

Determinação da permeação transcutânea do pró-fármaco hidroximetilnitrofural (NFOH)

Determination of transcutaneous permeation of hydroxymethylnitrofural (NFOH) pro-drug

Mayna Brito Fukushima^{1,2}, Bruna Galdorfini Chiari^{1,3}, Priscila Longhin Bosquesi^{2,4}, Chung Man Chin^{2,4*}, Vera Lucia Borges Isaac¹.

¹LaCos- Laboratório de Cosmetologia, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho”, UNESP, Araraquara, SP. ²Lapdesf- Laboratório de Pesquisa e Desenvolvimento de Fármacos, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho”, UNESP, Araraquara, SP. ³Universidade de Araraquara – UNIARA, SP. ⁴Centro de Pesquisa Avançada em Medicina da UNILAGO (CEPAM), Faculdade de Medicina – UNILAGO, São José do Rio Preto, SP

[*Autor correspondente: chung.man-chin@unesp.br]

Data de submissão: 04 de abril de 2022

Data de aceite: 22 de abril de 2022

Data de publicação: 17 de maio de 2022

RESUMO

Métodos de modificação molecular, especialmente a latenciação, têm se apresentado promissores na obtenção de fármacos mais eficientes no que diz respeito à farmacocinética. O desenvolvimento de pró-fármacos permite aumentar a atividade do fármaco administrado topicamente, uma vez que a modificação das interações fármaco-pele aumenta a taxa de penetração. Em pesquisa com novos derivados com potencial atividade antichagásica, para a obtenção de pró-fármacos recíprocos de nitrofural (NF) e primaquina, foi sintetizado um intermediário de reação, o hidroximetilnitrofural (NFOH). Este intermediário foi testado quanto à atividade antimicrobiana e antichagásica, apresentando efeito superior, para estas duas atividades, em relação à molécula matriz, destituído de efeito mutagênico. Desta forma, tendo em vista que o NFOH é mais eficaz que NF, comercialmente utilizada na forma de pomada para queimaduras, este trabalho visou estudar o comportamento do NFOH em formulações farmacêuticas quanto à sua capacidade de permeação transcutânea. Os resultados demonstraram que ambas as formulações (emulsões e pomadas) utilizadas foram eficazes na manutenção do princípio ativo na superfície da pele.

Palavras-chave: latenciação, hidroximetilnitrofural, permeação transcutânea, formulações.

ABSTRACT

Molecular modification methods, especially latenciation, have shown promise in obtaining more efficient drugs in terms of pharmacokinetics. The development of prodrugs allows increasing the activity of the drug administered topically, since the modification of drug-skin interactions increases the penetration rate. In research on new derivatives with potential antichagasic activity, to obtain reciprocal prodrugs of nitrofural (NF) and primaquine, a reaction intermediate, hydroxymethylnitrofural (NFOH) was synthesized. This intermediate was tested for antimicrobial and antichagasic activity, showing superior effect, for these two activities, in relation to the matrix molecule, devoid of mutagenic effect. Thus, considering that NFOH is more effective than NF, commercially used in the form of ointment for burns, this work aimed to study the behavior of NFOH in pharmaceutical formulations in terms of its capacity for transcutaneous permeation. The results showed that both formulations (emulsions and ointments) used were effective in maintaining the active ingredient on the surface of the skin.

Keywords: latenciation, hydroxymethylnitrofural, transcutaneous permeation, formulations.

INTRODUÇÃO

Infecções da pele podem ser causadas tanto por microrganismos patogênicos, os quais a simples presença está associada a mudanças patológicas ou podem ser causadas por microrganismos que coexistem pacificamente com seu hospedeiro, mas que podem provocar infecções quando o hospedeiro apresenta baixa resistência imunológica¹.

As infecções da pele estão bastante relacionadas com queimaduras, pois a lesão térmica causa dano celular direto, manifestado por necrose coagulativa. Após a queimadura, a barreira epitelial à penetração de microrganismos é perdida e, a umidade e a formação de escara avascular rica em proteína, fornecem excelente meio de cultura para os microrganismos^{2,3}. Além disso, a lesão térmica resulta em imunossupressão global, com prejuízo na função dos neutrófilos e elementos celulares e humorais do sistema imune, o que amplifica a susceptibilidade das queimaduras às infecções^{4,5}.

Logo após a lesão térmica, na microbiota das feridas, predomina microrganismos Gram-positivos que depois são substituídos pelos Gram-negativos por volta da segunda semana^{2,4,5}.

Agentes antimicrobianos tópicos tem demonstrado reduzir infecções relacionadas à queimaduras e a morbidade de feridas causadas pelas queimaduras quando utilizados adequadamente. O objetivo da terapia antimicrobiana tópica é o controle da colonização microbiana, prevenindo, portanto,

o desenvolvimento de infecções invasivas^{6,7}.

O nitrofurural é um quimioterápico pertencente ao grupo dos nitrofuranos⁸, apresentando amplo espectro de ação antimicrobiana tópica. Por apresentar boa absorção pelo epitélio, é muito utilizado em pacientes com queimaduras de segundo e terceiro grau, profilaxia de infecções cutâneas como em transplante de pele, em curativos e em infecções de feridas e úlceras de pele causadas por agentes sensíveis ao fármaco⁹. Não interfere no processo de cicatrização de feridas e apresenta também atividade antiprotozoária, mas não apresenta atividade antiviral e antifúngica^{10, 11}. Estudos demonstraram que a recuperação de pacientes com queimaduras de segundo grau, tanto em relação à cicatrização das feridas até a diminuição da dor, foi muito mais eficiente com a utilização do nitrofurural quando comparado a outros fármacos também destinados ao tratamento de queimaduras¹².

Comercialmente, o nitrofurural apresenta-se como o princípio ativo da pomada Furacin® a 0,2% em base de Ethylene glycol polymer (PEG-6), Ethylene glycol polymer (PEG-20), Ethylene glycol polymer (PEG-75) e é ativo, segundo o fabricante, contra grandes grupos de bactérias comumente encontradas na maioria das infecções da pele como o *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes*, *Proteus* spp, *Escherichia coli*, *Clostridium perfringens*, *Aerobacter aerogenes*^{13, 14}. Estudos piloto *in vitro* demonstraram que a nistatina combinada com Furacin® na razão de 1:1 é extremamente eficiente contra *Candida albicans* e *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas*

aeruginosa e *Escherichia coli*¹⁵.

O mecanismo de ação pelo qual age o nitrofurais, ainda não está bem esclarecido, mas acredita-se que seja por alteração no DNA bacteriano, sendo responsável por inibir um grande número de enzimas bacterianas, especialmente as envolvidas na degradação anaeróbia e aeróbia da glicose e no metabolismo do piruvato e carboidrato. Apesar do nitrofurais inibir uma variedade de enzimas, ele não é considerado um inativador enzimático^{9, 16}. Admite-se que o grupo nitro ligado ao furano em posição 5 seja essencial para essa atividade, sendo que o composto, assim como o nitroimidazol, necessita da redução de seu grupo nitro, formando um intermediário capaz de causar danos ao DNA levando a morte celular^{17, 18}. A redução do grupo nitro ocorre devido ao seu potencial redox relativamente alto (-250 a -270 mV) e essa redução é catalisada por enzimas nitrorredutases (como a xantina oxidase) presentes tanto em mamíferos como em microrganismos, metabolizando-o a um radical livre com atividade antimicrobiana^{19, 20}.

Gherzi-Egea *et al.* (1998), verificaram que o primeiro radical formado durante o metabolismo redutivo do nitrofurais é o ânion superóxido, com significativa produção secundária de radical hidroxila a partir do superóxido, realçando as consequências toxicológicas e deletérias. Apesar do radical livre formado ser tóxico, ele é bastante instável^{18, 19, 21}.

A resistência bacteriana contra nitrofurais é rara, o que representa uma vantagem. Entretanto, deve ser utilizado somente no local lesado e no tempo suficiente, pois pode causar

intolerância local, como também muitos efeitos adversos em elevada proporção de pacientes tratados. Pode-se observar prurido, hepatotoxicidade, dermatite esfoliante grave que forçam a suspensão do uso do fármaco e cerca de 2% dos pacientes podem tornar-se sensibilizados e desenvolver reações, como, por exemplo, pneumonite alérgica, além de apresentar efeitos mutagênicos e carcinogênicos. Experimentos mostraram que o radical aniônico formado por este fármaco é capaz de induzir ao câncer renal²². Em um ambiente aeróbio, o radical nitro aniônico rapidamente transfere um elétron ao oxigênio, sendo que este ativado é que pode ser o responsável pelos efeitos tóxicos. Em outros casos, incluindo condições anaeróbias, o radical aniônico exerce seus efeitos de outra forma, provavelmente interferindo com a transferência eletrônica normal. Este tipo de toxicidade aguda, normalmente está associada à mutagênese ou carcinogênese²³.

Há relatos em que o tratamento com nitrofurais causa supressão de espermatogênese em ratos e camundongos, além de causar alterações nos órgãos reprodutivos destes animais, entretanto, estes efeitos mostraram-se reversíveis após o término do tratamento com nitrofurais²³.

Prieto e colaboradores (2006), relataram casos de dermatite de contato em pacientes submetidos ao tratamento com a pomada Furacin®, e experimentos atribuíram essa dermatite tanto ao nitrofurais quanto ao polyethylene glycol contidos na pomada. Desta forma, agentes de uso tópico contendo nitrofurais ou polyethylene glycol em peles danificadas predispõem a alergenicidade de contato^{24,25}.

A modificação molecular, especialmente a latenciação, tem se mostrado bastante promissora na introdução de novos fármacos na terapêutica²⁶ principalmente para a obtenção de fármacos melhores no que diz respeito à farmacocinética. Este processo pode ser definido como a transformação de um fármaco em sua forma de transporte inativo, que *in vivo*, sofre biotransformação enzimática ou química e libera a porção ativa no local de ação ou próximo dele. Uma das formas latentes denomina-se pró-fármaco²⁷.

A latenciação permite, mediante escolha de transportadores adequados, via de regra desprovidos de atividade biológica, o melhoramento das propriedades do fármaco²⁸, permitindo, na grande maioria das vezes, a reintrodução no mercado de fármacos obsoletos.

Segundo Hadgraft (1985), o desenvolvimento de pró-fármacos permite aumentar a atividade do fármaco administrado topicamente, uma vez que a modificação das interações fármaco-pele aumenta a taxa de penetração. Além disso, a pele contém várias enzimas não específicas, capazes de biotransformar pró-fármacos, liberando o fármaco de seu transportador e tornando-o disponível bem próximo ao seu sítio de ação²⁹.

Durante a pesquisa de novos derivados com potencial atividade antichagásica, um intermediário de reação hidroximetilnitrofural foi obtido (pró-fármaco hidroximetilado de nitrofural) foi testado quanto à atividade

antimicrobiana e antichagásica, tendo sido demonstrado efeito superior, para estas duas atividades, em relação à molécula matriz (nitrofural).

Sabendo-se que os compostos nitrofurânicos são potenciais agentes mutagênicos devido ao grupo nitro presente na molécula, foi demonstrado, ainda, que este derivado apresenta atividade mutagênica, quatro vezes menor que o nitrofural em ensaios *in vitro*³⁰ e *in vivo*³¹.

Estudos para a avaliação toxicológica em animais (testes pré-clínicos) encontram-se em andamento e tendo em vista que este pró-fármaco é mais eficaz que a molécula matriz, comercialmente utilizada na forma de pomada para queimaduras (Furacin®), este trabalho visou estudar o comportamento do hidroximetilnitrofural (NFOH) em pomadas e emulsões quanto à sua capacidade de permeação transcutânea.

MATERIAL E MÉTODOS

Formulações propostas para estudo

O hidroximetilnitrofural (NFOH) foi gentilmente cedido pelo Lapdesf (Laboratório de Pesquisa e Desenvolvimento de Fármacos), da Faculdade de Ciências Farmacêuticas do Campus de Araraquara, UNESP, SP.

A Tabela 1 apresenta as matérias-primas utilizadas para a obtenção da pomada hidrofílica/lavável.

Para a obtenção da pomada hidrofílica os Ethylene glycol polymer foram pesados, separadamente, em béqueres, e aquecidos à temperatura elevada o suficiente para fusão e ou solubilização dos sólidos, sendo adicionados

primeiramente os compostos de ponto de fusão mais elevado. Em seguida, foram adicionados os demais componentes e após fusão e homogeneização, foi vertido vagarosamente o princípio ativo (NFOH), sob lenta e constante agitação, até o resfriamento das preparações.

Tabela 1. Pomada Hidrofílica/Lavável.

Matéria – prima	Composição percentual
BHT	0,1
imidazolidinyl urea	0,5
Ethylene glycol polymer (PEG-75)	40,0
Ethylene glycol polymer (PEG-32)	30,0
Ethylene glycol polymer (PEG-12) q.s.p.	100,0

A Tabela 2 apresenta as matérias-primas utilizadas para a obtenção da emulsão óleo/água não iônica.

Tabela 2. Emulsão óleo/água não iônica.

Matéria – prima	Composição Percentual
PPG-2-Cetareth-9 OE	3,0
Cetearyl Alcohol	6,0
Dimethicone	1,0
Cetearyl Palmitate	3,0
Isopropyl Miristate	4,0
BHT	0,05
Propylparaben	0,02
Methylparaben	0,18
Propylene Glycol	3,0
PEG-75 Lanolin 50%	2,0
Aqua q.s.p.	100,0

As fases graxa e aquosa foram pesadas, separadamente, em béqueres, e aquecidas à temperatura elevada para fusão e solubilização

dos sólidos (75 a 80 °C). Em seguida, a fase aquosa foi vertida sobre a fase oleosa, sob lenta e constante agitação. Foram preparados três tipos de emulsões, distintas quanto ao momento de incorporação do fármaco: uma na creme base pronta (E O/A 1), outra na fase oleosa (E O/A 2), e a terceira na fase aquosa (E O/A 3).

Análise espectrofotométrica

Espectro de absorção no ultravioleta

Foi feita uma curva analítica, para determinação do espectro de absorção no ultravioleta. Para isso, uma solução padrão de NFOH foi preparada. Foram pesados exatamente 12,50 mg de NFOH e transferidos para um balão volumétrico de 500 mL, dissolvendo-se e completando o volume com água deionizada, sendo obtida uma solução final de 25,0 µg/mL de NFOH (solução padrão).

Alíquotas de 1,0 a 20,0 mL de solução padrão (25,0 µg/mL) foram transferidas para balões volumétricos de 25 mL e o volume foi completado com água deionizada, obtendo-se concentrações de 1,0 a 20,0 µg/mL de NFOH em cada balão volumétrico.

A leitura dessa solução foi feita contra o branco (água deionizada) na faixa de 190-600 nm, com velocidade de varredura de 300 nm/min.

Curva analítica

Uma curva analítica para o NFOH foi construída. Para isso, alíquotas de 1,0 a 20,0 mL de solução padrão (25,0 µg/mL) foram transferidas para balões volumétricos de 25 mL e o volume foi completado com água deionizada,

obtendo-se concentrações de 1,0 a 20,0 µg/mL de hidroximetilnitrofurais em cada balão volumétrico.

As leituras destas soluções foram efetuadas a 376nm, contra o branco água deionizada. Os valores de absorbância foram lidos em triplicata. A curva foi construída, relacionando-se a absorbância média das três leituras contra a concentração em cada nível.

Validação do método espectrofotométrico na determinação de NFOH em pomadas hidrofílicas e emulsões O/A.

Para validação do método espectrofotométrico foram preparadas solução de NFOH, soluções das amostras (pomadas/emulsões contendo o fármaco) e soluções placebo (sem fármaco) tanto da pomada hidrofílica quanto da emulsão O/A.

Pomada hidrofílica

Para preparação da solução de foi transferida uma alíquota de 8,0 mL de solução padrão (25,0 µg/mL) para um balão volumétrico de 25 mL e o volume completado com água deionizada, obtendo-se uma concentração de 8,0 µg/mL de NFOH.

Para preparação da solução amostra da pomada hidrofílica foram pesados 0,5 g da pomada que equivale a 0,001g de NFOH e transferidos a um balão volumétrico de 50 mL, dissolvendo-se e completando o volume com água deionizada.

A solução foi filtrada rejeitando-se os primeiros 5 mL e do filtrado tomou-se uma

alíquota de 10 mL que foi transferida para um balão volumétrico de 25 mL, completando-se o volume com água deionizada, obtendo-se uma concentração final de 8,0 µg/mL de NFOH.

Também foi preparada a solução placebo da pomada hidrofílica. Foi pesado 1,0 g de pomada placebo, procedendo-se então conforme a preparação da solução amostra da pomada hidrofílica.

As três soluções foram analisadas em espectro de absorção no UV/Visível, no intervalo de 190 a 600 nm, utilizando-se água deionizada como branco.

Emulsões O/A

As soluções de NFOH, amostra e placebo foram preparadas da mesma forma como descrito para a pomada hidrofílica, porém foi usado como sistema solvente clorofórmio/isopropanol 1:1.

As três soluções foram analisadas em espectro de absorção no UV/Visível, no intervalo de 190 a 600 nm, utilizando-se clorofórmio/isopropanol 1:1 como branco.

Teste de precisão através da repetibilidade

Para este teste foram preparadas as soluções de NFOH, amostra e placebo das formulações propostas, como descrito anteriormente. Foram realizadas 10 determinações para cada solução e os resultados foram analisados estatisticamente.

Também foi realizado o teste de precisão para verificar se a repetibilidade testada na pomada hidrofílica e emulsões de NFOH também se aplica à pomada comercial Furacin®.

Foi utilizado como padrão a média aritmética

das leituras de 3 soluções padrão de 8,0 µg/mL de nitrofural para a preparação da solução padrão de NFOH.

Foram efetuadas 10 determinações para cada amostra. Os resultados foram analisados estatisticamente.

Teste de recuperação

No teste de recuperação, as soluções de NFOH, amostra e placebo foram novamente preparadas, como descrito anteriormente. Durante todas as preparações era realizada uma leitura espectrofotométrica da solução para se assegurar que a concentração de NFOH era a esperada.

Para preparação das soluções de leitura, alíquotas das soluções de amostras das formulações (pomada hidrofílica e emulsões) de NFOH e das soluções de NFOH foram transferidas para balões volumétricos de 25 mL, sendo o volume completado com água deionizada, no caso da pomada hidrofílica e com o sistema solvente clorofórmio/isopropanol 1:1, para as emulsões, as soluções foram preparadas de acordo com a Tabela 3.

A pomada hidrofílica comercial (Furacin®) também foi testada. Foi preparada a solução de nitrofural de concentração de 25,0 µg/mL e a solução de Furacin®, com concentração final de 8,0 µg/mL nitrofural de acordo com o descrito para preparação da solução da pomada hidrofílica de NFOH. Seguiu-se o procedimento para a preparação das soluções de leitura.

A porcentagem de recuperação (%R) para cada amostra foi calculada de acordo com a

Association of Official Analytical Chemists (AOAC)⁽³²⁾, através da seguinte equação:

$$R \% = \frac{Ca - Cna}{Cp} \times 100$$

onde,

R % = Porcentagem do padrão recuperada

Ca = Concentração do analito encontrado na amostra adicionada de padrão;

Cna = Concentração do analito encontrado na amostra não adicionada de padrão;

Cp = Concentração de padrão do analito.

Teste de liberação *in vitro*

Para este ensaio, foi empregada a metodologia usada por Isaac (1998), através do uso de uma cuba de dissolução de comprimidos, utilizando-se cada uma das formulações, separadamente, para a realização do teste³³.

Cada preparação foi previamente pesada (0,3 g) e, em seguida, colocada num tubo de vidro em cuja extremidade estava acoplada uma membrana de diálise e, ele próprio, submerso em 50 mL de solução de cloreto de sódio 0,9% p/p, denominada solução receptora, mantidos a 37 °C, sob agitação de 120 rpm.

A cada 30 minutos, foram coletadas amostras de 5,0 mL da solução receptora e recolocados 5,0 mL de solução de cloreto de sódio 0,9% p/p, para manutenção de volume constante.

As amostras coletadas foram analisadas em espectrofotômetro de absorção no UV, para a leitura das absorbâncias, em 371,5 nm (e para a pomada comercial de nitrofural foi realizada a leitura em 374,0 nm). As amostras colhidas no

tempo zero foram usadas como branco, para zerar o aparelho. As absorbâncias obtidas foram

plotadas em gráfico, em função do tempo de experimentação.

Tabela 3. Preparação das soluções de leitura para as emulsões.

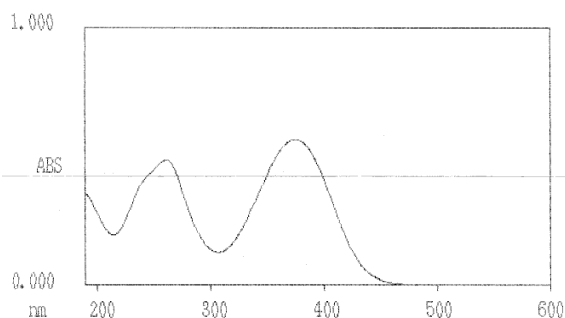
Volume adicionado de amostra em mL	Concentração de amostra em $\mu\text{g/mL}$	Volume adicionado de solução de NFOH em mL	Concentração de solução de NFOH em $\mu\text{g/mL}$	Concentração final da solução em $\mu\text{g/mL}$
-----	-----	10,0	10,0	10,0
10,0	3,32	10,0	10,0	13,2
10,0	3,32	5,0	5,0	8,2
10,0	3,32	3,0	3,0	6,2
10,0	3,32	-----	-----	3,2

RESULTADOS

Espectro de absorção no ultravioleta do NFOH

O intervalo de onda empregado foi de 190 a 600 nm. A Figura 1 mostra os espectros de absorção do NFOH, utilizando água deionizada como solvente.

Figura 1. Espectros de absorção no UV, no intervalo de 190 a 600 nm: NFOH (8,0 $\mu\text{g/mL}$) em água deionizada.



A Tabela 4 mostra os comprimentos de onda de maior absorção do NFOH. O comprimento de onda trabalhado na padronização do método analítico foi o de 371,5 nm.

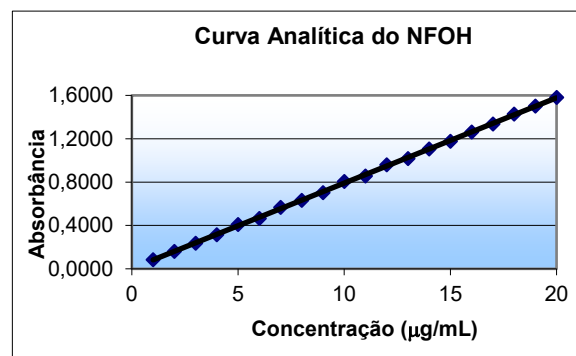
Tabela 4. Comprimentos de onda e respectivas absorbâncias do NFOH.

λ max (nm)	Abs
371,5 nm	0,6096
262 nm	0,5226

Análise das pomadas e emulsões formuladas

Para padronização da metodologia analítica foi construída uma curva analítica do NFOH (Figura 2).

Figura 2. Curva analítica do NFOH ($y = 0,0787x + 0,0035$ ($y = ax + b$) e $R^2 = 0,9997$).



A faixa linear de detecção que obedece a Lei de Beer é dependente do composto analisado e do tipo de detector utilizado ⁽³⁴⁾.

A linearidade foi determinada pelo coeficiente de correlação (r), obtido pela curva analítica.

Pesquisa de interferentes a partir de excipientes

Tanto para a pomada hidrofílica quanto para as emulsões com NFOH, observou-se que não há interferência nos picos de absorção dos placebos em relação aos picos de absorção do NFOH.

A Figura 3 mostra a sobreposição dos espectros de absorção das soluções padrão de NFOH, das soluções amostra (pomada hidrofílica de NFOH e emulsões) e das soluções placebo.

Teste de precisão através da repetibilidade

Os resultados obtidos com aplicação do método espectrofotométrico nas amostras e o tratamento estatístico que foi efetuado estão resumidos na Tabela 5.

Teste de recuperação

A recuperação para o método foi avaliada para a pomada hidrofílica e para os três tipos de emulsão O/A. As tabelas 6, 7, 8, 9 e 10 expõem os resultados obtidos.

Teste de liberação *in vitro*

Os resultados deste teste encontram-se na Figura 4, respectivamente, para a pomada hidrofílica, emulsão O/A 1, emulsão O/A 2, emulsão O/A 3 e pomada hidrofílica de

nitrofural comercial (Furacin[®]).

DISCUSSÃO

Foram realizados testes preliminares a fim de escolher o solvente, concentração e comprimento de onda adequado para cada amostra estudada. A escolha do comprimento de onda adequado é importante para otimização do método. O comprimento de onda escolhido para o fármaco foi aquele onde é máxima a absorção, pois é neste comprimento de onda onde é maior a sensibilidade.

O método espectrofotométrico proposto para o doseamento do NFOH *in vitro* a 371,5 nm, destaca-se pela facilidade e rapidez de execução, boa exatidão, precisão e economia.

Para a padronização do método espectrofotométrico no ultravioleta, empregaram-se soluções de NFOH em água deionizada, como solvente, para pomada hidrofílica e, NFOH em clorofórmio/isopropanol 1:1 para as emulsões. A água deionizada foi obtida pelo sistema osmose reversa sendo que o espectro de absorção do NFOH, no intervalo de 190 a 600 nm, apresentou um pico de absorção máxima em 371,5 nm. Como o estudo pretende uma comparação entre a pomada e emulsões propostas com a pomada atualmente no mercado de nitrofural (Furacin[®]), foi realizada uma padronização do método espectrofotométrico no ultravioleta para esta pomada, utilizando-se água deionizada como solvente, apresentando um pico máximo de absorção em 374,0 nm.

Apesar do fármaco ser pouco solúvel em água, a escolha desse solvente foi devido a não interação com as amostras, pela

hidrossolubilidade da pomada e pelo baixo custo. Já para o sistema solvente de

clorofórmio/isopropanol 1:1, o fármaco apresentou boa solubilidade e esse sistema

Figura 3. Sobreposição dos espectros de absorção das soluções placebo (A), solução padrão de NFOH (B) e soluções amostra (C). $\lambda_{\text{máx}}$ 371,5nm. Velocidade de varredura: 300nm/min. Concentração: 8,0 μ g/mL.

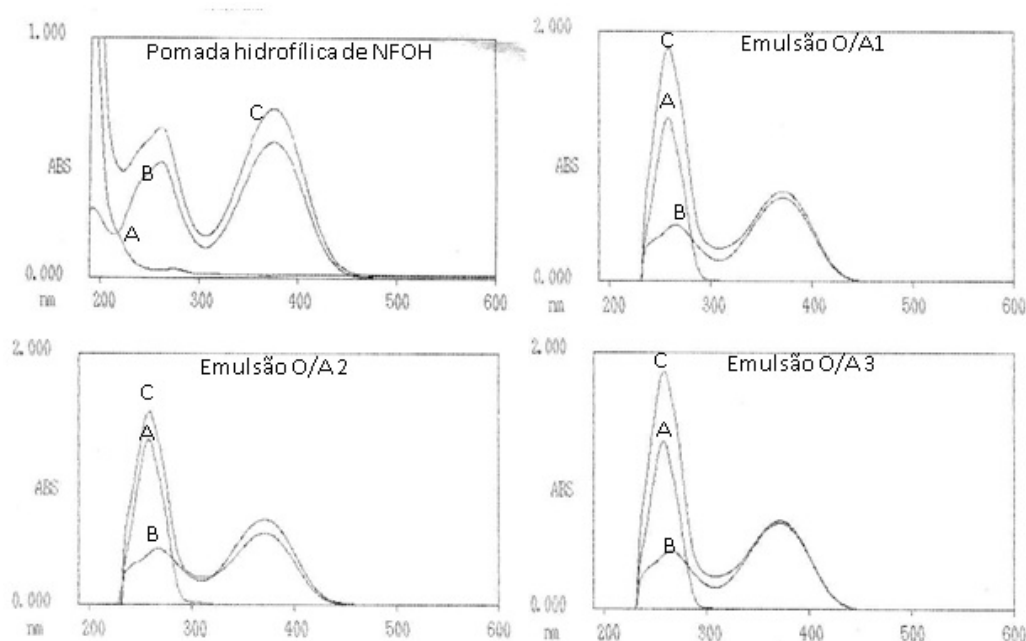


Tabela 5. Resultados obtidos na determinação do teor de fármaco presentes nas amostras e respectivas análises estatísticas, empregando-se o método espectrofotométrico.

	<i>Pomada Hidrofílica</i>	<i>Emulsão O/A 1</i>	<i>Emulsão O/A 2</i>	<i>Emulsão O/A 3</i>	<i>Furacin®</i>
Valor teórico de NFOH (μg)	8,00	8,00	8,00	8,00	8,00 **
Valor encontrado* (μg)	8,17	8,13	8,11	8,17	8,88
Teor percentual (%)	102,12	101,62	101,37	102,12	111,00
Desvio padrão	0,13	0,17	0,21	0,25	0,007
Coefficiente de variação CV (%)	1,64	2,11	2,56	3,09	1,64
Intervalo de 95% de confiança da média	8,17 \pm 0,13	8,01 \pm 0,34	8,11 \pm 0,42	8,17 \pm 0,5	8,17 \pm 0,13

* média de dez determinações

** valor teórico de NF (nitrofural)

Emulsão O/A 1: NFOH incorporado nas duas fases.

Emulsão O/A 2: NFOH incorporado na fase oleosa.

Emulsão O/A 3: NFOH incorporado na fase aquosa.

Tabela 6. Teste de recuperação da solução de NFOH adicionada às amostras de pomada hidrofílica e analisadas pelo método espectrofotométrico no UV a 371,5 nm.

Concentração de padrão adicionada ($\mu\text{g/mL}$)	Concentração de padrão recuperado*	Recuperação (%)	Média de Recuperação \pm DP
10,0	10,16	101,65	100,94 \pm 0,65
5,0	5,01	100,38	
3,0	3,02	100,80	

* média de três determinações

Tabela 7. Teste de recuperação da solução de NFOH adicionada às amostras de emulsão O/A 1 e analisadas pelo método espectrofotométrico no UV a 371,5 nm.

Quantidade de padrão adicionada ($\mu\text{g/mL}$)	Quantidade de padrão recuperado*	Recuperação (%)	Média de Recuperação \pm DP
10,0	10,13	101,27	99,89 \pm 1,24
5,0	4,94	98,86	
3,0	2,99	99,53	

* média de três determinações

Tabela 8. Teste de recuperação da solução de NFOH adicionada às amostras de emulsão O/A 2 e analisadas pelo método espectrofotométrico no UV a 371,5 nm.

Quantidade de padrão adicionada ($\mu\text{g/mL}$)	Quantidade de padrão recuperado*	Recuperação (%)	Média de Recuperação \pm DP
10,0	10,14	101,40	100,14 \pm 1,15
5,0	4,99	99,89	
3,0	2,97	99,14	

* média de três determinações

Tabela 9. Teste de recuperação da solução de NFOH adicionada às amostras de emulsão O/A 3 e analisadas pelo método espectrofotométrico no UV a 371,5 nm.

Quantidade de padrão adicionada ($\mu\text{g/mL}$)	Quantidade de padrão recuperado*	Recuperação (%)	Média de Recuperação \pm DP
10,0	9,92	99,24	99,80 \pm 1,89
5,0	5,09	101,91	
3,0	2,95	98,26	

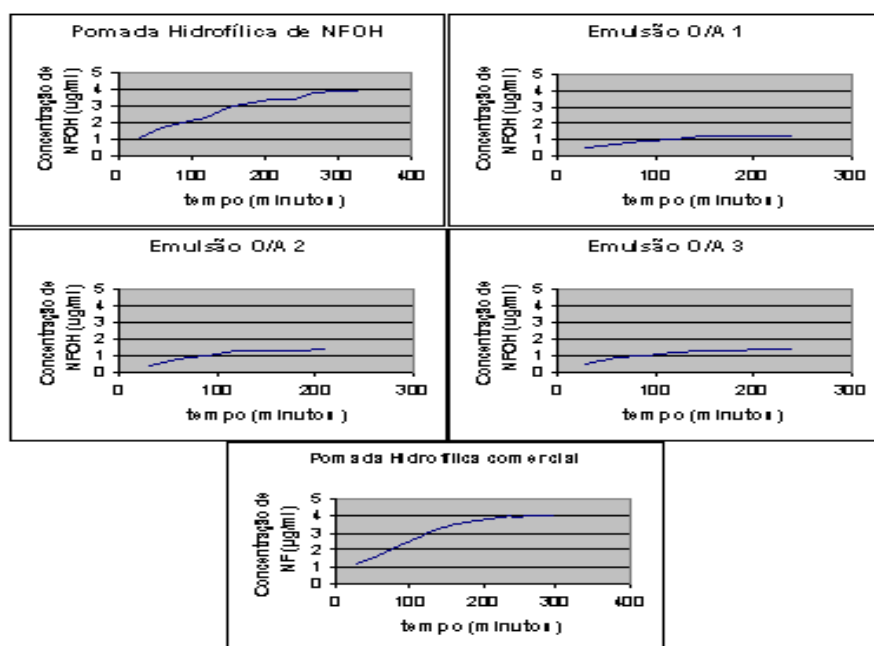
* média de três determinações

Tabela 10. Teste de recuperação da solução de nitrofural adicionada às amostras da pomada hidrofílica de nitrofural comercial (Furacin®) e analisadas pelo método espectrofotométrico no UV a 374,0 nm.

Quantidade de padrão adicionada ($\mu\text{g/mL}$)	Quantidade de padrão recuperado*	Recuperação (%)	Média de Recuperação \pm DP
10,0	10,01	100,13	100,73 \pm 1,97
5,0	4,96	99,12	
3,0	3,14	102,93	

* média de três determinações

Figura 4. Liberação *in vitro* do NFOH, na pomada hidrofílica, nas emulsões com NFOH e na pomada hidrofílica comercial.



também foi capaz de solubilizar as emulsões por completo.

A fim de garantir que o método forneça informações confiáveis e que os resultados obtidos reflitam a operação de procedimentos analíticos, foram avaliados neste trabalho quatro parâmetros da validação para o método espectrofotométrico: linearidade, especificidade, precisão e exatidão; porém, a validação de um método analítico não implica em isenção de erros, mas permite a obtenção de informações estatisticamente confiáveis, confirmando que o método é adequado ao uso proposto³⁵.

Segundo Bressolle *et al.*, (1996) é necessário o uso de um número suficiente de padrões para definir adequadamente a relação entre a concentração e a resposta do equipamento. A curva analítica deve ser construída usando no mínimo cinco valores, excluindo valores de branco, na faixa de concentração esperada³⁶.

A linearidade do método foi determinada através da curva analítica (Figura 2), na qual foi verificada a proporcionalidade entre as diferentes concentrações do padrão e as absorvâncias.

Para a análise espectrofotométrica do NFOH foram utilizadas vinte soluções padrão de diferentes concentrações. O coeficiente de correlação de 0,9997, obtido na padronização do método, demonstra que as soluções padrão do NFOH apresentam boa correlação linear entre a absorvância e as concentrações, indicando que os coeficientes de linearidade são adequados (0,99 a 1,0)^{32, 34, 37, 38}. Esta correlação é verificada na faixa de concentração de 1,0 a 20,0 µg/mL.

O fato do valor de *a* estar muito próximo de zero, indica que existe pouca influência dos excipientes^{39, 40}.

O estudo da influência dos excipientes foi verificado através da aplicação dos métodos propostos em placebos da pomada e das emulsões de NFOH (Figura 4). Os espectros dos placebos da pomada e emulsões do NFOH não apresentaram uma absorção significativa a 371,5 nm, portanto, não parece exercer influência nos métodos propostos. Não foi possível realizar este teste para a pomada hidrofílica de nitrofural comercial (Furacin®) por não dispormos de amostras do fármaco nitrofural nem amostras da pomada hidrofílica sem o fármaco (placebo).

A exatidão do método, comprovada através dos testes de recuperação, pode ser definida como a proximidade dos resultados experimentais obtidos com os valores nominais^{34, 38}. A média da recuperação deve ser de 98% a 102% do valor teórico³⁷. As Tabelas 6, 7, 8, 9 e 10 mostram a porcentagem de recuperação das amostras. Os resultados obtidos são adequados tanto para a pomada hidrofílica e emulsões de NFOH a 371,5 nm quanto para a pomada comercial de nitrofural a 374,0 nm. Um método pode ser considerado exato quando o intervalo dos resultados apresenta variação de $\pm 2,0\%$ do valor nominal.

A precisão de um método é o grau de concordância entre os resultados dos testes individuais, quando o procedimento é aplicado diversas vezes em uma mesma amostra e em condições idênticas de análise^{32, 34}. Para que um método seja considerado preciso, é necessário que se faça a leitura de no mínimo 10 amostras com um CV menor ou igual a 1%³⁴. No entanto,

alguns autores aceitam valores de CV menores do que 2,0%, sendo que uma precisão menor que 1,5% é considerada boa e valores entre 0,5 e 1,0% são considerados excelentes ⁽⁴¹⁾. De acordo com os resultados expressos na Tabela 5 todos os métodos propostos são precisos.

Após a conclusão dos testes de padronização do método de análise proposto, foram realizados testes de liberação do fármaco *in vitro*, que mostraram que todas as formulações propostas apresentaram baixo desempenho quanto à liberação do fármaco, mas entre elas, a pomada hidrofílica foi a que apresentou um melhor desempenho. Foi realizado um teste de liberação *in vitro* da pomada hidrofílica de nitrofuril comercial (Furacin[®]), apresentando um resultado bastante semelhante ao da pomada hidrofílica de NFOH. A partir destes dados *in vitro*, pode-se concluir que não há diferenças significativas de permeação entre o nitrofuril e seu pró-fármaco.

CONCLUSÃO

Tendo em vista que a proposta é uma preparação para tratar queimaduras e a sua ação esperada é local, não necessitando a absorção do fármaco, pode-se concluir que todas as formulações propostas apresentaram bom desempenho, podendo ser utilizada para a formulação do medicamento tópico contendo NFOH.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Ruocco E, Donnarumma G, Baroni A, Tufano MA. Bacterial and viral skin diseases. *Dermatol Clin*. 2007 Oct;25(4):663-76, xi. doi: 10.1016/j.det.2007.06.008.
2. Mazingo DW, Mcmanus AT; Pruitt Jr, BA. Infections of burn wounds. In: Bennett JV, Brachman PS, editors. *Hospital infections*. 4th ed. Philadelphia: Lippincott-Raven Publishers; 1998. p.587-97.
3. Savetamal A. Infection in Elderly Burn Patients: What Do We Know? *Surg Infect (Larchmt)*. 2021 Feb;22(1):65-68. doi: 10.1089/sur.2020.322.
4. Mayhall CG. Surgical infections including burns. In: Wenzel RP, editors. *Prevention and control of nosocomial infections*. 2th ed. Baltimore: Williams & Wilkins; 1993. p. 614-64.
5. Roshangar L, Soleimani Rad J, Kheirjou R, Reza Ranjesh M, Ferdowsi Khosroshahi A. Skin Burns: Review of Molecular Mechanisms and Therapeutic Approaches. *Wounds*. 2019 Dec;31(12):308-315.
6. Palmieri TL, Greenhalgh DG. Topical treatment of pediatric patients with burns: a practical guide. *Am J Clin Dermatol*. 2002;3(8):529-34.
7. Oryan A, Alemzadeh E, Moshiri A. Burn wound healing: present concepts, treatment strategies and future directions. *J Wound Care*. 2017 Jan 2;26(1):5-19.
8. Rupp HS, Munns RK, Long AR. Simultaneous determination of nitrofurazone and furazolidone in shrimp (*Penaeus vannamei*) muscle tissue by liquid chromatography with UV detection. *J AOAC Int*. 1993 Nov-Dec;76(6):1235-9.
9. Noronha C, Almeida A. Local burn treatment - topical antimicrobial agents. *Annals of Burns and Fire Disasters*. Lisbon, 2000, 13(4):216-9.
10. Windholz M, Budavari S, Blumetti RF, Otterbein ES. The index MERCK. An encyclopedia of chemicals, drugs and biologicals. Rahway: Merck & Co. Inc., p. 1463, 1983.
11. Katzung BG. *Farmacologia básica e Clínica*. 6ª edição; Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 1998.
12. Webber CE, Glances E, Crenshaw CA. Treatment of second degree burns: nitrofurazone, povidone-iodine, and silver sulfadiazine. *JACEP*. 1977 Nov;6(11):486-90.

13. Singh M, Govindarajan R, Nath V, Rawat AK, Mehrotra S. Antimicrobial, wound healing and antioxidant activity of *Plagiochasma appendiculatum* Lehm. et Lind. *J Ethnopharmacol.* 2006 Aug 11;107(1):67-72.
14. Ruef C. Complicated skin and soft-tissue infections--consider gram-negative pathogens. *Infection.* 2008 Aug;36(4):295.
15. Heggers JP, Robson MC, Herndon DN, Desai MH. The efficacy of nystatin combined with topical microbial agents in the treatment of burn wound sepsis. *J Burn Care Rehabil.* 1989 Nov-Dec;10(6):508-11.
16. Zerlotti E. Contribuição à terapêutica dos condutos radiculares. Campinas. Tese [Doutorado]. Faculdade de Odontologia de Campinas; 1959.
17. Smith MA, Edwards DI. Redox potential and oxygen concentration as factors in the susceptibility of *Helicobacter pylori* to nitroheterocyclic drugs. *J Antimicrob Chemother.* 1995 Jun;35(6):751-64.
18. McOsker CC, Fitzpatrick PM. Nitrofurantoin: mechanism of action and implications for resistance development in common uropathogens. *J Antimicrob Chemother.* 1994 May;33 Suppl A:23-30.
19. ASNIS RE. The reduction of Furacin by cell-free extracts of Furacin-resistant and parent-susceptible strains of *Escherichia coli*. *Arch Biochem Biophys.* 1957 Jan;66(1):208-16.
20. Orna MV, Mason RP. Correlation of kinetic parameters of nitroreductase enzymes with redox properties of nitroaromatic compounds. *J Biol Chem.* 1989 Jul 25;264(21):12379-84.
21. Ghersi-Egea JF, Maupoil V, Ray D, Rochette L. Electronic spin resonance detection of superoxide and hydroxyl radicals during the reductive metabolism of drugs by rat brain preparations and isolated cerebral microvessels. *Free Radic Biol Med.* 1998 May;24(7-8):1074-81.
22. Dietrich DR, Swenberg JA. In: *Toxicology of the Kidney.* Hook JB, Goldstein RS, editors. New York: Raven Press Ltd; 1993. p. 495-538.
23. Kovacic P, Sacman A, Wu-Weis M. Nephrotoxins: widespread role of oxidative stress and electron transfer. *Curr Med Chem.* 2002 Apr;9(8):823-47. doi: 10.2174/0929867024606803.
24. Prieto A, Baeza ML, Herrero T, Barranco R, De Castro FJ, Ruiz J, De Barrio M. Contact dermatitis to Furacin. *Contact Dermatitis.* 2006 Feb;54(2):126.
25. Bilgili SG, Ozaydin-Yavuz G, Yavuz IH, Bilgili MA, Karadag AS. Cutaneous reactions caused by nitrofurazone. *Postepy Dermatol Alergol.* 2019 Aug;36(4):398-402.
26. Bundgaard H. Design of prodrugs. Amsterdam: Elsevier, 1985.
27. Chung MC, Ferreira EI. O processo de latência no planejamento de fármacos. *Quím. Nova.* 1999. 22(1):75-84.
28. Bundgaard H. Novel chemical approaches in prodrug design. *Drugs Future.* 1991. 16:443-58.
29. Hadgraft J. Prodrugs and skin absorption. In: Bundgaard H. editor. Design of prodrugs. Amsterdam: Elsevier. 1985. p.271-89.
30. Guido RVC, Ferreira EI, Nassute JC, Varanda EA, Chung MC. Diminuição da atividade mutagênica do pró-fármaco NFOH-121 em relação ao nitrofurazone. *Rev. Cienc. Farm.* 2001. 22(2):319-33.
31. Bosquesi PL, Almeida AE, Blau L, Menegon RF, Santos JL, Chung MC. Toxicidade de fármacos nitrofurânicos. *Rev. Ciênc. Farm. Básica Apl.* 2008, 29 (3): 231-38.
32. Association of Official Analytical Chemists. Official methods of analysis of AOAC. 15 ed. Washington. 1991, 1:xvii.
33. Isaac VLB. Desenvolvimento, estabilidade e liberação in vitro de preparações lipolíticas. São Paulo. Tese [Doutorado]. Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo; 1998.
34. FDA. Reviewer Guidance: Validation of Chromatographic Methods, 1994
35. Bruce P, Minkinen P, Riekkola M.L. Practical method validation: Validation sufficient for an analysis

- method. *Mikrochim Acta*. 1998, 128:93–106.
36. Bressolle F, Bromet-Petit M, Audran M. Validation of liquid chromatographic and gas chromatographic methods. Applications to pharmacokinetics. *J Chromatogr B Biomed Appl*. 1996 Nov 8;686(1):3-10.