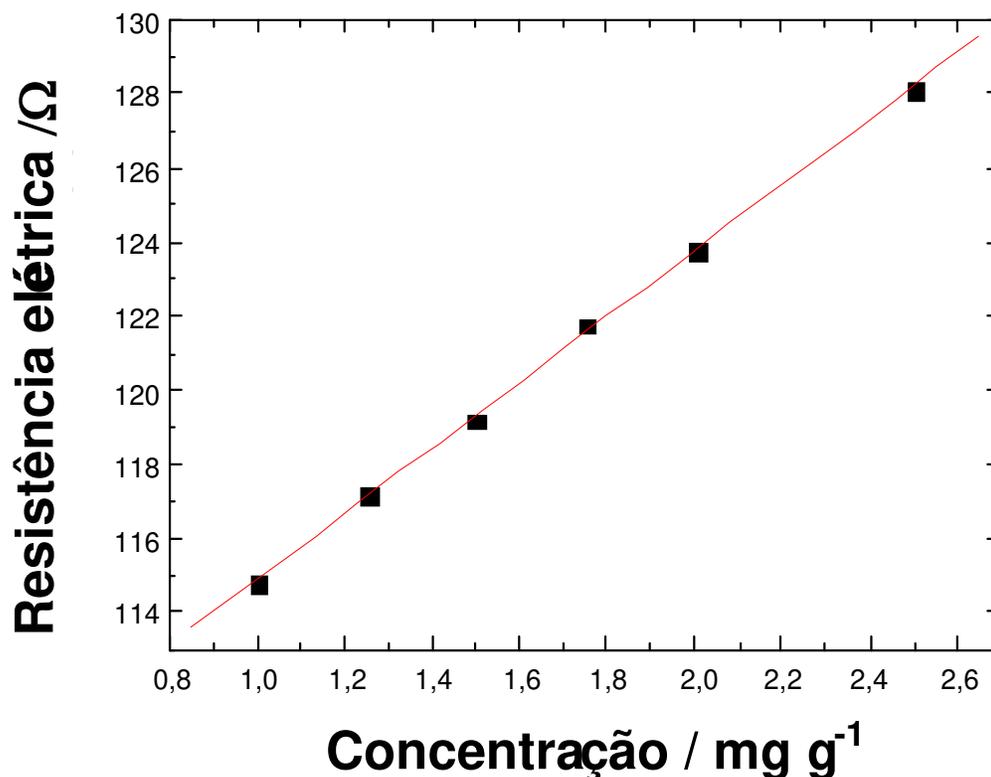


Figura 18. Curva analítica para nitrofurazona obtida com o refletômetro portátil⁸⁹.

4.1.2. Transmissão

A curva analítica para o processo de transmissão foi construída na faixa de concentração de $2 \times 10^{-3} \text{ mg g}^{-1}$ à $14 \times 10^{-3} \text{ mg g}^{-1}$, com medidas em 375 nm, tendo sido obtidos valores de absorvância entre 0,1 - 1,0. Esta curva analítica é descrita pela equação $A = -0,01674 + 0,07818 C$, onde C é a concentração de nitrofurazona em miligrama por grama de solução e A é a absorvância medida a 375 nm. O coeficiente de correlação é $r = 0,9998$; $\text{LOD} \cong 0,37 \times 10^{-3} \text{ mg g}^{-1}$; $\text{LOQ} \cong 1,1 \times 10^{-3} \text{ mg g}^{-1}$. A figura 19 apresenta a curva analítica obtida ao analisar as soluções padrão de nitrofurazona.

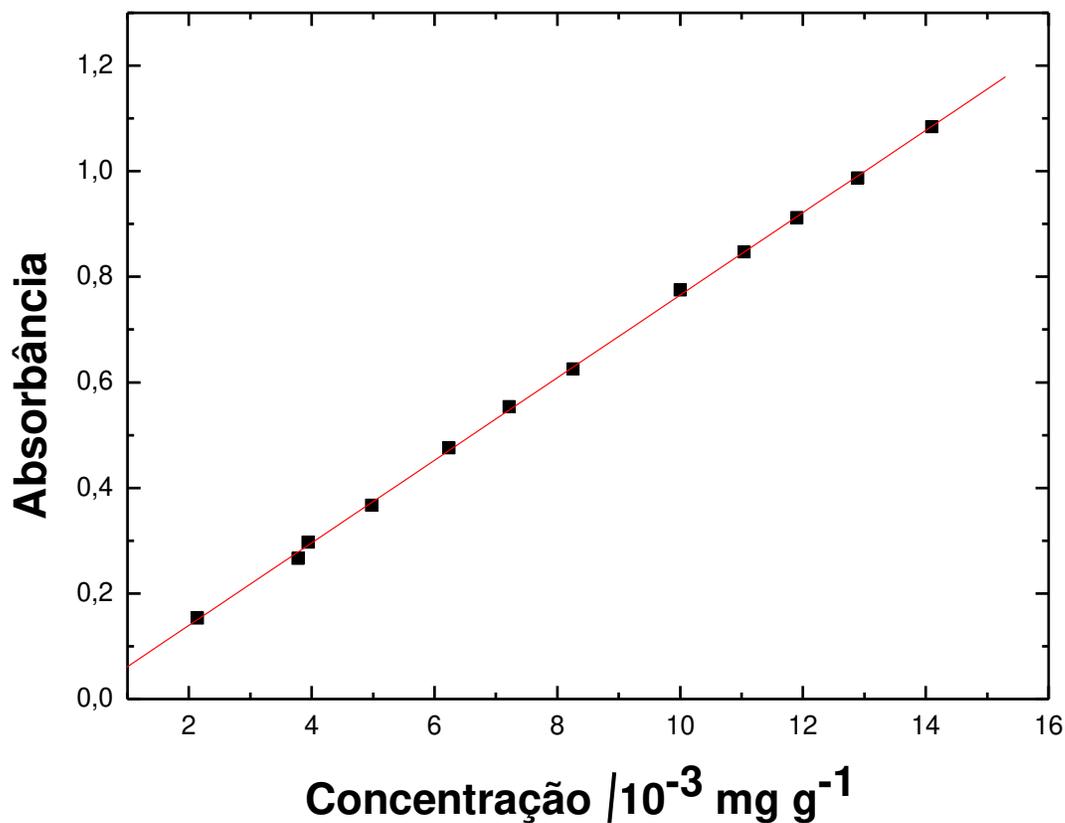


Figura 19. Curva analítica da nitrofurazona para o processo de transmissão.

A nitrofurazona é pouquíssimo solúvel em água. No entanto, quando ela é dissolvida em polietilenoglicol, de qualquer grau de polimerização, a dissolução em água é possível. As soluções obtidas se mostraram estáveis por, até 72 horas em temperatura ambiente (ca. 25 °C), precipitando, provavelmente compostos derivados da nitrofurazona após este período⁴⁷, já que a intensidade da coloração amarela diminuía.

4.1.3. HPLC

No método HPLC a curva analítica, representada pela figura 20, foi obtida com concentrações de $4,3 \times 10^{-3} \text{ mg g}^{-1}$ até $13,8 \times 10^{-3} \text{ mg g}^{-1}$. Esta curva foi descrita pela equação para $\mathbf{Ar} = -16693 + 8,6665 \times 10^7 \mathbf{C}$ onde \mathbf{C} é a concentração de nitrofurazona em mg g^{-1} na solução, e \mathbf{Ar} é a área do sinal analítico. O coeficiente de correlação é $r = 0,9962$; $\text{LOD} \cong 0,41 \times 10^{-3} \text{ mg g}^{-1}$; $\text{LOQ} \cong 1,2 \times 10^{-3} \text{ mg g}^{-1}$.

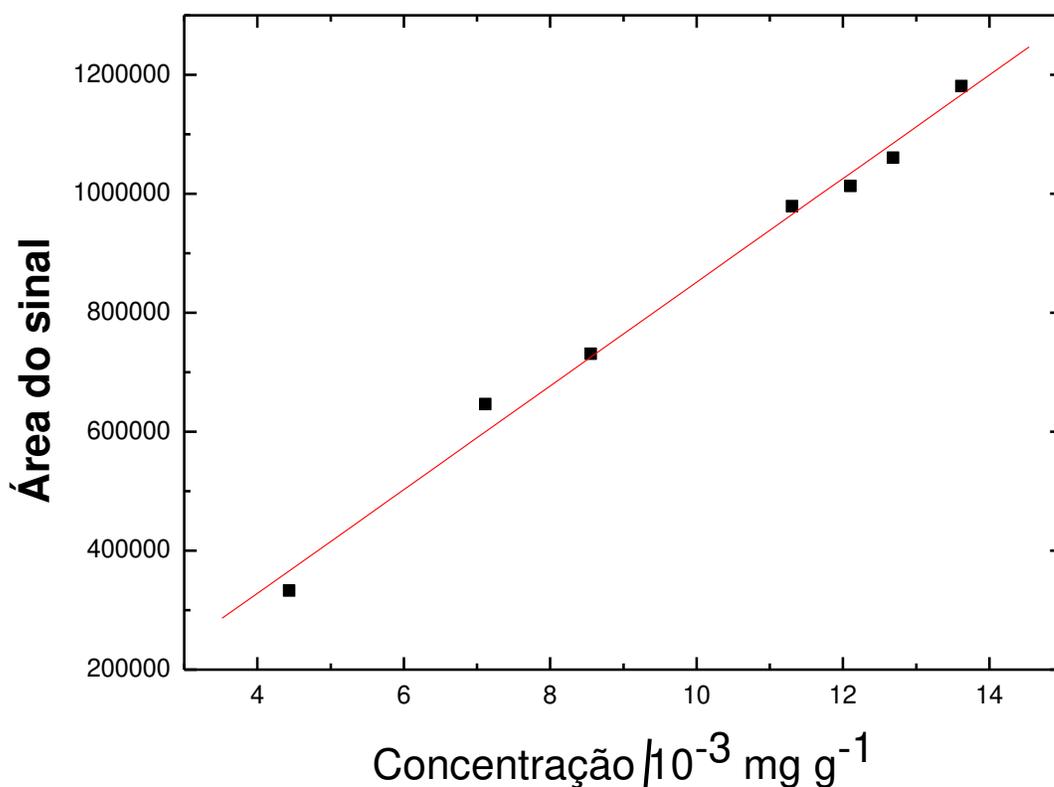


Figura 20. Curva analítica da nitrofurazona para o método HPLC.

4.1.4. Discussão

Observou-se que o método de transmissão é o mais preciso que os dois métodos de refletância e o de HPLC. Estes dois últimos apresentam precisão semelhante entre si.

É interessante observar que o refletômetro portátil gerou resultados analíticos quase tão bons como os obtidos com o método de HPLC. Considerando a simplicidade operacional, o pouco tempo necessário para realização da análise e o fato de não utilizar grandes quantidades de solventes orgânicos, o método refletométrico, pode ser considerado vantajoso em relação ao procedimento por HPLC.

Na tabela 4 encontram-se resultados obtidos para a concentração de nitrofurazona nas amostras investigadas, pelos três métodos utilizados neste trabalho.

Na tabela 5 pode ser vista a comparação estatística realizada envolvendo o teste pareado de *t* de Student e o teste F^{48} . Segundo o indicado pelo teste *t* pareado de Student, observa-se total concordância entre os resultados fornecidos pelos três métodos, num nível de confiança de 95%. No que se refere ao teste **F**, observa-se pequenas diferenças, particularmente na comparação entre o método HPLC e o de transmitância e o refletância II com transmitância. No nível de confiança de 99 %, porém, há total concordância.

As pequenas diferenças observadas no que se refere ao teste **F**, no nível de confiança de 95%, podem ser atribuídas ao baixo desvio padrão verificado para o método de transmitância em comparação com os de HPLC e de refletância II.

Na figura 21 são apresentados os espectros de absorvância obtidos por transmissão e por refletância. Pode-se notar que a absorvância dos dois métodos é muito diferente, além de haver um deslocamento de 10 nm do pico de absorção máxima de 375 nm (transmitância) para 385 nm (refletância).

A partir do espectro de transmissão, para uma solução aquosa, à 375 nm, a absorvância pode ser estimada em cerca de $8,4 \times 10^3 \text{ g mg}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. Analogamente, para o processo de refletância em solução de polietilenoglicol, obtêm-se uma absorvância para a nitrofurazona, à 385 nm, de $1,5 \times 10^4 \text{ g mg}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

Tabela 4. Determinação de nitrofurazona em preparações farmacêuticas, por refletância difusa, por transmissão em solução aquosa e por HPLC em triplicata..

| Amostra | Refletância I ^a | | | Refletância II ^b | | | Transmitância | | | HPLC | | | | |
|---------------------|------------------------------|--------------|----------|------------------------------|--------------|----------|------------------------------|--------------|----------|------------------------------|--------------|----------|--|-----|
| | Conc. ^c (mg/g) | DP (mg/g) | DPR % | | |
| A712 ^d | 2,16 | ±0,10 | 4,6 | 2,16 | ±0,17 | 7,9 | 2,16 | ±0,03 | 1,4 | 2,21 | ±0,10 | 4,5 | | |
| A720 ^d | 2,12 | ±0,08 | 3,8 | 2,15 | ±0,08 | 3,7 | 2,15 | ±0,02 | 0,9 | 2,16 | ±0,09 | 4,2 | | |
| A726 ^d | 2,14 | ±0,08 | 3,7 | 2,17 | ±0,07 | 3,2 | 2,18 | ±0,02 | 0,9 | 2,05 | ±0,09 | 4,4 | | |
| A728 ^d | 2,20 | ±0,08 | 3,6 | 2,18 | ±0,13 | 6,0 | 2,21 | ±0,02 | 0,9 | 2,16 | ±0,10 | 4,6 | | |
| B78932 ^e | 2,02 | ±0,08 | 4,0 | 2,15 | ±0,11 | 5,1 | 2,15 | ±0,02 | 0,9 | 2,05 | ±0,09 | 4,4 | | |
| Média DPR % | | | 3,9 | | | | 5,2 | | | | 1,0 | | | 4,4 |

^a Refletância difusa – Shimadzu UV-2450 com acessório para refletância difusa ^b Refletância difusa – Equipamento construído no laboratório.³⁹ ^c Concentração nominal = 2,0 mg/g. ^d Furacin, Mantecorp Indústria Química e Farmacêutica Ltda.. ^e Sensiderme, Laboratório Neo Química Comércio e Indústria Ltda.

Tabela 5. Determinação de nitrofurazona em pomadas comerciais: Comparação entre os valores de concentração e suas precisões, obtidos por métodos de refletância difusa, transmissão e de HPLC usando o teste-t de Student e do teste-F. Valor t tabulado para o grau de liberdade (ν) 4 é 2,78 ($\alpha=0,05$) e 4,60 ($\alpha=0,01$); $\nu= n_1 + n_2 - 2$ e $n_1 = n_2 = 3$ nesse caso. Para o F tabulado o valor é 19,0 ($\alpha=0,05$) e 99,0 ($\alpha=0,01$)⁴⁹.

| Amostra | Reflec I ^a / Reflec II ^b | | Reflec I ^a / Trans | | Reflec II ^b / Trans | | Reflec I ^a / HPLC | | Reflec II ^b / HPLC | | Trans / HPLC | |
|---------------------|--|-------------------------|-------------------------------|-------------------------|--------------------------------|-------------------------|------------------------------|-------------------------|-------------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|
| | <i>t_{calc}</i> | <i>F_{calc}</i> | <i>t_{calc}</i> | <i>F_{calc}</i> | <i>t_{calc}</i> | <i>F_{calc}</i> | <i>t_{calc}</i> | <i>F_{calc}</i> | <i>t_{calc}</i> | <i>F_{calc}</i> | <i>t_{calc}</i> | <i>F_{calc}</i> |
| A712 ^c | 0,00 | 2,89 | 0,00 | 11,1 | 0,00 | 32,1 | 0,83 | 1,00 | 0,44 | 2,89 | 0,85 | 1,00 |
| A720 ^c | 0,05 | 1,00 | 0,54 | 16,0 | 0,00 | 16,0 | 0,58 | 1,27 | 0,14 | 1,26 | 0,17 | 11,1 |
| A726 ^c | 0,05 | 1,31 | 0,71 | 16,0 | 0,24 | 12,3 | 1,30 | 1,27 | 1,82 | 1,65 | 2,48 | 20,3 |
| A728 ^c | 0,23 | 2,64 | 0,17 | 16,0 | 0,40 | 42,3 | 0,54 | 1,56 | 0,21 | 1,69 | 0,86 | 25,0 |
| B78932 ^d | 1,48 | 1,89 | 2,32 | 16,0 | 0,00 | 30,2 | 0,43 | 1,27 | 1,22 | 1,49 | 1,63 | 20,3 |

^a Refletância difusa – Shimadzu UV-2450 com acessório para refletância difusa ^b Refletância difusa – Equipamento construído no laboratório.³⁹ ^c Furacin, Mantecorp Indústria Química e Farmacêutica Ltda. ^d Sensiderme, Laboratório Neo Química Comércio e Indústria Ltda.

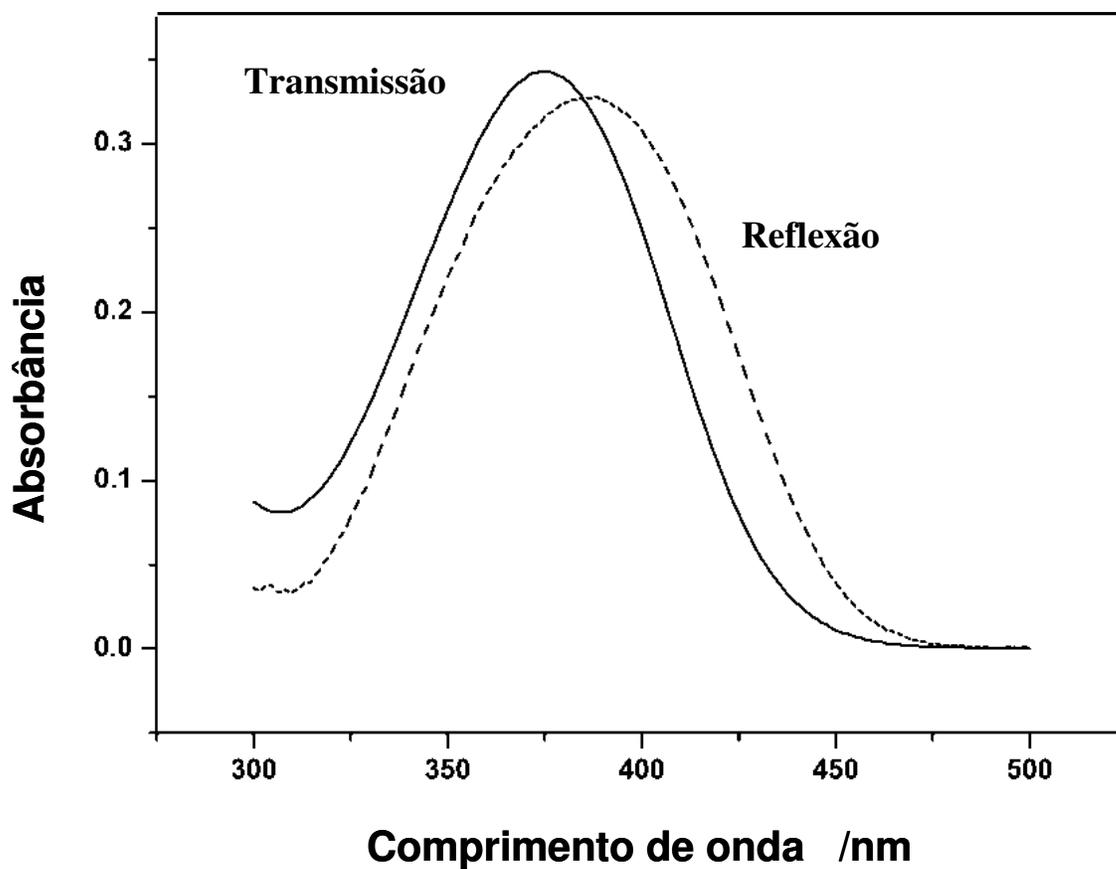


Figura 21. Espectros de absorção em medidas de transmissão (solução aquosa $8,28 \times 10^{-3} \text{ mg g}^{-1}$) e em processo de refletância (solução em polietilenoglicol, $3,00 \text{ mg g}^{-1}$) da nitrofurazona de 300 a 500 nm, obtidas no espectrofotômetro UV-visível Shimadzu com acessório de refletância.

4.2. NITROFURANTOÍNA

4.2.1. Características da amostra do fármaco e o processo de refletância difusa

A nitrofurantoína é um sólido amarelo, porém a apresentação na forma macro-encapsulada do preparo comercial lhe confere coloração mais escura, como pode ser observado na figura 18.



Figura 22. Diferença dos aspectos e da coloração da mistura preparada a partir do analito puro (esquerda) com concentração de $272,6 \text{ mg g}^{-1}$ e do fármaco comercial (direita) com concentração aparente de nitrofurantoína da ordem de $274 \pm 1 \text{ mg g}^{-1}$.

Esta diferença de coloração impede a determinação analítica direta, por refletância difusa das amostras em seu estado natural (sólidas), o que seria mais simples, uma vez que o material usado no encapsulamento interfere de modo significativo. Na figura 23 são mostrados os espectros de absorbância em processo

refletância difusa (medidos como absorbância) de duas misturas contendo nitrofurantoína em concentrações muito próximas (as mesmas da figura 22).

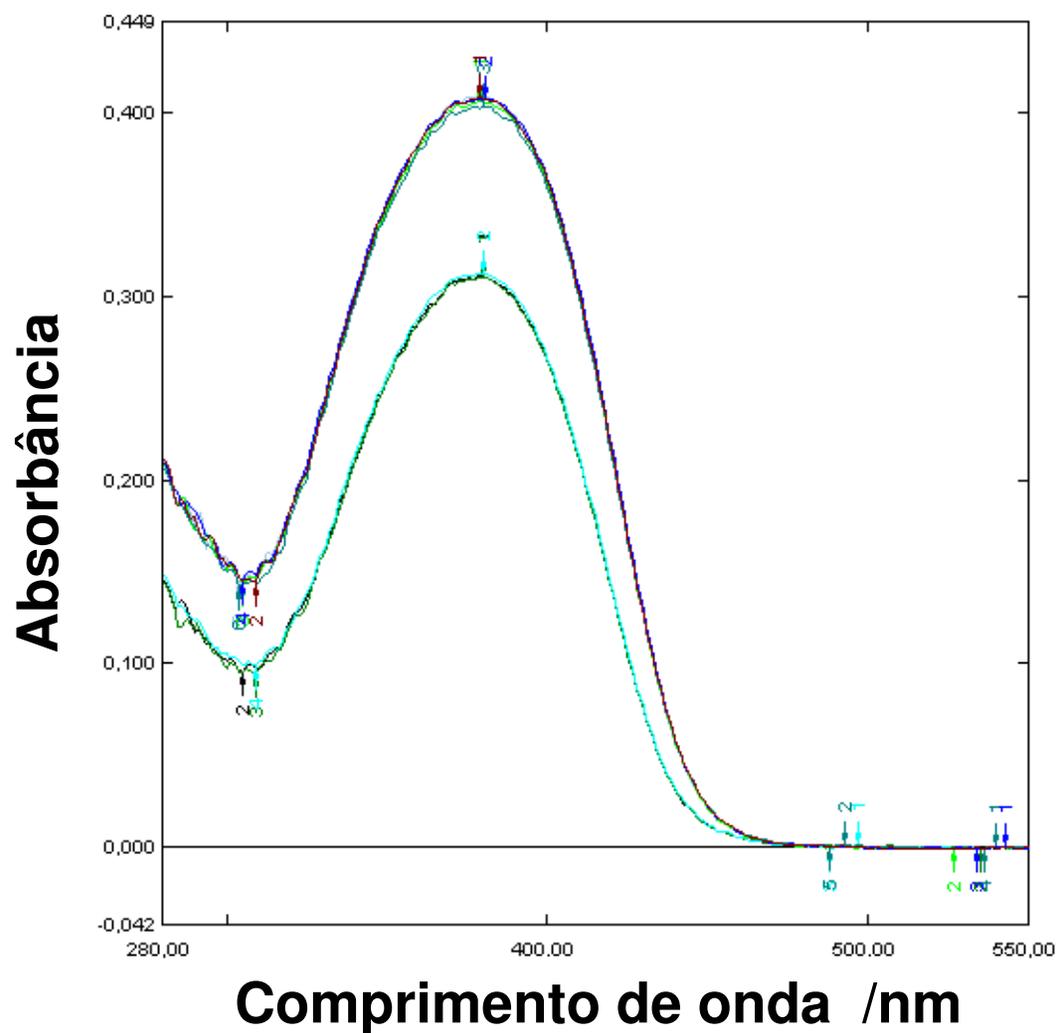


Figura 23. Espectros de absorbância em refletância difusa, para amostras de nitrofurantoína sólidas. Não há boa correspondência entre a concentração da amostra preparada de $272,6 \text{ mg g}^{-1}$, com absorbância ao redor de 0,3 e do fármaco com concentração de $274 \pm 1 \text{ mg g}^{-1}$ absorbância ao redor de 0,4. Espectrofotômetro Shimadzu UV-2450. O Branco formado pela mistura de adjuvantes da formulação.

Para a mistura de nitrofurantoína com 99 % de pureza (referência) foi obtida a concentração de $272,6 \text{ mg g}^{-1}$ com o uso de excipientes (amido, talco e lactose anidra) que apresentou absorvância ao redor de 0,3. A partir do medicamento comercial preparou-se uma concentração da ordem de 274 mg g^{-1} , obtendo-se absorvância ao redor de 0,4. Esta última solução deveria apresentar um valor de absorvância, ao redor de 0,3, isto é, próximo ao da mistura de referência. Ficou assim evidenciada a influência do material usado para o macro-encapsulamento aumentando os valores de absorvância.

Desde o início do trabalho pretendia-se desenvolver um método que permitisse a análise direta de preparações farmacêuticas com o mínimo de manipulação. De preferência, objetivava-se a análise do produto tal como se encontra na formulação, o que foi prejudicado pelo material utilizado no encapsulamento.

O papel manteiga associado à solução em polietilenoglicol, metodologia já empregada na análise de nitrofurazona por refletância difusa, pareceu ser a maneira ideal para superar a dificuldade. Ao suportar a amostra de nitrofurantoína dissolvida em polietilenoglicol no papel manteiga, seguida de limpeza com papel absorvente, verificou-se que os grãos escuros que comprometiam a análise direta foram removidos, possibilitando assim, a análise do princípio ativo, dissolvido no referido solvente.

A curva analítica, obtida para o processo de refletância difusa junto ao equipamento Shimadzu UV-2450, está representada na figura 24 e foi descrita pela equação $A = 0,02154 + 0,06994 C$; onde **A** é a absorvância medida no processo de refletância e **C** é a concentração do fármaco na preparação, sendo o coeficiente de correlação linear (*r*) igual a 0,998; os limites de determinação e quantificação foram, respectivamente: $LOD \cong 0,25 \text{ mg g}^{-1}$ e $LOQ \cong 0,75 \text{ mg g}^{-1}$.

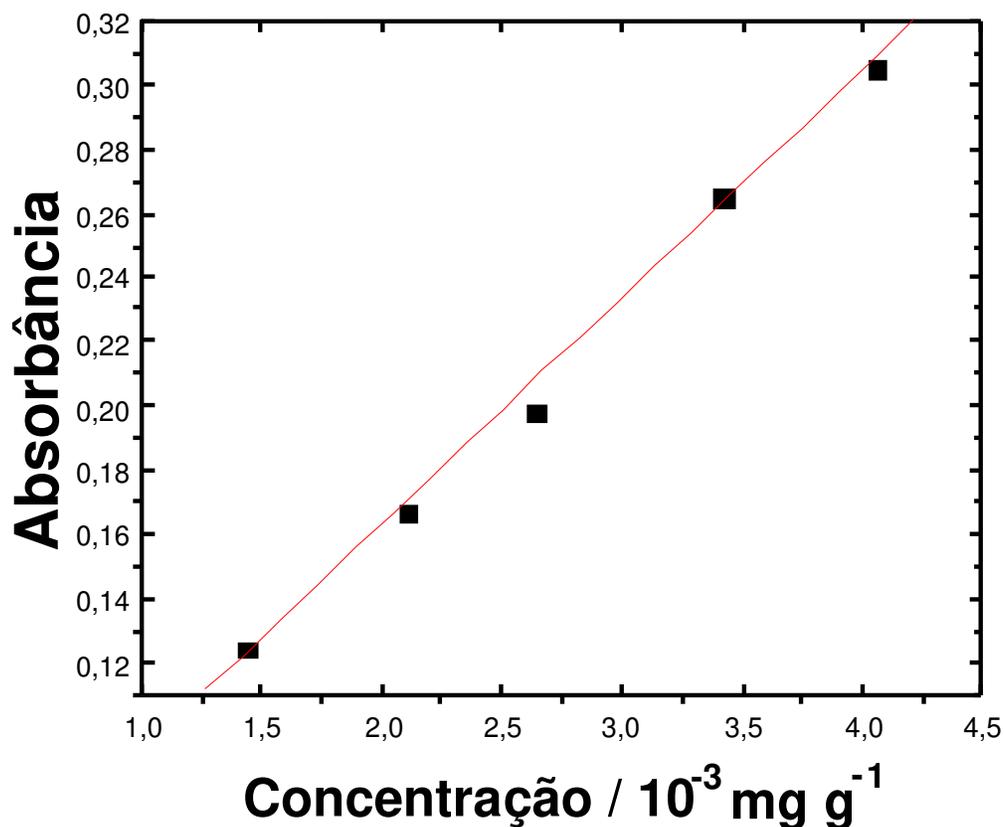


Figura 24. Curva analítica obtida no processo de refletância difusa para a nitrofurantoína, no equipamento Shimadzu 2450.

Com o refletômetro portátil construído no laboratório^{27,29,30} foi obtida a curva analítica com a seguinte equação $\rho = 67,080 + 47,724 \times C$ ($r = 0,997$), onde ρ é a resistência em ohms obtida no LDR, a partir da luz emitida pelo LED e C é a concentração de nitrofurantoína em mg g^{-1} , a figura 25, respeitando-se as diluições realizadas no processo de produção dos padrões para as pomadas; os limites encontrados para determinação e quantificação, respectivamente foram de $\text{LOD} \cong 0,6 \text{ mg g}^{-1}$ e $\text{LOQ} \cong 1,8 \text{ mg g}^{-1}$.

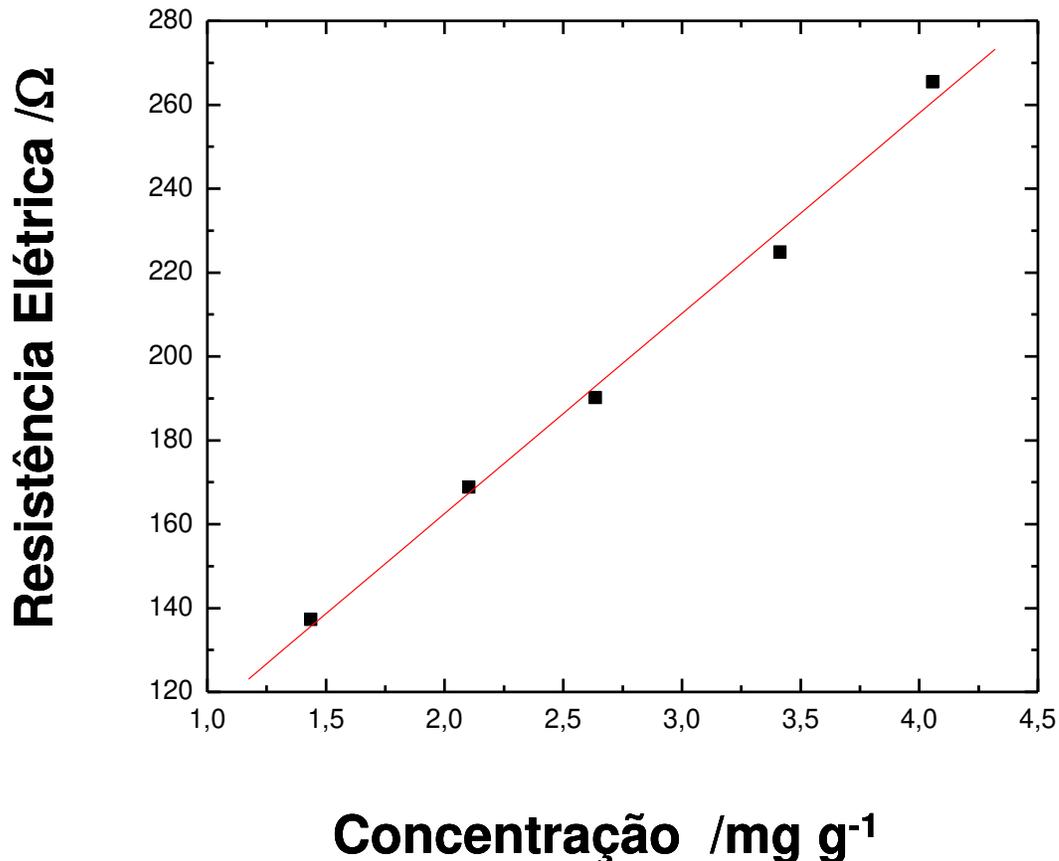


Figura 25. Curva analítica do sinal de resistência elétrica em função da concentração da solução de nitrofurantoína para o equipamento de refletância portátil.

Para a realização das análises em refletância difusa, tanto no espectrofotômetro Shimadzu UV-2450, quanto no refletômetro portátil, há necessidade de pesagem apenas no preparo das soluções. Na aplicação e análise do padrão não existe obrigatoriedade de pesagem da alíquota a ser aplicada sobre o papel, uma vez que a espessura do papel e a área de reflexão são delimitadores da quantidade de luz espalhada, observando-se uma área de espalhamento maior que de leitura. Note-se que janela da cela de refletância, no espectrofotômetro, onde é fixado o papel, tem área fixa e mesmo no refletômetro portátil esta delimitação ocorre.

4.2.2. Transmissão

Para a análise por transmissão, as soluções foram preparadas em consecutivas diluições, primeiramente em polietilenoglicol, posteriormente em água. Foi observado que entre as concentrações $1,7 \times 10^{-3} \text{ mg g}^{-1}$ e $1,0 \times 10^{-2} \text{ mg g}^{-1}$ há uma relação linear com a absorbância da solução em 368 nm.

As soluções recém preparadas foram colocadas em celas de quartzo de 1,00 cm de caminho óptico sendo, por fim, realizada a leitura da absorbância.

A curva analítica que se encontra na figura 26, é descrita pela equação $A = -0,01228 + 0,07332 C$; $r = 0,998$; onde **A** é a absorbância e **C** a concentração de nitrofurantoína na solução medida em mg g^{-1} ; $\text{LOD} \cong 0,37 \times 10^{-3} \text{ mg g}^{-1}$ e $\text{LOQ} \cong 1,1 \times 10^{-3} \text{ mg g}^{-1}$.

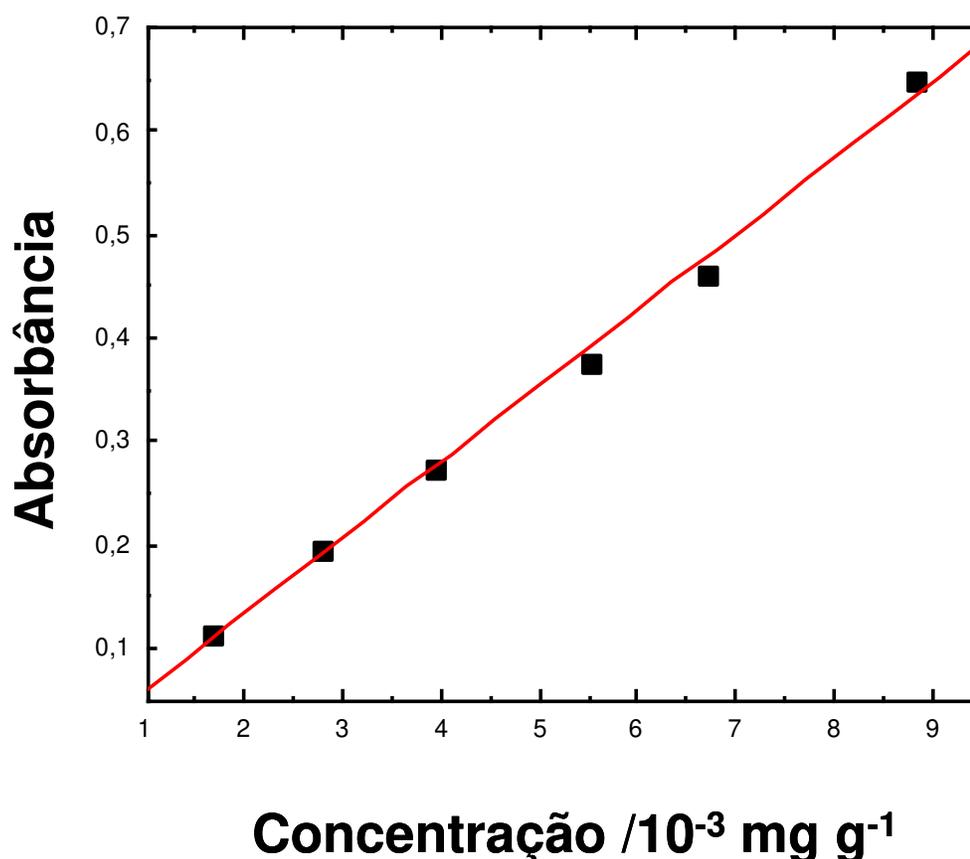


Figura 26. Curva analítica da nitrofurantoína obtida para o método de transmissão.

Utilizando a curva analítica descrita pela equação anteriormente, determinou-se o conteúdo, em nitrofurantoína, de amostras das cápsulas de Macrofantina®. Foram preparadas soluções de modo que os valores esperados de absorbâncias se ajustassem à curva analítica, conforme a tabela 3.

4.2.3. HPLC

Para o método HPLC calculou-se a quantidade de nitrofurantoína presente na porção de pó da alíquota de amostra analisada pela relação seguinte: $W (R_u/R_s)$, onde W é a massa, em mg, de nitrofurantoína na preparação padrão, e R_u e R_s são as relações entre as áreas dos picos da nitrofurantoína ao padrão interno obtido a partir da corrida das amostras e do padrão, respectivamente.

Na tabela 6 se encontram os valores obtidos como resultados para a concentração de nitrofurantoína nas amostras investigadas, pelos três métodos discutidos neste trabalho.

Considerando as concentrações das soluções utilizadas, em mg/L, para as determinações por HPLC obtêm-se os seguintes limites de detecção e de quantificação (determinação): $LOD = 12 \text{ mg L}^{-1}$; $LOQ = 36 \text{ mg L}^{-1}$ de solução.

Tabela 6. Determinação de nitrofurantoína em cápsulas de preparação farmacêutica, por refletância difusa, por transmissão em solução aquosa e por HPLC, feitas em triplicata.

| Amostra ^c | Refletância I ^a | | | Refletância II ^b | | | Transmitância | | | HPLC | | | | |
|----------------------|----------------------------|------------|----------|-----------------------------|------------|----------|----------------------------|------------|----------|----------------------------|------------|----------|--|-----|
| | Massa ^d (mg) | DP (mg) | DPR % | massa ^c (mg) | DP (mg) | DPR % | massa ^c (mg) | DP (mg) | DPR % | massa ^c (mg) | DP (mg) | DPR % | | |
| L814 | 99 | ±4 | 4 | 102 | ±10 | 10 | 104 | ±3 | 3 | 102 | ±2 | 2 | | |
| L824 | 100 | ±4 | 4 | 97 | ±9 | 9 | 108 | ±2 | 2 | 104 | ±1 | 1 | | |
| L828 | 101 | ±2 | 2 | 100 | ±7 | 7 | 107 | ±2 | 2 | 103 | ±2 | 2 | | |
| L830 | 103 | ±3 | 3 | 104 | ±8 | 8 | 105 | ±2 | 2 | 102 | ±2 | 2 | | |
| L832 | 98 | ±4 | 4 | 101 | ±6 | 6 | 104 | ±2 | 2 | 100 | ±2 | 2 | | |
| Média DPR % | | | 3,4 | | | | 8,0 | | | | 2,2 | | | 1,8 |

^a Refletância difusa – Shimadzu UV-2450 com acessório para refletância difusa ^b Refletância difusa – Equipamento construído no laboratório.³⁹ ^c Macroantina, Mantecorp Indústria Química e Farmacêutica Ltda. ^d massa nominal = 100 mg por cápsula e média de três determinações.

Tabela 7. Determinação de nitrofurantoína em cápsulas: Comparação entre os valores obtidos por métodos de refletância difusa, transmissão e de HPLC usando teste-t de Student e do teste-F. Valor t tabulado para o grau de liberdade (ν) 4 é 2,78 ($\alpha= 0,05$) e 4,60 ($\alpha= 0,01$) $\nu= n_1 + n_2 - 2$ e $n_1 = n_2 = 3$ nesse caso. Para o F tabulado o valor é 19,0 ($\alpha=0,05$) 99,0 ($\alpha=0,01$)⁴⁸.

| Amostra | Reflet I ^a / Reflet II ^b | | Reflet I ^a / Trans | | Reflet II ^b / Trans | | Reflet I ^a / HPLC | | Reflet II ^b / HPLC | | Trans / HPLC | |
|-------------|--|------------|-------------------------------|------------|--------------------------------|------------|------------------------------|------------|-------------------------------|------------|--------------|------------|
| | t_{calc} | F_{calc} | t_{calc} | F_{calc} | t_{calc} | F_{calc} | t_{calc} | F_{calc} | t_{calc} | F_{calc} | t_{calc} | F_{calc} |
| L814 | 0,39 | 6,3 | 1,41 | 1,8 | 0,27 | 11,1 | 1,22 | 4,0 | 0,00 | 25,0 | 0,78 | 2,3 |
| L824 | 0,43 | 5,1 | 2,52 | 4,0 | 1,69 | 20,3 | 1,37 | 16,0 | 1,09 | 81,0 | 2,53 | 4,0 |
| L828 | 0,19 | 12,3 | 2,00 | 1,0 | 1,36 | 12,3 | 1,00 | 1,0 | 0,58 | 12,3 | 2,53 | 1,0 |
| L830 | 0,17 | 7,1 | 0,78 | 2,3 | 0,17 | 16,0 | 0,39 | 2,3 | 0,34 | 16,0 | 1,50 | 1,0 |
| L832 | 0,59 | 2,3 | 1,90 | 4,0 | 0,67 | 9,0 | 0,63 | 4,0 | 0,22 | 9,0 | 2,53 | 1,0 |

^a Refletância difusa – Shimadzu UV-2450 com acessório para refletância difusa. ^b Refletância difusa – Equipamento construído no laboratório.³⁹ ^c Macroantina, Mantecorp Indústria Química e Farmacêutica Ltda .

Para comparação dos três métodos analisados, refletométrico, transmissão e HPLC, realizaram-se testes estatísticos, como o teste- t e o teste F ^{47,48} cujos resultados encontram-se na tabela 7.

Pode-se observar, na tabela 7, que os dados referentes ao teste t são todos concordantes ao nível de confiança de 95 %, o que indica que todos os métodos usados forneceram resultados analíticos equivalentes.

No que se refere ao teste F , observa-se total concordância ao nível de confiança de 99 %. Em nível de 95 % verifica-se que os valores de F calculados são superiores ao tabelado na comparação entre o método de refletância difusa (Reflet II) que usa o equipamento portátil e o HPLC. Esta discordância ocorre em virtude da maior imprecisão do equipamento manual. Também no caso da comparação do procedimento de refletância II com o de transmitância há uma discordância para a amostra L824, ao nível de confiança de 95 %.

Apesar de em nível de 95% de confiança terem sido observadas diferenças entre a precisão do método de refletância com o aparelho manual e os outros, pode-se admitir que para fins de triagem este pequeno instrumento pode perfeitamente ser usado uma vez que sua exatidão é adequada.

5. CONCLUSÕES

5.1. Nitrofurazona

O estudo realizado neste trabalho demonstra que os três métodos desenvolvidos neste trabalho podem ser utilizados para a determinação de nitrofurazona em pomadas, já que apresentam precisão e exatidão suficientes para tal.

O método de transmissão é mais preciso que os demais estudados no presente trabalho, incluindo o HPLC. O método de refletância com o uso do espectrofotômetro Shimadzu 2450 com acessório de refletância (método I) apresenta determinação e precisão semelhante à do HPLC, sendo, porém, muito mais simples além de não exigir o uso de solventes orgânicos não amigáveis.

O método de transmissão descrito neste trabalho utiliza polietilenoglicol para dissolver nitrofurazona e em seguida a água, dispensando a utilização dos solventes orgânicos usados no HPLC.

O método de reflexão tem uma vantagem adicional sobre a transmissão porque a pesagem de alíquota das amostras é desnecessária. Sem dúvida, o procedimento HPLC é o mais lento e difícil entre os três e os de refletância os mais simples.

Com base nos resultados obtidos os métodos de refletância difusa e de transmissão desenvolvidos neste trabalho podem ser considerados como adequados para a determinação de nitrofurazona em preparações farmacêuticas, principalmente, por apresentarem simplicidade operacional, rapidez, exatidão e precisão suficientes, além de não fazerem uso de solventes orgânicos caros e tóxicos.

5.2. Nitrofurantoína

Os resultados obtidos neste trabalho indicam que os métodos sugeridos podem ser aplicados para a determinação de nitrofurantoína em preparações macro-encapsuladas.

Os métodos propostos apresentaram precisão menor do que o HPLC, porém, pelo teste F pode-se observar que há equivalência entre as precisões dos métodos de transmitância, de refletância I e de HPLC ao nível de confiança de 95 %. Para o método de refletância que usa o instrumento portátil a igualdade de precisão somente é observada ao nível de confiança de 99%.

O método de refletância oferece vantagens sobre a técnica de transmitância em função da rapidez, simplicidade operacional e no preparo das amostras. Esses dois métodos são vantajosos em relação ao HPLC, pelos mesmos motivos, incluindo-se, ainda, o fato de não usarem solventes orgânicos.

Para o procedimento de espectrofotometria por transmitância, apesar de o método exigir algumas operações a mais em relação ao método analítico por refletância difusa, os limites de detecção e de quantificação foram mais baixos, o que também torna o método atraente.

5.3. Consideração

Em função dos resultados obtidos neste trabalho, fica reforçada a idéia de que, em alguns casos, procedimentos simples, rápidos e baratos podem substituir métodos mais dispendiosos e de procedimento mais trabalhoso como, por exemplo, o HPLC. Abre-se aí um campo que pode propiciar as análises de preparações farmacêuticas de fármacos puros, por parte de laboratórios de controle e/ou de fiscalização, de modo mais simples, rápido e barato. Evidentemente este conceito pode ser estendido a qualquer matriz e analito e mesmo com o intuito de aplicá-lo ao ensino.

5.4. Perspectivas

O trabalho desenvolvido na presente dissertação evidencia que é possível desenvolver pesquisa de bom nível mesmo com poucos recursos laboratoriais e financeiros, obtendo resultados de qualidade.

Isto nos mostra a possibilidade de, futuramente, realizar um trabalho nessa mesma direção, inclusive com a inclusão de estudantes de escolas de ensino médio e de faculdades da rede privada com o intuito de incentivá-los para os campos da pesquisa e da fiscalização, mostrando-lhes como, com recursos mais limitados, pode-se fazer bom trabalho em ambas as áreas.

6. REFERÊNCIAS

1. **Oliveira, N. B.**; *Inovação e produção da Química Fina*; Química Nova V28, **2005**.
2. **Comasseto, J. V.**; at ali.: *Química Fina sua Origem e Importância* – Revista USP, São Paulo, n.76, p 68-77, **2008**.
3. **Tavares, W.**; *Manual de Antibióticos e Quimioterápicos Antiinfeciosos*, Atheneu: São Paulo, **2001**.
4. **Hardman, J. G.**; Limbird, L.E; *Goodman e Gilman: As Bases Farmacológicas da Terapêutica*, 10^o ed, Guanabara Koogan: Rio de Janeiro, **2003**.
5. *The Merck Index: An Encyclopedia of Chemicals, Drugs and Biologicals*, 14th ed., Merck & Co: Whitehouse Station NJ, **2006**.
6. **El Egakey, M.A.**; *In Vitro e Vivo Lançamento Estudos de Nitrofurantoína revestido de cristais*, vol Acta Pharmaceutica Technologica. 28, No. 4, **1982**
7. **Kleemann, A.**; Engel, J.; Kutscher, B.; *Pharmaceutical Substances: Syntheses, Patents, Applications*, 4th ed., Thieme, Stuttgart, **2001**.
8. **Pires, J. R.** at al.; *Investigation of 5-Nitrofurán Derivatives: Synthesis, Antibacterial Activity, and Quantitative Structure–Activity Relationships. J. Med. Chem.*, 44 (22), pp 3673–3681, **2001**.
9. **Barreiro, E. J.**; *Química Medicinal: as bases moleculares da ação dos fármacos*. Porto Alegre: ArtMed Editora Ltda, **2001**.
10. **Melo, N.F.S.**; Grillo, R; Moraes, C.M; Brito, C.L.; Trossini, G.H.G.; Menezes, C.M.S.; Ferreira, E.I.; Rosa, A.H.; Fraceto, L.F.; *Preparação e caracterização inicial de complexo de inclusão entre nitrofurazona e 2-hidroxi-propil-ciclodextrina*; Revista Ciências Farmacêutica Básica Aplicada, v. 28, n.1, p.35-44, **2007**.
11. **Hassan, M. T. H.**; Fathali, Z. A. A.; *A Modified Method for the Synthesis of Nitrofurazone*. Eu Iranian Journal of Pharmaceutical Research p.67-69, **2003**.
12. **Newton, G.**; Osborne, M. G.; *Macrodantin* - Journal of Gynecologic Surgery. Vol. 20, No. 4: 135-138, **2004**.
13. **Gennaro, A. R.**; *Remington Pharmaceutical Science* 17th.ed Mack Publishing Co. Pennsylvania, U.S.A, **1985**.

14. **Florey, K.**; *Analytical profiles of drug substances*. Academic Press, Inc – New York, **1976**.
15. The *United States Pharmacopeia. The National Formulary*. 28th ed., Unites States Pharmacopeial Convention, Rockville, **2005**.
16. **Faulkner, D.M.**; Sutton, S.T.; Hesford, J.D.; Faulkner B.C.; Major, D.A.; Hellewell, T.B.; Laughon, M.M.; Rodeheaver, G.T.; Edlich, R.F.; *Am. J. Emerg. Med.*, 15, 20, **1997**.
17. **Agrawal, Y. K.**; Patel, D.R; *Anal Lett.*,19,1289, **1986**.
18. **Sastry, B.S.**; Rao, J.V.; Rao,T.T.; Sastry, C.S.P.; *Mikrochim. Acta*, 108, 185, **1992**.
19. **Walash, M.I.**; El-Brashy, A.M.; Sultan, M.A.; *Anal. Lett.* 26, 499, **1993**.
20. **Shajahan,M.**; Enever, R.P.; *Int. J. Pharm.*, 82, 215, **1992**.
21. **Shajahan, M.**; Shalaby, A.; *Int. J. Pharm.*, 168, 169, **1998**.
22. **Lunn,G.**; *Methods for Pharmaceutical Analysis*, v.3, John Wiley & Sons Inc.: New York, **2000**.
23. **Melo, N.F.S.**; Grillo,R.; Rosa, A.H.; Fraceto, L.F.; *J. Pharm. Biom. Anal.* 47, 865, **2008**.
24. **Mishra, A.K.**; Gode, K.D.; *Analyst* 110, 1373, **1985**.
25. **Morales, A.**; Richter,P.; Toral, M.I.; *Analyst*, 112, 971, **1987**.
26. **Reday, C.S.**; Reddy, S.J.; *Electroanalysis*, 4, 595, **1992**.
27. **Khodari,M.**; Mansour, H.; Mersal, G.A.M.; *J. Pharm. Biom. Anal.*, 20, 579, **1999**.
28. **Lima Neto, P.** at al.: *Square wave voltammetric determination of nitrofurantoin in pharmaceutical formulations on highly boron-doped diamond electrodes at different boron-doping contents*. *Talanta*, 80 (5) 1730-6, **2010**.
29. **Ghoneim, M.** at al; *Determinação do fármaco nitrofurantoína em formulações farmacêuticas and biological fluids by square-wave cathodic adsorptive stripping voltammetry* E. Hammam *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 30, 651 (2002) *Anal.*, 30, 651, **2002**.
30. **Du, J.** ; Hao,L.; Li, Y. ; Lu,J.; *Anal. Chim. Acta*, 582, 98, **2007**.
31. **Belal, T. S.**; *J. Fluoresc.*, 18, 771, **2008**.

32. **Muth, P. at al.;** *Sensitive determination of nitrofurantoin in human plasma and urine by high-performance liquid chromatography* - Journal of Chromatography Volume 729, Pages 251-258, **1996**.
33. **Tubino, M.;** Queiroz, C. A. R; *Anal. Chim. Acta*, 600,199, **2007**.
34. **Tubino, M.;** Rossi, A. V.; Magalhães, M.E.A.; *Anal. Lett.*, 30, 271, **1997**.
35. **Lima, L.S.;** Weinert, P.L.; Lemos, S.C.; Sequinel, R.; Pezza, H.R.; Pezza,L.; *Spectrochim. Acta Mol. Biomol. Spectrosc.* 71, 1999, **2009**.
36. **Weinert, P.L.;** Pezza,L.; Pezza, H.R.; *J. Braz. Chem. Soc.*, 18, 846, **2007**.
37. **Ribeiro, P.R.S.;** Pezza,L.; Pezza, H.R.; *J.Braz. Chem. Soc.*, 17, 674, **2006**.
38. **Gotardo, M.A.;** Gigante, A.C.; Pezza, L.; Pezza, H.R. *Talanta*, 64, 361, **2004**.
39. **Matias, F.A.A.;** Vila, M.M.D.C.; Tubino, M.; *Sens. Actuators B Chem.*, 88, 60, **2003**.
40. **Skoog, D. A.,** Holler, F. J., Nieman, T. A., *Princípios de Análise Instrumental*, 5^o ed., Porto Alegre: Bookman, **2002**.
41. **Alves, L. P. at al.;** *Identificação e Caracterização de Artefatos Experimentais no Uso de Esfera Integradora para Medidas de Refletância*. Anais do VIII Encontro Latino Americano de Iniciação Científica – UNIVAP São José dos Campos, **2004**.
42. **Soares, A. R.;** *Extração em fase sólida de níquel em amostras aquosas e determinação por espectroscopia de refletância difusa*. Dissertação de Mestrado – Univ de Viçosa – MG, **2008**.
43. **Bain, G. at ali.:** *Integrating Sphere Diffuse Reflectance Technology for use with UV-Visible Spectrophotometry* - Thermo Fisher Scientific, Madison, WI, USA, **2007**.
44. **Salyer, D. A.;** at ali.: *In Vitro Multispectral Diffuse Reflectance Measurements of the Porcine Fundus vduougodghwh* Investigative Ophthalmology & Visual Science, Vol. 46, No. 6, **2005**.
45. **F.A.A Matias,** Vila, M.M.D.C.; Tubino, M. *J. Braz. Chem. Soc.*, 15, 327, **2004**.
46. **Tubino, M.;** Souza, R. L.; *Talanta*, 68, 776, **2006**.
47. **Shahjahan, M.;** at ali.: Photolability of nitrofurazone in aqueous solution. *International Journal of Pharmaceutics* V1, p 75-82, **1996**.
48. **Eckshlager, K.;** *Errors, Measurement and Results in Chemical Analysis*, Van Nostrand Reinhold Company: London, **1972**.

49. **Miller, J. C.**; Miller, J. N.; *Statistics for Analytical Chemistry*, 3^o ed., Ellis Horwood: London, **1993**.