

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
FACULDADE DE FARMÁCIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

**NITAZOXANIDA: DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODOS  
ANALÍTICOS E ESTUDO DA ESTABILIDADE**

**MARCELO DONADEL MALESUIK**

**PORTO ALEGRE, 2010**



PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

NITAZOXANIDA: DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODOS  
ANALÍTICOS E ESTUDO DA ESTABILIDADE

Tese apresentada por **Marcelo Donadel Malesuik**  
para obtenção do TÍTULO DE DOUTOR em  
Ciências Farmacêuticas

Orientador: Prof. Dr. Martin Steppe

Porto Alegre, 2010

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, em nível de Doutorado – Produção e Controle de Qualidade de Produtos Farmacêuticos – da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul e aprovada em 09.04.2010, pela Banca Examinadora constituída por:

Profa. Dr. Ana Maria Bergold  
Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Profa. Dr. Ana Rita Breier  
Universidade do Vale do Rio dos Sinos

Prof. Dr. Pedro Eduardo Fröhlich  
Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Profa. Dr. Simone Gonçalves Cardoso  
Universidade Federal de Santa Catarina

M246n Malesuik, Marcelo Donadel  
Nitazoxanida: desenvolvimento e validação de métodos analíticos e estudo da estabilidade / Marcelo Donadel Malesuik. – Porto Alegre: UFRGS, 2010. – xxiv, 165 p.: il.

Tese (Doutorado). UFRGS. Faculdade de Farmácia. Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas.

1. Nitazoxanida 2. Antiparasitários. 3. Validação: métodos de análise de fármacos. 4. Estabilidade. 5. Citotoxicidade. I. Steppe, Martin. II. Título.

CDU: 615.2.07

Bibliotecária responsável:  
Margarida Maria Cordeiro Fonseca Ferreira – CRB 10/480

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Ensino e Pesquisa em Controle de Qualidade da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul.



**Dedico esta tese à minha família.**





## AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Martin Steppe e à Profa. Dr. Elfrides Eva Scherman Schapoval pela orientação, dedicação, confiança, incentivo e amizade, pelo crescimento intelectual e aprimoramento científico, mas principalmente pelos exemplos de vida, humanidade e profissionalismo;

Aos professores Nádia M. Volpato, Célia G. Chaves e Tércio P. Oppe, do Laboratório de Ensino e Pesquisa em Controle de Qualidade;

Aos professores e ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas;

Ao Prof. Dr. André Jablonski, do Laboratório de Geoquímica Ambiental, pela colaboração e a possibilidade de utilização do equipamento de eletroforese capilar;

À Profa. Dr. Nance Nardi e à acadêmica Márcia R. Trein, do Departamento de Genética da UFRGS, por disponibilizar a infra-estrutura laboratorial e propiciar os estudos de citotoxicidade;

Aos queridos amigos do LEPCQ, pela amizade, momentos de descontração e discussões científicas, em especial à bolsista de iniciação científica Heloísa Mazotti Lopes Gonçalves, pela ajuda em diversas etapas desta tese. Às mestrandas Aline B. Barth e Rubia L. Pereira, pela colaboração nas revisões da língua inglesa.

Às colegas Lorena, Leila e Rose, pela colaboração e amizade;

Aos amigos Rogério V. Lourega, Cássia V. Garcia e Liberato Brum Júnior, pela ajuda em diferentes etapas dos estudos;

Aos colegas e amigos da Multilab, em especial ao Laboratório de P&D, e à Fibele A. Lanzasova, pela colaboração;

À CAPES, pelos três anos de financiamento com bolsa de estudos;

A todos que colaboraram de alguma maneira para a conclusão desta tese e que não foram citados.



## RESUMO

A nitazoxanida é um novo antiparasitário de amplo espectro e pertence à classe dos nitrotiazóis. No Brasil, encontra-se disponível na forma de comprimidos revestidos e pó para suspensão oral, sob nome comercial de Annita<sup>®</sup>. A análise de fármacos é necessária em todas as fases do desenvolvimento farmacêutico e na manutenção da segurança e eficácia terapêutica dos produtos comercializados. Assim, o presente trabalho objetivou o desenvolvimento e validação de métodos para análise qualitativa e quantitativa da nitazoxanida nas formas farmacêuticas comerciais e a avaliação da estabilidade do fármaco em condições de degradação forçada, contemplando a determinação da cinética de fotodegradação e o isolamento, identificação e estudo da citotoxicidade do produto de degradação majoritário. As análises por espectrometria de massas (MS/MS), infravermelho (IV), ressonância magnética nuclear (RMN <sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C) e calorimetria exploratória diferencial permitiram identificar a nitazoxanida utilizada como substância química de referência. Os métodos por cromatografia em camada delgada, espectrofotometria no ultravioleta (UV), cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) e eletroforese capilar (EC) foram utilizados para identificação do fármaco nas formas farmacêuticas. Os métodos quantitativos validados foram: UV, CLAE e EC. Todos cumpriram com os parâmetros descritos pelas guias de validação e não apresentaram diferença estatística significativa na determinação do fármaco. O estudo preliminar de estabilidade frente à degradação oxidativa, ácida, básica, térmica e fotolítica demonstrou que o fármaco é instável em todas as condições testadas, sendo que os meios oxidativo, alcalino e fotolítico foram os fatores de maior importância. A cinética de fotodegradação da nitazoxanida apresentou cinética de ordem zero para ambas as formas farmacêuticas. Em todas as condições de degradação testadas ocorreu a formação de um produto de degradação majoritário, chamado de PD1, o qual precipitou nas condições analíticas e foi isolado por filtração. O mesmo foi identificado por RMN <sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C, EM/EM e IV como o derivado desacetilado da nitazoxanida, a tizoxanida. A avaliação preliminar da citotoxicidade indicou que o produto isolado apresenta maior toxicidade celular *in vitro* após 48 horas de incubação frente à células mononucleares, quando comparado à nitazoxanida. Os resultados obtidos neste trabalho demonstram a importância do aprofundamento dos

estudos nesta área para garantir a segurança e eficácia terapêutica dos produtos farmacêuticos comercializados.

**Palavras-chave:** nitazoxanida, validação, estabilidade, produto de degradação, estudo da citotoxicidade.

## ABSTRACT

### Nitazoxanide: development and validation of analytical methods and stability study

Nitazoxanide is a new broad-spectrum antiparasitic drug and it belongs to the class of nitrothiazol. In Brazil, it is available as tablets and powder for oral suspension, under the commercial name of Annita<sup>®</sup>. Drug analysis is needed in all phases of pharmaceutical development and maintenance of marketed products safety and efficacy. Thus, the present study aimed the methods development and validation for qualitative and quantitative analysis of nitazoxanide in commercial pharmaceutical forms and evaluation of drug stability in forced degradation conditions, comprising the photodegradation kinetics determination and the isolation, identification and the cytotoxicity study of the major degradation product. The analysis by mass spectrometry (MS/MS), infrared (IR), nuclear magnetic resonance (<sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C NMR) and differential scanning calorimetry allows to identify the nitazoxanide chemical reference structure. The methods by thin layer chromatography, spectrophotometry (UV), high performance liquid chromatography (HPLC) and capillary electrophoresis (CE) were used to identify the drug in pharmaceutical formulations. Quantitative methods have been validated: UV, HPLC and CE. All methods met the criteria described by the validation guidelines and showed no significant statistically difference in the drug determination. The preliminary stability study of nitazoxanide under oxidative, acidic, basic, thermal and photolytic conditions showed that the drug is unstable in all tested conditions, and oxidative, alkaline and photolytic conditions are the factors of major importance. The photodegradation kinetics of nitazoxanide showed zero-order kinetics for both dosage forms. In all tested degradation conditions it was formed a majority degradation product, named PD1, which precipitated in the analytical conditions and it was isolated by filtration. The same product was identified by <sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C NMR, MS/MS and IR as deacetylated derivative of nitazoxanide, the Tizoxanide. The preliminary cytotoxicity evaluation indicated that the isolated product has a higher cellular toxicity *in vitro* after 48 hours of incubation, when compared to nitazoxanide. The results demonstrate the importance of this type of study to ensure the safety and efficacy of marketed pharmaceutical products.

**Keywords:** nitazoxanide, validation, stability, degradation product, cytotoxicity study.



## LISTA DE FIGURAS

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            |    |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>FIGURA 3.1.</b> Estrutura química da nitazoxanida.....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  | 15 |
| <b>FIGURA 4.1.</b> Curva de aquecimento obtida por DSC para a NTZ.....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     | 25 |
| <b>FIGURA 4.2.</b> Espectro de absorção na região do IV da NTZ SQR em pastilhas de KBr.....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                | 27 |
| <b>FIGURA 4.3.</b> Espectro de RMN <sup>1</sup> H em DMSO <sub>d6</sub> da NTZ SQR.....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    | 29 |
| <b>FIGURA 4.4.</b> Espectro de RMN <sup>13</sup> C em DMSO <sub>d6</sub> da NTZ SQR.....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   | 30 |
| <b>FIGURA 4.5.</b> Espectro de massas dos fragmentos obtidos na análise da NTZ SQR por EM/EM.....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          | 32 |
| <b>FIGURA 4.6.</b> Perfil cromatográfico obtido por CCD na análise da solução da NTZ SQR (P), solução amostra de pó para suspensão oral (A <sub>1</sub> ) e da solução de comprimidos revestidos (A <sub>2</sub> ), revelados por luz UV 254 nm.....                                                                                                                                                                                       | 34 |
| <b>FIGURA 4.7.</b> Espectros sobrepostos de NTZ SQR (A), pó para suspensão (B) e comprimidos revestidos (C) em água pH 4,5, na concentração de 12 µg/ml.....                                                                                                                                                                                                                                                                               | 36 |
| <b>FIGURA 4.8.</b> Cromatogramas sobrepostos da NTZ SQR (a), solução amostra de pó para suspensão oral (b) e comprimidos revestidos em acetoneitrila a 30 µg/ml.....                                                                                                                                                                                                                                                                       | 39 |
| <b>FIGURA 4.9.</b> Eletroferogramas obtidos por EC através das soluções de NTZ SQR (a), pó para suspensão (b) e comprimido revestido (c), na concentração de 30 µg/ml de NTZ e 40 µg/ml de PI.....                                                                                                                                                                                                                                         | 41 |
| <b>FIGURA 5.1.</b> A) Typical chromatogram for 30.0 µg mL <sup>-1</sup> NTZ standard solution in the experimental selected conditions; B) Chromatogram of basic-degraded NTZ and degradation products B1 and B2; C) Chromatogram of acid-degraded NTZ and degradation product A1; D) Chromatogram of oxidative-degraded NTZ and degradation product O1; E) Chromatogram of photo-degraded NTZ and degradation products P1, P2, and P3..... | 60 |
| <b>FIGURE 5.2.</b> Chemical structure of nitazoxanide.....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 | 70 |
| <b>FIGURE 5.3.</b> UV spectrum obtained through the analysis of nitazoxanide standard solution (A), placebo solution of powder for oral suspension (B), and placebo solution of coated tablets (C).....                                                                                                                                                                                                                                    | 76 |
| <b>FIGURE 5.4.</b> UV spectrum obtained through the analysis of nitazoxanide standard solution (A) and commercial samples solutions of powder for oral suspension solution (B) and coated tablets (C).....                                                                                                                                                                                                                                 | 77 |

**FIGURE 5.5.** **A:** Typical eletropherogram for 30.0  $\mu\text{g ml}^{-1}$  NTZ and 40.0  $\mu\text{g ml}^{-1}$  IS solution in the experimental selected conditions; **B:** IS, photo-degraded NTZ, and degradation product Dpp; **C:** IS, basic-degraded NTZ, and degradation product DPb; **D:** IS, acid-degraded NTZ, and degradation product DPa; **E:** IS, oxidative-degraded NTZ, and degradation product Dpo.....96

**FIGURA 6.1.** Chemical structure of nitazoxanide.....120

**FIGURE 6.2.** Typical chromatogram for 20.0  $\mu\text{g ml}^{-1}$  nitazoxanide standard solution (**A**); chromatograms showing the nitazoxanide intact peak for oral suspension powder (**B**) and coated tablets (**C**) during the time 0 (zero). The degradation after 270 min of light exposure for oral suspension powder (**D**) and coated tablets (**E**) in acetonitrile solution.....126

**FIGURE 6.3.** The suggested mechanism of amide degradation (A) and reductive nitro compounds (B) by photo irradiation process (254 nm).....127

**FIGURE 6.4.** Plots of concentration (zero-order reaction - **A**), log of concentration (first-order reaction - **B**) and reciprocal of concentration (second-order reaction - **C**) of remaining nitazoxanide versus time.....129

**FIGURA 6.5.** Chemical structure of nitazoxanide.....136

**FIGURA 6.6.** Chromatograms showing decomposition of nitazoxanide in the stability studies and absorpion spectrum of the degradation product PD1.....142

**FIGURA 6.7.** MS/MS fragmentation of PD1 (A) and nitazoxanide (B).....144

**FIGURA 6.8.** Infrared transmission spectrum of PD1 (A) and nitazoxanide (B).....145



## LISTA DE TABELAS

|                                                                                                                                                                       |     |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| <b>TABELA 3.1.</b> Condições analíticas utilizadas por alguns autores para determinação de NTZ em fluídos biológicos por cromatografia líquida.....                   | 17  |
| <b>TABELA 3.2.</b> Condições analíticas utilizadas por alguns autores para determinação de NTZ em diferentes formas farmacêuticas por cromatografia líquida.....      | 20  |
| <b>TABELA 4.1.</b> Frequências de absorção das principais bandas do espectro na região do IV da NTZ SQR e suas respectivas atribuições.....                           | 27  |
| <b>TABELA 4.2.</b> Atribuições do espectro de RMN <sup>1</sup> H da NTZ em <i>DMSO</i> <sub>d6</sub> .....                                                            | 29  |
| <b>TABELA 4.3</b> Atribuições do espectro de RMN <sup>13</sup> C da NTZ SQR em <i>DMSO</i> <sub>d6</sub> .....                                                        | 30  |
| <b>TABELA 4.4.</b> Condições cromatográficas definidas para identificação de NTZ por CLAE.....                                                                        | 37  |
| <b>TABELA 4.5.</b> Condições eletroforéticas definidas para identificação de NTZ.....                                                                                 | 40  |
| <b>TABELA 5.1.</b> Precision results of LC assay of nitazoxanide in tablets and powder for oral suspension.....                                                       | 63  |
| <b>TABELA 5.2.</b> Results of the robustness test of the chromatography method for nitazoxanide determination.....                                                    | 64  |
| <b>TABELA 5.3.</b> Precision results of UV-spectrophotometric assay of nitazoxanide in tablets and powder for oral suspension.....                                    | 77  |
| <b>TABELA 5.4.</b> Experimental values obtained in the recovery test for nitazoxanide by using the UV-spectrophotometric method.....                                  | 78  |
| <b>TABELA 5.5.</b> Results of the system suitability test.....                                                                                                        | 94  |
| <b>TABELA 5.6.</b> Precision results of CE assay of nitazoxanide in tablets and powder for oral suspension.....                                                       | 98  |
| <b>TABELA 5.7.</b> Capillary electrophoresis conditions and investigated range during robustness testing.....                                                         | 99  |
| <b>TABELA 5.8.</b> Análise de variância (ANOVA) dos métodos propostos por CLAE, espectrofotometria no UV e EC para determinação de NTZ em comprimido revestido.....   | 103 |
| <b>TABELA 5.9.</b> Análise de variância (ANOVA) dos métodos propostos por CLAE, espectrofotometria no UV e EC para determinação de NTZ em pó para suspensão oral..... | 104 |

|                                                                                                                                                                                                                      |     |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| <b>TABELA 5.10.</b> Resultados da precisão da determinação da NTZ nas amostras de comprimidos e pó para suspensão oral por CLAE, espectrofotometria no UV e EC.....                                                  | 107 |
| <b>TABELA 5.11.</b> Resultados do teste de recuperação realizado em amostras de pó para suspensão e comprimidos de NTZ por CLAE, espectrofotometria no UV e EC. ....                                                 | 108 |
| <b>TABELA 6.1.</b> Photodegradation kinetics of nitazoxanide pharmaceutical formulations solutions exposed to UVC lamp.....                                                                                          | 128 |
| <b>TABELA 6.2.</b> Degradation rate constant ( $k$ ), half-life ( $t_{1/2}$ ) and $t_{90}$ for nitazoxanide in pharmaceutical formulations solutions submitted to photodegradation, and determined by LC method..... | 130 |
| <b>TABELA 6.3.</b> $^1\text{H}$ and $^{13}\text{C}$ NMR chemical shift assignments for nitazoxanide and its degradation product – PD1.....                                                                           | 143 |
| <b>TABELA 6.4.</b> Results of cell viability obtained by <i>in vitro</i> cytotoxic assay for NTZ and degraded product (PD1 – Tizoxanide) against mononuclear cells.....                                              | 147 |

## LISTA DE ABREVIATURAS

|                         |                                            |
|-------------------------|--------------------------------------------|
| CZE                     | Capillary zone electrophoresis;            |
| DAD                     | Detector de arranjo de fotodiodos;         |
| DMSO                    | Dimetilsulfóxido;                          |
| DMSO <sub>d6</sub>      | Dimetilsulfóxido deuterado;                |
| DSC                     | Calorimetria exploratória de varredura;    |
| EC                      | Eletroforese capilar;                      |
| gl                      | Graus de Liberdade;                        |
| ICH                     | International Conference on Harmonization; |
| IS                      | Internal Standard;                         |
| <i>k</i>                | velocidade de degradação;                  |
| LC                      | Liquid chromatographic;                    |
| NTZ                     | Nitazoxanida;                              |
| PI                      | Padrão interno;                            |
| SQ                      | Soma dos Quadrados;                        |
| SQR                     | Substância química de referência;          |
| <i>t</i> <sub>1/2</sub> | Tempo de meia vida;                        |
| <i>t</i> <sub>90%</sub> | Tempo com concentração 90%;                |



## SUMÁRIO

|                                                                                                                                   |    |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>1. INTRODUÇÃO</b> .....                                                                                                        | 1  |
| <b>2. OBJETIVOS</b> .....                                                                                                         | 7  |
| <b>2.1. OBJETIVO GERAL</b> .....                                                                                                  | 9  |
| <b>2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS</b> .....                                                                                           | 9  |
| <b>3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....                                                                                             | 11 |
| <b>3.1. ASPECTOS GERAIS</b> .....                                                                                                 | 13 |
| <b>3.2. NITAZOXANIDA</b> .....                                                                                                    | 14 |
| 3.2.1. Descrição.....                                                                                                             | 14 |
| 3.2.2. Mecanismo de ação.....                                                                                                     | 15 |
| 3.2.3. Aspectos farmacológicos.....                                                                                               | 16 |
| 3.2.4. Métodos de análise.....                                                                                                    | 17 |
| <b>4. CAPITULO I – ANÁLISE QUALITATIVA</b> .....                                                                                  | 21 |
| <b>4.1. INTRODUÇÃO</b> .....                                                                                                      | 23 |
| 4.1.1. Nitazoxanida – SQR.....                                                                                                    | 24 |
| 4.1.2. Produtos farmacêuticos.....                                                                                                | 24 |
| <b>4.2. CARACTERIZAÇÃO DA SQR</b> .....                                                                                           | 25 |
| 4.2.1. Análise térmica por calorimetria diferencial de varredura (DSC).....                                                       | 25 |
| 4.2.1.1. Resultados e discussão.....                                                                                              | 25 |
| 4.2.2. Espectroscopia de absorção na região do infravermelho (IV).....                                                            | 26 |
| 4.2.2.1. Resultados e discussão.....                                                                                              | 26 |
| 4.2.3. Espectroscopia de ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN <sup>1</sup> H) e de carbono (RMN <sup>13</sup> C)..... | 28 |
| 4.2.3.1. Resultados e discussão.....                                                                                              | 28 |
| 4.2.4. Espectrometria de massas (EM).....                                                                                         | 31 |
| 4.2.4.1. Resultados e discussão.....                                                                                              | 31 |
| <b>4.3. IDENTIFICAÇÃO DO FÁRMACO NAS AMOSTRAS</b> .....                                                                           | 32 |
| 4.3.1. Cromatografia em camada delgada (CCD).....                                                                                 | 32 |
| 4.3.1.1. Resultados e discussão.....                                                                                              | 33 |
| 4.3.2. Espectrofotometria na região do ultravioleta.....                                                                          | 34 |
| 4.3.2.1. Resultados e discussão.....                                                                                              | 35 |

|                                                                                        |           |
|----------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| 4.3.3. Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).....                            | 37        |
| 4.3.3.1. Resultados e discussão.....                                                   | 38        |
| 4.3.4. Eletroforese capilar (EC) .....                                                 | 39        |
| 4.3.4.1 Resultado e discussão.....                                                     | 40        |
| <b>4.4. DISCUSSÃO GERAL.....</b>                                                       | <b>42</b> |
| <b>4.5. CONCLUSÕES.....</b>                                                            | <b>43</b> |
| <b>5. CAPÍTULO II – DETERMINAÇÃO QUANTITATIVA.....</b>                                 | <b>45</b> |
| <b>5.1. INTRODUÇÃO.....</b>                                                            | <b>47</b> |
| <b>5.2. ARTIGO CIENTÍFICO CROMATOGRÁFIA LÍQUIDA DE ALTA<br/>EFICIÊNCIA - CLAE.....</b> | <b>51</b> |
| 5.2.1. Abstract.....                                                                   | 53        |
| 5.2.2. Introduction.....                                                               | 54        |
| 5.2.3. Experimental.....                                                               | 54        |
| 5.2.4. Results and discussion.....                                                     | 59        |
| 5.2.5. Conclusions.....                                                                | 65        |
| 5.2.6. Acknowledgement.....                                                            | 65        |
| 5.2.7. References.....                                                                 | 65        |
| <b>5.3. ARTIGO CIENTÍFICO ESPECTROFOTOMETRIA NO<br/>ULTRAVIOLETA - UV.....</b>         | <b>67</b> |
| 5.3.1. Abstract.....                                                                   | 69        |
| 5.3.2. Introduction.....                                                               | 70        |
| 5.3.3. Experimental.....                                                               | 71        |
| 5.3.4. Results and discussion.....                                                     | 75        |
| 5.3.5. Conclusion.....                                                                 | 79        |
| 5.3.6. Acknowledgments.....                                                            | 79        |
| 5.3.7. References.....                                                                 | 79        |
| <b>5.4. ARTIGO CIENTÍFICO ELETROFORESE CAPILAR - EC.....</b>                           | <b>83</b> |
| 5.4.1. Abstract.....                                                                   | 85        |
| 5.4.2. Introduction.....                                                               | 86        |
| 5.4.3. Experimental.....                                                               | 87        |
| 5.4.4. Results and discussion.....                                                     | 93        |
| 5.4.5. Conclusions.....                                                                | 100       |
| 5.4.6. Acknowledgments.....                                                            | 101       |

|                                                                                                                |            |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------|
| 5.4.7. References.....                                                                                         | 101        |
| <b>5.5. ANÁLISE ESTATÍSTICA COMPARATIVA DOS MÉTODOS.....</b>                                                   | <b>103</b> |
| 5.5.1. Resultados.....                                                                                         | 103        |
| 5.5.2. Discussão.....                                                                                          | 104        |
| <b>5.6. DISCUSSÃO GERAL.....</b>                                                                               | <b>104</b> |
| <b>5.7. CONCLUSÕES.....</b>                                                                                    | <b>110</b> |
| <b>6. CAPÍTULO III – ESTUDO DA ESTABILIDADE.....</b>                                                           | <b>111</b> |
| <b>6.1. INTRODUÇÃO.....</b>                                                                                    | <b>113</b> |
| <b>6.2. ARTIGO CIENTÍFICO CINÉTICA DE FOTODEGRADAÇÃO.....</b>                                                  | <b>117</b> |
| 6.2.1. Abstract.....                                                                                           | 119        |
| 6.2.2. Introduction.....                                                                                       | 120        |
| 6.2.3. Experimental.....                                                                                       | 121        |
| 6.2.4. Results and discussion.....                                                                             | 124        |
| 6.2.5. Conclusions.....                                                                                        | 130        |
| 6.2.6. Acknowledgments.....                                                                                    | 130        |
| 6.2.7. References.....                                                                                         | 130        |
| <b>6.3. ARTIGO CIENTÍFICO ELUCIDAÇÃO ESTRUTURAL E CITOTOXICIDADE DO PRODUTO DE DEGRADAÇÃO MOJORITÁRIO.....</b> | <b>133</b> |
| 6.3.1. Abstract.....                                                                                           | 135        |
| 6.3.2. Introduction.....                                                                                       | 136        |
| 6.3.3. Experimental.....                                                                                       | 138        |
| 6.3.4. Results and discussion.....                                                                             | 140        |
| 6.3.5. Conclusions.....                                                                                        | 147        |
| 6.3.6. Acknowledgments.....                                                                                    | 147        |
| 6.3.7. References.....                                                                                         | 148        |
| <b>6.4. DISCUSSÃO GERAL.....</b>                                                                               | <b>151</b> |
| <b>6.5. CONCLUSÕES.....</b>                                                                                    | <b>154</b> |
| <b>7. REFERÊNCIAS.....</b>                                                                                     | <b>155</b> |









A helmintíase e a diarreia infecciosa causada por infecções parasitárias intestinais estão entre os principais motivos de mortalidade e morbidade no mundo atualmente. Segundo a Organização Mundial da Saúde, bilhões de pessoas são portadoras de parasitas intestinais e muitas estão doentes, como conseqüências dessas infecções, sendo que milhares de mortes estão associadas com diarreia a cada ano. No Brasil, a diarreia infecciosa é responsável por um elevado número de mortes em crianças, sendo muitas destas decorrentes de diarreia persistente causada por protozoários patogênicos. Estas infecções geralmente são contraídas pela via oro-fecal, através de água, alimentos e de pessoa para pessoa e, quando não resolvidas ou tratadas em tempo, podem causar complicações mais sérias e até a morte, particularmente em crianças, idosos ou pessoas com o sistema imune debilitado. Além disso, apresentam efeito deletério no estado nutricional e imunológico da população, pediátrica em sua maioria, ocasionando distúrbios relacionados ao desenvolvimento físico e mental dos pacientes. Sendo assim, justifica-se a relevante importância do estudo das parasitoses intestinais nas questões de saúde pública devido à sua alta prevalência, principalmente em países em desenvolvimento, e a diversos surtos ocorridos em países desenvolvidos (GILLES e HOFFMAN, 2002; CIMERMAN *et al.*, 2003; WHITE, 2004; FOX e SARAVOLATZ, 2005; FARTHING e KELLY, 2007; GEARY *et al.*, 2010; ROSSIGNOL, 2010).

Passaram-se aproximadamente três décadas após a introdução dos nitroimidazóis e benzimidazóis, sem inovações importantes para o tratamento das infecções parasitárias. Somente no final do ano de 2002 o órgão americano Food and Drug Administration (FDA) aprovou para o consumo a nitazoxanida (NTZ), considerado um fármaco inovador e notável no tratamento dessas moléstias (GILLES e HOFFMAN, 2002; WHITE, 2003; FOX e SARAVOLATZ, 2005; ROSSIGNOL, 2010). Nos Estados Unidos, encontra-se comercializado pelo laboratório Romark Pharmaceuticals nas formas de pó para suspensão oral (20 mg/ml) e comprimido revestido (500 mg), sob o nome comercial de Alinia<sup>®</sup>. No Brasil, passou a ser comercializado somente no final do ano de 2006 pelo laboratório Farmoquímica nas mesmas formas farmacêuticas e concentrações do produto americano, sob o nome comercial de Annita<sup>®</sup>.

O crescente progresso tecnológico da indústria farmacêutica, produzindo novos medicamentos para atender às necessidades de uma grande parcela da população, faz com que ela atue no mercado mundial como uma grande potência.

A evolução tecnológica no desenvolvimento e produção de medicamentos exige o cumprimento de diretrizes regulamentadas para evitar e prevenir os riscos na qualidade e segurança dos produtos. A garantia da qualidade é um importante aspecto a ser considerado desde o projeto até a liberação do produto ao consumidor. Os órgãos oficiais exigem que as empresas produtoras realizem ensaios de controle de qualidade em todas as fases do processo de fabricação. Estas normas são dinâmicas e devem ser atualizadas para acompanhar a evolução tecnológica dos processos, novos equipamentos e gerenciamento da qualidade.

Neste contexto, o controle de qualidade é uma das áreas das ciências farmacêuticas de grande importância, pois é responsável pela avaliação de inúmeras propriedades que conferem a qualidade das preparações farmacêuticas. Possui atuação no desenvolvimento e validação de metodologias analíticas para fármacos, no estudo da estabilidade de formulações, na análise de produtos de degradação e na padronização de procedimentos de produção.

A análise de fármacos é necessária nas diversas fases de desenvolvimento farmacêutico, tais como estudos de formulação e estabilidade, controle de qualidade e em testes farmacológicos e toxicológicos realizados em animais e humanos. A falta de métodos confiáveis de avaliação da qualidade dos produtos farmacêuticos limita a eficiência dos programas de validação e da vigilância desses produtos (MEHTA, 1997; SWARTZ e KRULL, 1998).

Atualmente, existe grande variedade de métodos analíticos que podem ser utilizados no controle de qualidade de rotina. No entanto, a sua escolha deve ser feita de maneira criteriosa, levando-se em conta os objetivos da análise a ser efetuada, bem como o propósito do método, ou seja, qualitativo, semi-quantitativo ou quantitativo. A identidade e pureza da amostra a ser analisada, o grau de precisão e exatidão a serem obtidos, a disponibilidade de reagentes e equipamento, e o custo total da análise são fatores que também devem ser considerados (MEHTA, 1997; SWARTZ e KRULL, 1998).

De acordo com os conceitos internacionais, um medicamento deve ser eficaz, seguro e ter as características de qualidade conforme definido no registro. Por isso, os estudos de estabilidade são considerados necessários para avaliar a capacidade de um produto farmacêutico manter suas propriedades físicas, químicas, microbiológicas e terapêuticas até o término de seu prazo de validade, em uma determinada formulação com embalagem específica e sistema fechado (KOMMANABOYNA e RHODES, 1999).

Até o presente, a NTZ não possui monografia em nenhum código oficial e existem poucos métodos na literatura para determinação quantitativa, sendo que alguns, com características que dificultam sua aplicação no controle de qualidade de rotina. Verificaram-se, também, poucos estudos publicados sobre sua estabilidade na literatura científica consultada.

Face ao exposto, justifica-se desenvolver e validar métodos simples e exequíveis para avaliar a qualidade da NTZ em formas farmacêuticas, bem como estudar a estabilidade dessa substância ativa, com o propósito de isolar e identificar os produtos de degradação majoritários obtidos em diferentes condições de armazenamento.

Justifica-se, também, o fato do presente trabalho vir a contribuir na hipótese do surgimento de medicamentos similares ou genéricos desse fármaco, pois até a presente data a NTZ é comercializada somente por um laboratório no Brasil.



---

## **2. OBJETIVOS**

---





## 2.1. OBJETIVO GERAL

Desenvolver e validar métodos analíticos para análise qualitativa e quantitativa de NTZ nas formas farmacêuticas comercializadas e avaliar a estabilidade do fármaco.

## 2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Caracterizar a SQR de NTZ por técnicas espectrais e termoanalíticas;
- Desenvolver métodos qualitativos para identificação de NTZ em produto acabado por técnicas cromatográficas e espectrais;
- Desenvolver e validar método por espectrofotometria na região do ultravioleta para determinação quantitativa de NTZ;
- Desenvolver e validar método por cromatografia líquida para determinação quantitativa de NTZ;
- Desenvolver e validar método por eletroforese capilar para determinação quantitativa de NTZ;
- Realizar estudo comparativo dos métodos propostos;
- Avaliar a estabilidade do fármaco nas formas farmacêuticas;
- Isolar e identificar os produtos de degradação majoritários das formas farmacêuticas armazenadas em condições forçadas;
- Comparar a citotoxicidade *in vitro* do produto de degradação majoritário com a nitazoxanida.



---

### **3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

---



### 3.1. ASPECTOS GERAIS

As infecções parasitárias intestinais representam um problema de saúde pública mundial, de difícil solução. Parasitas como *Ascaris lumbricoides*, *Trichuris trichiura* e *ancilostomídeos* acometem cerca de um bilhão de pessoas, distribuindo-se globalmente por mais de 150 países e territórios, além de apresentar alta prevalência na população infantil. Estimativas recentes indicam que as infecções helmínticas são a causa básica de todas as doenças que afligem 12,3% dos meninos e 11,4% das meninas em países em desenvolvimento (MACEDO, 2005; MACEDO *et al.*, 2008). Além do mais, a gravidade destas parasitoses parece estar crescendo devido ao aumento da resistência aos fármacos que as combatem e ao número crescente de hospedeiros susceptíveis, sobretudo portadores de HIV e imunodebilitados (ZULU *et al.*, 2005; MACEDO *et al.*, 2008; GEARY, *et al.*, 2010).

No continente americano, estima-se que cerca de 200 milhões de pessoas estejam infectadas por algum tipo de parasita intestinal, ocorrendo cerca de dez mil óbitos a cada ano devido somente ao parasitismo por helmintos intestinais (MACEDO, 2005). No Brasil, em função das diferenças regionais, a contaminação do ambiente é intensa em determinadas regiões, e a prevalência de parasitoses intestinais é elevada principalmente nas regiões norte e nordeste em função, sobretudo, de saneamento básico deficiente, de precária educação sanitária da população associada ao baixo nível de renda e qualidade dos serviços de saúde (MACHADO *et al.*, 1999; FERRARI e RODRIGUEZ, 2004; MELO *et al.*, 2004).

A sintomatologia destas infecções parasitárias apresenta ampla variabilidade, e para o seu diagnóstico é preconizado basicamente o exame protoparasitológico: exame parasitológico de fezes; eventualmente podem ser utilizados tamização, *swab* anal, intradermorreação, biópsias e, raramente, o diagnóstico é realizado durante procedimentos cirúrgicos com visualização ou palpação de parasitas ou de suas complicações e pelo exame histopatológico de peças cirúrgicas (MACEDO *et al.*, 2008). Entre as complicações cirúrgicas intestinais causadas por estes vermes, pode-se citar: apendicite aguda, oclusão intestinal, enterite, necrose, perfuração e peritonite. Migrando para outros órgãos abdominais podem desencadear abscessos

hepáticos, colangite, colecistite, pancreatite, infecções ginecológicas e urinárias (FERRARI e RODRIGUEZ, 2004).

As infecções parasitárias intestinais refletem as condições de vida de diferentes comunidades com boa margem de segurança. Elas ocorrem com intensidades variáveis devido a expressivos fatores exemplificados, sobretudo por saneamento básico, educação para a saúde, habitação e higiene alimentar. Esses fatores, quando são satisfatórios, coíbem a expansão dessas parasitoses (CHIEFFI e NETO, 2003)

A elevada prevalência das parasitoses intestinais na população infantil, especialmente na idade escolar, além de desencadear problemas gastrintestinais, consiste em um fator agravante da subnutrição, promovendo baixo crescimento pômbero-estrutural e consequentes baixo rendimento escolar, incapacitação física e intelectual (MACEDO, 2005; MACEDO *et al.*, 2008; FARTHING e KELLY, 2007).

Consequentemente, há uma necessidade urgente de agentes que venham combater estes parasitas de uma forma eficiente, mas que apresentem, também, baixo potencial de desenvolvimento de novos mecanismos de resistência. A NTZ, um novo nitrotiazol de amplo espectro, foi lançado em 2002 como um fármaco inovador no tratamento de infecções parasitárias intestinais, sendo responsável por combater não somente helmintíases, como também, infecções causadas por protozoários.

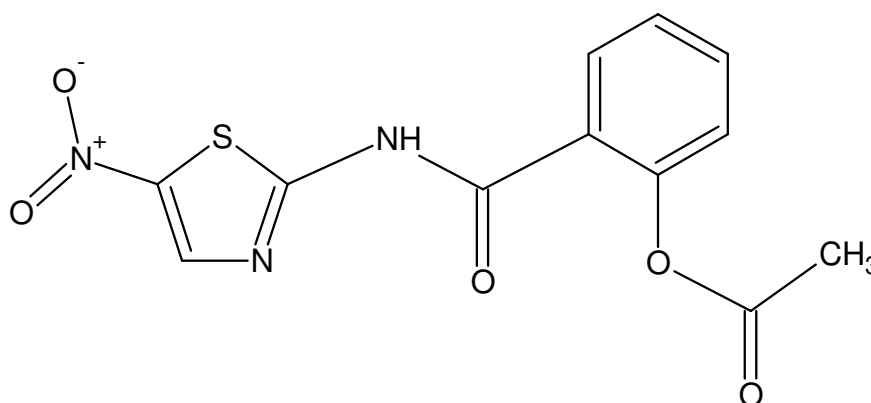
## **3.2. NITAZOXANIDA**

### **3.2.1. Descrição**

A NTZ (Figura 3.1) é uma nitrotiazolil-salicilamida e apresenta as seguintes características (THE MERCK Index, 2000):

- Aspecto: pó cristalino levemente amarelado;
- Nome químico: 2-acetiloxi-*N*-(5-nitro-2-tiazolil) benzamida

- Fórmula molecular:  $C_{12}H_9N_3O_5S$ ;
- Massa molecular: 307,3;
- Denominação Comum Internacional (DCI): nitazoxanide;
- Denominação Comum Brasileira (DCB): nitazoxanida;
- Registro no Chemical Abstracts (CAS): [55981-09-4];
- Ponto de fusão: 202 °C
- Solubilidade: praticamente insolúvel em água, pouco solúvel em etanol, mas solúvel em acetonitrila;



**FIGURA 3.1.** Estrutura química da nitazoxanida.

### 3.2.2. Mecanismo de ação

Recentes estudos com protozoários anaeróbios (*Trichomonas vaginalis* e *Entamoeba histolytica*) e com bactérias anaeróbias ou microaerófilas (*Clostridium perfringens* e *Helicobacter pylori*) têm demonstrado que NTZ inibe uma enzima fundamental para o metabolismo energético destes organismos: a piruvato ferredoxina oxireductase, vital para o metabolismo energético de alguns destes organismos. Diferente de outros compostos nitroimidazólicos quimicamente semelhantes, a NTZ independe da ferredoxina reduzida, isto é, interage diretamente com a piruvato ferredoxina oxireductase. Este mecanismo de ação específico pode

explicar a eficácia terapêutica da NTZ contra organismos resistentes a 5-nitroimidazóis, como o caso do *Trichomonas vaginalis* ao metronidazol. Com relação aos helmintos, seu mecanismo de ação ainda não está completamente elucidado, mas enzimas envolvidas no transporte de elétrons parecem ser os potenciais sítios de ligação (RAETHER e HÄNEL, 2003; GILLES e HOFFMAN, 2002).

### **3.2.3. Aspectos farmacológicos**

A NTZ é considerada um fármaco de amplo espectro, principalmente contra protozoários e helmintos. Estudos *in vitro* demonstram atividade antibacteriana contra diversas bactérias aeróbicas e anaeróbicas e, também, atividade antiviral contra o vírus da hepatite B e C e o rotavírus. No caso dos vírus, alguns autores sugerem que o fármaco impede a replicação viral através de uma inibição protéica ainda não identificada (GILLES e HOFFMAN, 2002; FOX e SARAVOLATZ, 2005; ESPOSITO *et al.*, 2006; ESPOSITO *et al.*, 2007; KORBA *et al.*, 2007; SANTORO *et al.*, 2007; SARRAZIN e ZEUZEM, 2010).

Estudos farmacocinéticos demonstram que a NTZ é absorvida no trato gastrointestinal. No sangue é total e rapidamente hidrolisada pelas esterases do plasma ao derivado desacetilado, a tizoxanida, que é posteriormente glucoronizada no metabólito chamado tizoxanida glucoronida. A tizoxanida e seu metabólito glucoronizado são ativos, possuem amplo volume de distribuição, com ligação às proteínas plasmáticas em torno de 99%, e meia vida de eliminação de aproximadamente 1,5 horas, após a administração oral de NTZ. As taxas de absorção ou níveis plasmáticos não sofrem influência significativa na ingestão simultânea de alimentos. A tizoxanida é excretada na urina, bile e fezes, e seu conjugado glicuronizado na urina e bile. Não foram realizados estudos da farmacocinética em crianças com menos de um ano e pacientes com função renal e/ou hepática prejudicada (RAETHER e HÄNEL, 2003; WHITE, 2003; FOX e SARAVOLATZ, 2005; ZHAO *et al.*, 2008a; ZHAO *et al.*, 2008b).

Estudos realizados demonstraram não ocorrer reações adversas ao fármaco ou interações com outros medicamentos. O acompanhamento de seiscentos pacientes tratados com NTZ não evidenciou descontinuidade da terapia com o



fármaco devido a efeitos adversos (CIMERMAN *et al.*, 2003; FOX e SARAVOLATZ, 2005).

### 3.2.4. Métodos de análise

Na literatura científica, alguns autores descrevem a atividade antimicrobiana *in vitro* da NTZ, para bactérias anaeróbicas e aeróbicas, avaliada mediante a determinação de suas concentrações inibitórias mínimas, através do método de difusão em ágar (DUBREUIL *et al.*, 1996; ROSSIGNOL e STACHULSKI, 1999; WHITE, 2004). Outras publicações relatam estudos *in vitro* da atividade antiparasitária do fármaco, avaliada pela concentração inibitória frente a uma ampla gama de protozoários e vírus (ADAGU *et al.*, 2002; CEDILLO-RIVERA *et al.*, 2002; WHITE, 2004; ESPOSITO *et al.*, 2006; ESPOSITO *et al.*, 2007; KORBA *et al.*, 2007; SANTORO *et al.*, 2007).

Alguns estudos relatam a determinação quantitativa da NTZ e seus metabólitos em fluídos biológicos, utilizando cromatografia líquida com detecção por espectrofotometria no ultravioleta e acoplada a espectrômetro de massas. As condições analíticas podem ser observadas na Tabela 3.1 (STOCKIS *et al.*, 1996; BROEKHUYSEN *et al.*, 2000; ZHAO *et al.*, 2008a; ZHAO *et al.*, 2008b).

**TABELA 3.1.** Condições analíticas utilizadas por alguns autores para determinação de NTZ em fluídos biológicos por cromatografia líquida.

| Parâmetro          | STOCKIS <i>et al.</i> , 1996                | BROEKHUYSEN <i>et al.</i> , 2000          | ZHAO <i>et al.</i> , 2008a e 2008b            |
|--------------------|---------------------------------------------|-------------------------------------------|-----------------------------------------------|
| Fase móvel         | acetonitrila – tampão fosfato 0,02 M pH 2,5 | ácido fórmico 10 mM – acetonitrila        | acetonitrila – acetato de amônio 10 mM pH 2,5 |
| Sistema de eluição | gradiente linear 10 – 35% de acetonitrila   | gradiente linear 10 – 90% de acetonitrila | gradiente linear de 30 – 70% de ACN           |
| Coluna             | C <sub>18</sub> (100 x 4,6 mm, 5 µm)        | C <sub>18</sub> (100 x 4,6 mm, 5 µm)      | C <sub>8</sub> (150 x 2,1 mm, 3,5 µm)         |
| Detecção           | UV – 360 nm                                 | EM                                        | EM/EM                                         |

Para a determinação quantitativa de NTZ em matéria-prima e formas farmacêuticas também existem poucos métodos publicados na literatura científica consultada. KAPSE e colaboradores (2006) desenvolveram e validaram métodos por espectrofotometria no UV-Vis para determinação de NTZ em matéria-prima e comprimidos. Os métodos foram baseados na redução do grupo nitro da molécula, com zinco em meio ácido, à amina primária. A forma reduzida do fármaco realiza uma reação de condensação com p-dimetilaminobenzaldeído, p-dimetilaminocinamaldeído e vanilina, formando cromóforos coloridos com absorção em 559, 534 e 475 nm.

GOPU e colaboradores (2007) descreveram método indicativo da estabilidade para determinação de NTZ em matéria-prima e comprimidos por cromatografia em camada delgada de alto desempenho. Os autores empregaram cromatoplasmas de gel de sílica 60F-254, sistema eluente composto de acetato de etila – tolueno – metanol (4:6:1, V/V/V) e detecção densitométrica. O método apresentou linearidade, precisão, exatidão, robustez e especificidade. As condições de degradação utilizadas foram hidrólise neutra (água, 70 °C, 2 h), ácida (HCl 0,1 M, 50 °C, 30 min) e alcalina (NaOH 0,1 M, temperatura ambiente, 30 min), degradação oxidativa (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 3%, temperatura ambiente, 3 h), térmica (80 °C, 2 h) e fotolítica (luz solar, 2 dias). Segundo os autores, o método apresentou a característica de determinar a NTZ na presença dos produtos de degradação obtidos nas diferentes condições testadas, podendo ser empregado como indicativo da estabilidade.

NARAYAN & MAHENDRA (2007) desenvolveram método por cromatografia líquida para determinação quantitativa de NTZ em formas farmacêuticas. Os autores utilizaram fase móvel composta por sulfato de tetrabutilamônio 5 mM e acetonitrila (35:65, V/V), vazão de 1.0 ml/min, coluna cromatográfica com empacotamento de octadecilsilano (250 mm x 4,6 mm, 5 µm) e detecção em 240 nm.

JADHAV e colaboradores (2007) desenvolveram método indicativo da estabilidade por cromatografia líquida para determinação do fármaco em matéria-prima. As condições cromatográficas utilizadas pelos autores foram coluna de octadecilsilano (250 mm x 4,6 mm, 5 µm) e fase móvel composta por sulfato de tetrabutilamônio 5 mM e acetonitrila (45:55, V/V) e vazão de 1.0 ml/min. O detector utilizado foi de arranjo de fotodiodos (240 nm). Os produtos de degradação foram

obtidos por degradação forçada da NTZ frente à hidrólise ácida (HCl 0,1 M, temperatura ambiente, 48 h), alcalina (NaOH 0,1 M, temperatura ambiente, 48 h) e neutra (água, temperatura ambiente, 48 h), degradação oxidativa (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 10%, temperatura ambiente, 48 h), térmica (60 °C, 10 dias) e fotolítica (luz solar, 10 dias). Segundo os autores, o método desenvolvido e validado foi capaz de determinar o fármaco na presença de produtos de degradação e impurezas de síntese.

A quantificação de NTZ em matéria-prima e comprimidos, em presença de produtos de degradação, também foi descrita por RANE e colaboradores (2008). A degradação do fármaco ocorreu com a exposição da matéria-prima sob condições ácidas (HCl 0,5 M, 25 °C, 48 h), alcalinas (NaOH 0,1 M, 25 °C, 1 h), oxidativas (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 30%, 25 °C, 48 h), fotolíticas (luz UV em 254 e 360 nm, 25 °C, 10 dias) e degradação térmica (80 °C, 24 h). Nas condições testadas, verificou-se que não ocorreu degradação do fármaco na forma de pó sob condições fotolíticas e degradação térmica, mas se observou extensa degradação em condições oxidativas, ácidas e alcalinas. A separação ocorreu utilizando fase móvel composta por uma mistura de acetato de amônio 50 mM pH 5,5 e acetonitrila (55:45, V/V), vazão de 1 ml/min, coluna de octadecilsilano (250 mm x 4,6 mm, 5 µm) e detecção em 240 nm.

KALTA e colaboradores (2008) desenvolveram método por cromatografia líquida para determinação quantitativa de NTZ e ofloxanico em comprimidos. Utilizaram fase móvel composta por fosfato de potássio dibásico anidro 0,25 M e acetonitrila (20:80, V/V) com 0,25 % (V/V) de trietilamina, pH 2,5 ajustado com ácido fosfórico, vazão de 1.0 ml/min, coluna cromatográfica com empacotamento de octadecilsilano (250 mm x 4,6 mm, 5 µm) e detecção em 320 nm. RANE & SHINDE (2009) também desenvolveram método por cromatografia líquida para determinação quantitativa de NTZ e ofloxanico em comprimidos. Utilizaram fase móvel composta por fosfato de potássio dibásico anidro 10 mM e acetonitrila (65:35, V/V) pH 7,0, vazão de 1.0 ml/min, coluna cromatográfica com empacotamento de octadecilsilano (250 mm x 4,6 mm, 5 µm) e detecção em 254 nm.

A comparação das condições analíticas dos diferentes métodos utilizados para quantificação da NTZ por cromatografia líquida, citados anteriormente, pode ser visualizada na Tabela 3.2.

**TABELA 3.2.** Condições analíticas utilizadas por alguns autores para determinação de NTZ em diferentes formas farmacêuticas por cromatografia líquida.

| Condição                          | NARAYAN & MAHENDRA 2007                                | JADHAV <i>et al.</i> , 2007                           | RANE <i>et al.</i> , 2008                             | KALTA <i>et al.</i> , 2008                                                                 | RANE & SHINDE, 2009                                                 |
|-----------------------------------|--------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------|
| <b>Fase móvel</b>                 | sulfato de tetrabutilamônio 5 mM: acetonitrila (35:65) | sulfato de tetrabutilamônio 5 mM: acetonitril (45:55) | acetato de amônio 50 mM pH 5,5: acetonitrila (55:45,) | K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 0,25 M: acetonitrila (20:80) + 0,25 % trietilamina, pH 2,5 | K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 10 mM e acetonitrila (65:35) pH 7,0 |
| <b>Coluna</b>                     | C <sub>18</sub> (250 x 4,6 mm, 5 µm)                   | C <sub>18</sub> (250 x 4,6 mm, 5 µm)                  | C <sub>18</sub> (250 x 4,6 mm, 5 µm)                  | C <sub>18</sub> (250 x 4,6 mm, 5 µm)                                                       | C <sub>18</sub> (250 x 4,6 mm, 5 µm)                                |
| <b>Vazão</b>                      | 1,0 ml/min                                             | 1,0 ml/min                                            | 1,0 ml/min                                            | 1,0 ml/min                                                                                 | 1,0 ml/min                                                          |
| <b>Sistema de eluição</b>         | Isocrático                                             | Isocrático                                            | Isocrático                                            | Isocrático                                                                                 | Isocrático                                                          |
| <b>Detecção</b>                   | UV (240 nm)                                            | PDA (240 nm)                                          | PDA (240 nm)                                          | UV (320 nm)                                                                                | UV (254 nm)                                                         |
| <b>Aplicação</b>                  | Comprimido e pó para suspensão oral                    | Matéria-prima                                         | Matéria-prima e comprimido                            | NTZ e ofloxacino em comprimido                                                             | NTZ e ofloxacino em comprimido                                      |
| <b>Indicativo da estabilidade</b> | Não                                                    | Sim                                                   | Sim                                                   | Não                                                                                        | Não                                                                 |

SAKAMOTO & HIYAMA (2008) publicaram estudo que relata a determinação quantitativa de NTZ em comprimidos. Os métodos utilizados foram a cromatografia líquida de alta eficiência e a cromatografia líquida de ultra eficiência (UPLC). Os métodos propostos não apresentaram diferença significativa.

Não foram encontrados trabalhos relatando estudos de estabilidade da nitazoxanida, no que diz respeito a isolamento e identificação de produtos de degradação e, até o presente momento, o fármaco não possui monografia em códigos oficiais.

---

## **4. CAPÍTULO I – ANÁLISE QUALITATIVA**

---



## 4.1. INTRODUÇÃO

O desenvolvimento de um método analítico depende de diversos fatores para oferecer resultados apropriados. Dentre esses, a substância utilizada como referência constitui-se em fator principal. Neste sentido, a pureza da substância química de referência (SQR) é essencial para a validação de métodos analíticos. De acordo com o FDA (1997), existem duas categorias de SQR: compendiais, as quais são obtidas de fontes como Farmacopéia Americana (USP) e Farmacopéia Brasileira que não necessitam de caracterização posterior e as não compendiais, que são aquelas com elevado teor de pureza, mas que devem ser cuidadosamente caracterizadas para garantir sua identidade, potência e pureza (SWARTZ e KRULL, 1998).

A SQR de NTZ utilizada neste trabalho é classificada como não compendial, assim foi realizada sua caracterização.

Métodos adequados de identificação são muito importantes, pois permitem caracterizar a substância utilizada como referência. No presente estudo, utilizaram-se análises por calorimetria exploratória diferencial (DSC) e espectroscópicas, tais como: espectrometria de massas, ressonância magnética nuclear de hidrogênio e de carbono e espectrofotometria no infravermelho.

A identificação de fármacos em produtos acabados é de fundamental importância no controle de qualidade dos mesmos. Há vários métodos e técnicas analíticas para identificação de substâncias, os quais são escolhidos avaliando desde fatores referentes à substância (propriedades químicas, físicas e biológicas) como também do método (disponibilidade, simplicidade, viabilidade financeira, adequação técnica, dentre outros). Neste estudo, foram aplicadas técnicas como a cromatografia em camada delgada (CCD), a espectrofotometria na região do UV, a cromatografia líquida de alta eficiência e a eletroforese capilar. Em todas as técnicas utilizadas a identificação da NTZ presente nas amostras foi realizada pela comparação com a SQR.

#### **4.1.1. Nitazoxanida – SQR**

SQR de NTZ, com teor declarado de 99,53%, foi gentilmente doado por Shin Yang–Hangzhou Shinyang Samwoo Fine Chemical CO., LTD., China.

#### **4.1.2. Produtos farmacêuticos**

a) Pó para suspensão oral na concentração final, após diluição, de 20 mg/ml de nitazoxanida, com o nome comercial de Annita<sup>®</sup>, fabricados pela Farmoquímica S/A.

Excipientes: benzoato de sódio, açúcar granulado, goma xantana, avicel, ácido cítrico, citrato de sódio diidratado, corante vermelho nº 33, aroma de morango.

b) Pó para suspensão oral na concentração final, após diluição, de 20 mg/ml de nitazoxanida, com o nome comercial de Alinia<sup>®</sup>, fabricados pela Romark Laboratories – USA.

Excipientes: benzoato de sódio, açúcar granulado, goma xantana, avicel, ácido cítrico anidro, citrato de sódio diidratado, corante vermelho FD&C #40, aroma natural de morango, celulose microcristalina, carboximetilcelulose, goma acácia, xarope de açúcar.

c) Comprimidos de nitazoxanida revestidos, na dose de 500 mg, com o nome comercial de Annita<sup>®</sup>, fabricado pela Farmoquímica S/A.

Excipientes: amido, amido de milho pré-gelatinizado, açúcar granulado, primogel, hidroxipropilmetilcelulose, água purificada, talco, estearato de magnésio, eudragit, eudracolor amarelo, álcool isopropílico, acetona.

d) Comprimidos de nitazoxanida revestidos, na dose de 500 mg, com o nome comercial de Nixoran<sup>®</sup>, fabricado pela Roemmers – Argentina.

Excipientes: amido de milho, dióxido de titânio, amido pré-gelatinizado, hidroxipropilmetilcelulose, amido glicolato de sódio, talco, estearato de magnésio, triacetina, óxido de ferro amarelo, polietilenoglicol 6000.



## 4.2. CARACTERIZAÇÃO DA SQR

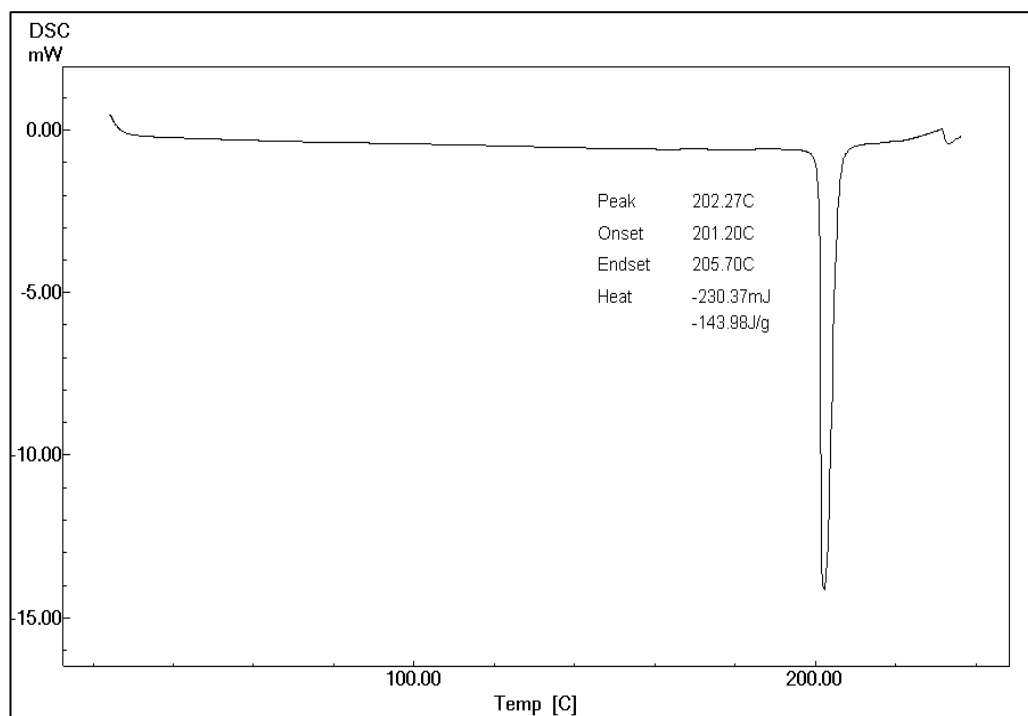
### 4.2.1. Análise térmica por calorimetria diferencial de varredura (DSC)

As análises foram realizadas em calorímetro diferencial exploratório por fluxo de calor, Shimadzu DSC-60, dotado de controlador de fluxo para gás de purga (N<sub>2</sub>) FC-60-A, integrador TA-60WS e software de controle e análise TA-60 versão 2.0.

Para realizar o ensaio, transferiu-se 1,0 mg de NTZ para porta-amostra de alumínio com capacidade de 4 µl, o qual foi selado e colocado no calorímetro. A rampa de aquecimento utilizada foi de 5 °C/minuto.

#### 4.2.1.1. Resultados e discussão

Os valores da faixa de fusão e a curva de aquecimento obtida a partir da determinação por DSC para NTZ SQR estão apresentados na Figura 4.1.



**FIGURA 4.1.** Curva de aquecimento obtida por DSC para a NTZ.

Essa técnica compara e avalia diferenças no fluxo de calor entre amostra em branco (porta-amostra selado vazio) e a substância em análise enquanto ambas são submetidas a um programa de elevação controlada da temperatura.

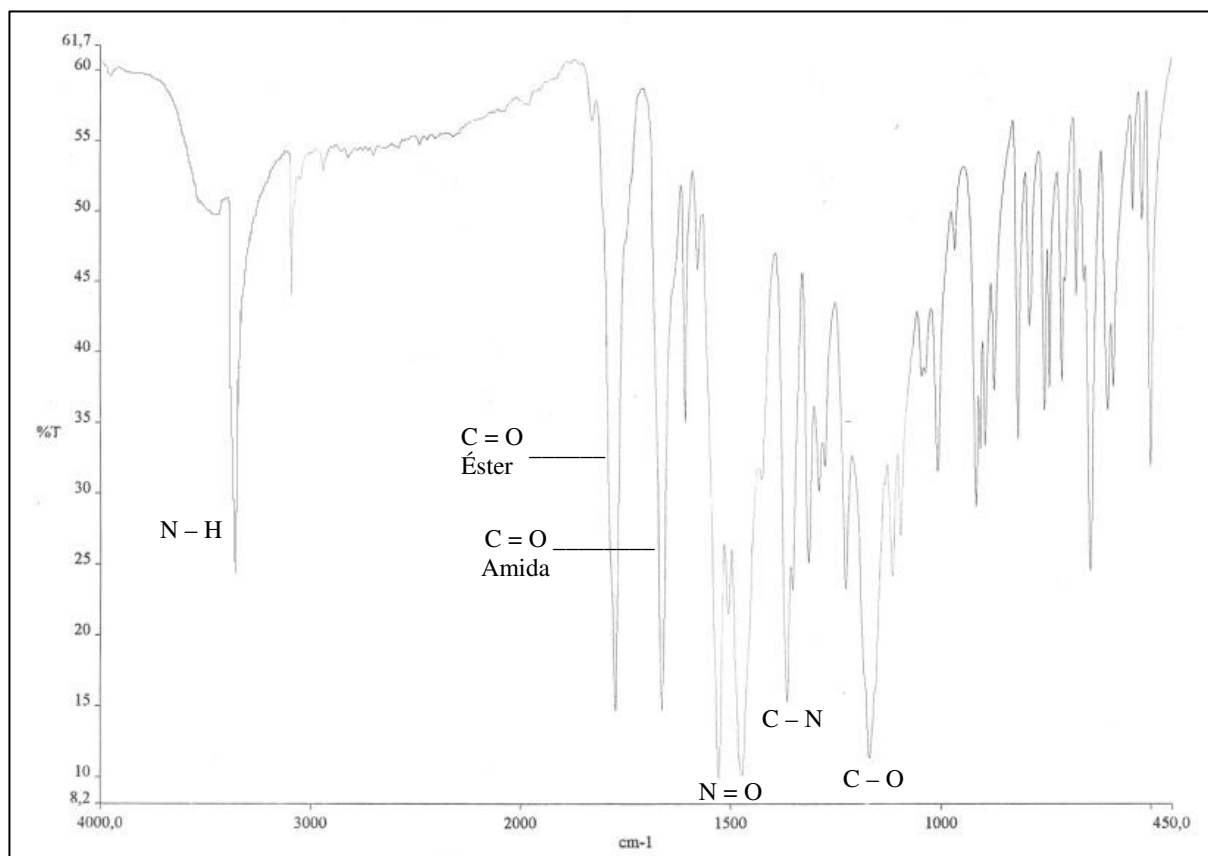
A faixa de fusão obtida para a NTZ SQR mostrou-se adequada (201,2 °C a 205,7 °C) em relação ao encontrado na literatura, com início da fusão em 201,2°C e pico em 202,3°C (THE MERCK Index, 2000). A curva de aquecimento pode ser utilizada como um indicativo de pureza, ou seja, apresentou um sinal estreito, afilado, sem deformações e sem a presença de outros sinais. Os resultados obtidos servem como indicadores de identidade e pureza do fármaco, quando seus resultados são analisados, paralelamente, com outros testes de identificação e pureza.

#### **4.2.2. Espectroscopia de absorção na região do infravermelho (IV)**

A caracterização da NTZ SQR por espectrofotometria na região do IV foi efetuada através da preparação de uma pastilha contendo 1,5 mg do fármaco e 150 mg de brometo de potássio (KBr). As análises foram realizadas em espectrofotômetro FTIR, marca Shimadzu, modelo 8001.

##### **4.2.2.1. Resultados e discussão**

O espectro na região do IV da NTZ SQR em pastilha de KBr, na faixa de 450 a 4000  $\text{cm}^{-1}$ , está apresentado na Figura 4.2.



**FIGURA 4.2.** Espectro de absorção na região do IV da NTZ SQR em pastilhas de KBr.

As atribuições das principais frequências de cada banda de absorção, características à estrutura química da NTZ, estão apresentadas na Tabela 4.1.

**TABELA 4.1.** Frequências de absorção das principais bandas do espectro na região do IV da NTZ SQR e suas respectivas atribuições (PAVIA *et al.*, 2001; SILVERSTEIN e WEBSTER, 2000).

| Frequência (cm <sup>-1</sup> ) | Atribuição                                      |
|--------------------------------|-------------------------------------------------|
| 3350                           | Deformação axial N–H da amida                   |
| 1770                           | Deformação axial C=O de éster                   |
| 1650                           | Deformação axial C=O de amida                   |
| 1550 - 1450                    | Deformação axial assimétrica de NO <sub>2</sub> |
| 1350                           | Deformação axial C–N                            |
| 1150                           | Deformação axial simétrica C–O de éster         |

O espectro obtido para NTZ SQR apresenta bandas de absorção características dos grupamentos presentes na estrutura química da molécula. Contudo, a ausência de espectro de referência na literatura não permite uma confirmação da identidade do fármaco, considerando somente essa técnica.

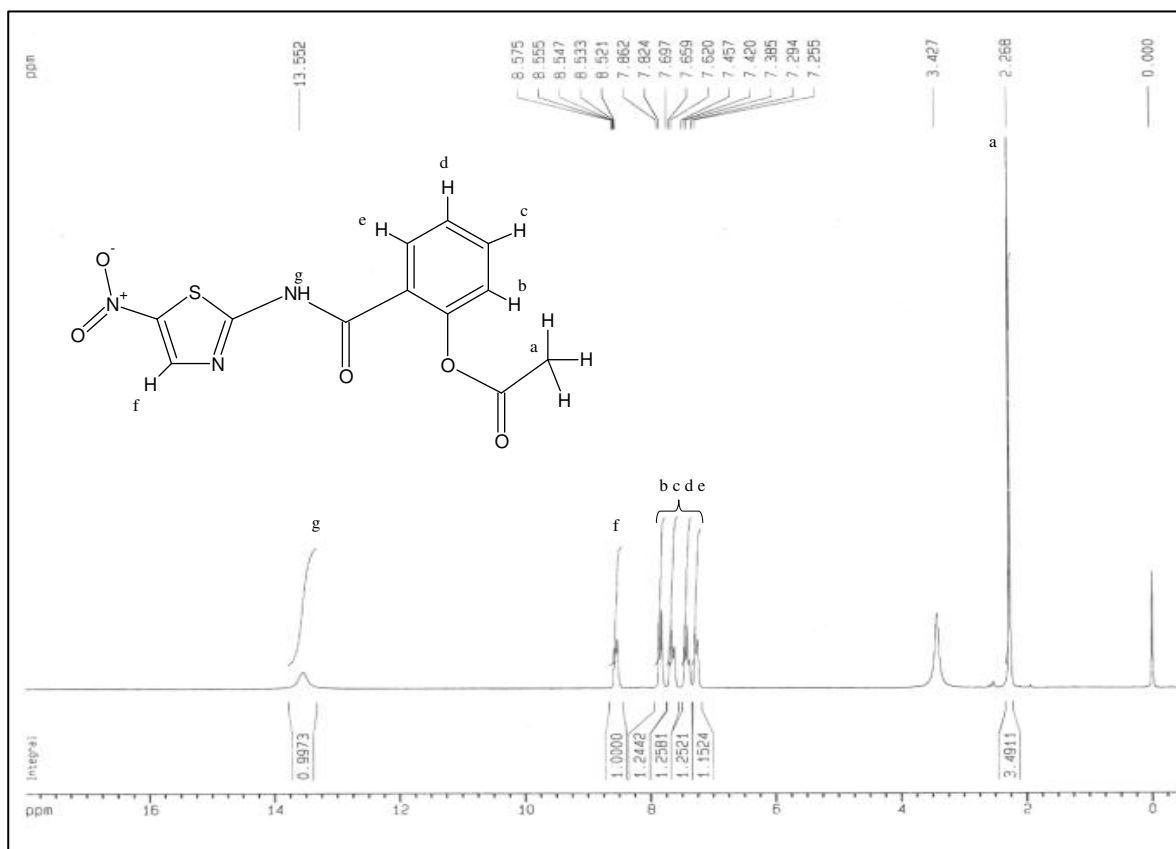
O espectro de IV é único para cada substância, sendo pouco provável que duas substâncias que não sejam enantiômeras, apresentem o mesmo espectro nesta região. A análise das bandas características de determinados grupos nos fornece informações importantes para a identificação da estrutura de moléculas, porém deve ser utilizado em conjunto com outros dados espectrais para uma análise qualitativa mais completa (SILVERSTEIN e WEBSTER, 2000).

#### **4.2.3. Espectroscopia de ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN $^1\text{H}$ ) e de carbono (RMN $^{13}\text{C}$ )**

Os espectros de RMN  $^1\text{H}$  e de RMN  $^{13}\text{C}$  da NTZ SQR foram obtidos em espectrômetro Brucker modelo DPX de 200 MHz para hidrogênio e para carbono, utilizando dimetilsulfóxido deuterado ( $\text{DMSO}_{d6}$ ) como solvente.

##### **4.2.3.1. Resultados e discussão**

O espectro de RMN  $^1\text{H}$  da NTZ SQR, bem como sua estrutura química, estão apresentados na Figura 4.3.



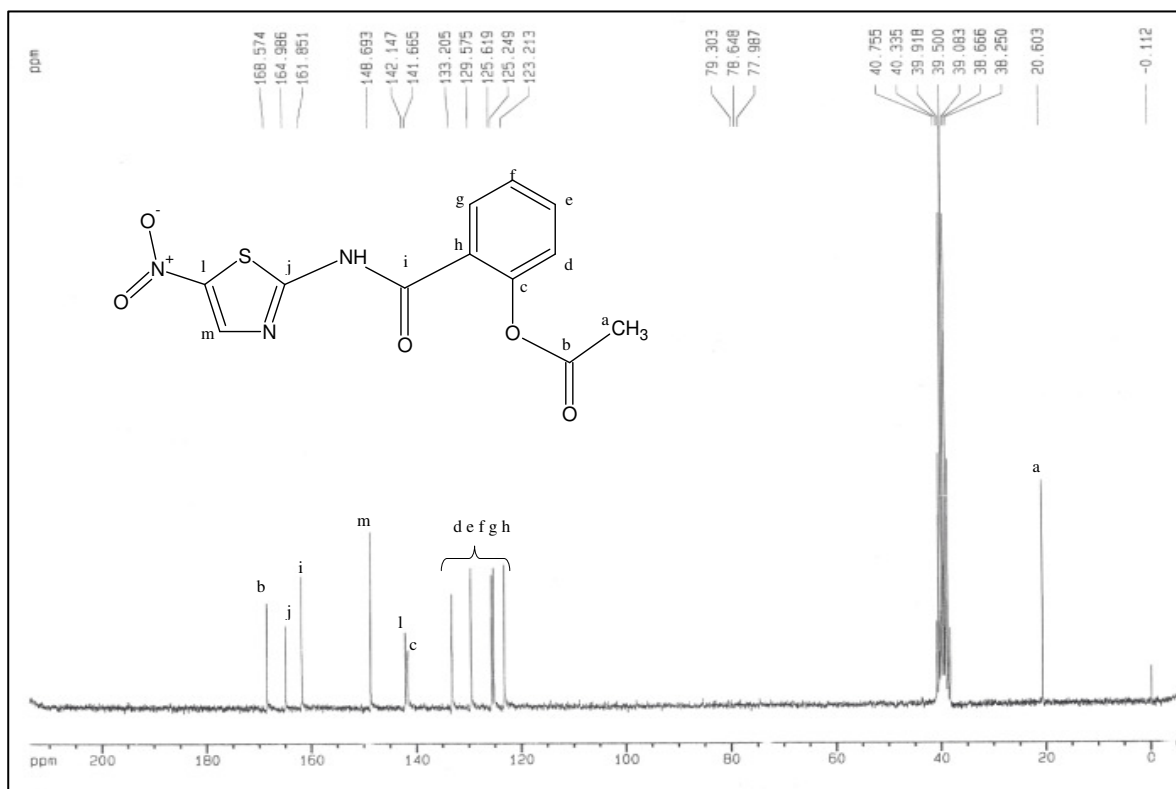
**FIGURA 4.3.** Espectro de RMN  $^1\text{H}$  em  $\text{DMSO}_{d6}$  da NTZ SQR.

As atribuições dos picos obtidos no espectro de RMN  $^1\text{H}$  de NTZ SQR estão apresentadas na Tabela 4.2.

**TABELA 4.2.** Atribuições dos picos obtidos no espectro de RMN  $^1\text{H}$  da NTZ em  $\text{DMSO}_{d6}$  (PAVIA *et al.*, 2001; SILVERSTEIN e WEBSTER, 2000).

| Hidrogênio        | Deslocamento químico (ppm) | Multiplicidade | Número de hidrogênios | Interpretação                   |
|-------------------|----------------------------|----------------|-----------------------|---------------------------------|
| <b>a</b>          | 2,27                       | singleto       | 3                     | $\text{CH}_3$                   |
| -                 | 3,43                       | -              | -                     | Solvente ( $\text{DMSO}_{d6}$ ) |
| <b>b, c, d, e</b> | 7,25 – 7,86                | multipletto    | 4                     | H aromáticos                    |
| <b>f</b>          | 8,5                        | singleto       | 1                     | C–H (tiazólico)                 |
| <b>g</b>          | 13,55                      | singleto       | 1                     | N–H (amida)                     |

O espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  da NTZ SQR, bem como sua estrutura química, estão apresentados na Figura 4.4.



**FIGURA 4.4.** Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  em  $\text{DMSO}_{d6}$  da NTZ SQR.

As atribuições dos picos obtidos no espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  de NTZ SQR estão apresentadas na Tabelas 4.3.

**TABELA 4.3** Atribuições dos picos obtidos no espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  da NTZ SQR em  $\text{DMSO}_{d6}$  (PAVIA *et al.*, 2001; SILVERSTEIN e WEBSTER, 2000).

| Carbono       | Deslocamento químico (ppm) | Interpretação                          |
|---------------|----------------------------|----------------------------------------|
| a             | 20,60                      | $\text{CH}_3$                          |
| b             | 168,57                     | $\text{O}-\text{C}=\text{O}$ (acetato) |
| c             | 143,66                     | $\text{C}-\text{O}$                    |
| d, e, f, g, h | 123,21 – 133,20            | C aromáticos                           |
| i             | 161,85                     | $\text{N}-\text{C}=\text{O}$ (amida)   |
| j             | 164,99                     | $\text{S}-\text{C}=\text{N}$ (tiazol)  |
| l             | 142,15                     | $\text{C}-\text{S}$ (tiazol)           |
| m             | 148,69                     | $\text{C}-\text{N}$ (tiazol)           |

Os demais picos próximos ao deslocamento de 40 ppm correspondem ao solvente  $DMSO_{d6}$  (GOTTLIEB *et al.*, 1997).

A ressonância magnética nuclear é uma técnica extremamente eficaz pois permite caracterizar uma estrutura química e avaliar possíveis modificações através da presença e/ou ausência de sinais característicos da molécula frente ao espectro da SQR. A técnica também permite, em alguns casos, a detecção de impurezas (WATSON, 2005b). As atribuições dos hidrogênios e dos carbonos da NTZ SQR foram estabelecidas com base em dados tabelados disponíveis na literatura específica (PAVIA *et al.*, 2001; SILVERSTEIN e WEBSTER, 2000).

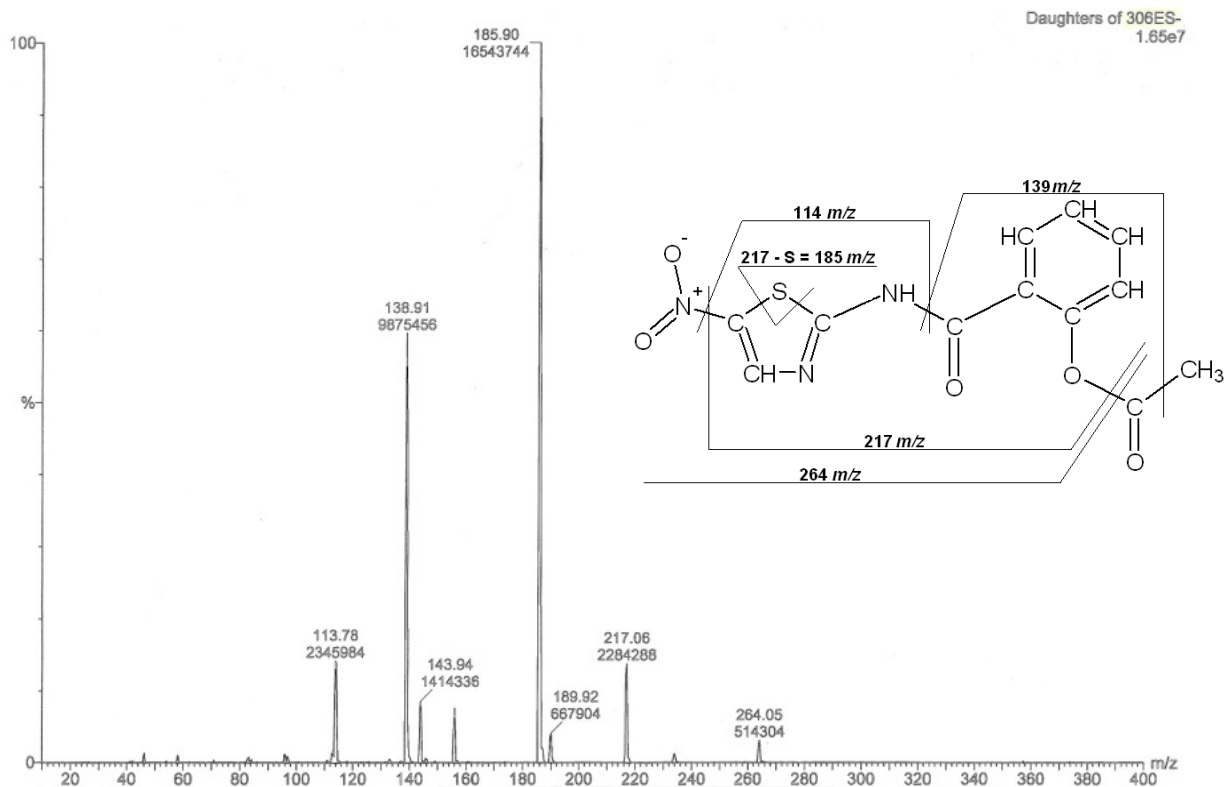
#### **4.2.4. Espectrometria de massas (EM)**

A determinação da massa da NTZ SQR foi realizada em espectrômetro de massas Micromass<sup>®</sup> modelo Quattro LC, equipado com duplo quadropolo e uma interface de ionização por *eletrospray*, operado no modo negativo ( $ES^-$ ). O gás de nebulização e dessolvatação foi nitrogênio, enquanto argônio foi utilizado como gás de colisão. Os parâmetros operacionais fixados foram: fluxo de gás para nebulização de 51 l/h, fluxo de gás para dessolvatação de 372 l/h, voltagem de cone de 50 V, voltagem do capilar de 2,95 kV, potencial de entrada de 42 V, energia de colisão de 5 V, potencial de saída na célula de colisão de 50 V, temperaturas da fonte de íons de 130 °C e da sonda de 300 °C.

O método utilizado foi a injeção direta de uma solução contendo 1 µg/ml de NTZ SQR em acetonitrila e água (1:1, V/V).

##### **4.2.4.1. Resultados e discussão**

O espectro de massas dos fragmentos obtidos na análise da NTZ SQR pelo método de EM/EM está apresentado na Figura 4.5.



**FIGURA 4.5.** Espectro de massas dos fragmentos obtidos na análise da NTZ SQR por EM/EM.

Na análise do espectro de massas da NTZ (306 M/Z, ES<sup>-</sup>) obtido por EM/EM foi possível verificar os principais fragmentos em 264, 217, 190, 186, 139 e 114 m/z. Segundo alguns autores, os fragmentos obtidos confirmam a identidade do fármaco (STOCKIS *et al.*, 2006; BROEKHUYSEN *et al.*, 2000; ZHAO *et al.*, 2008a; ZHAO *et al.*, 2008b).

### 4.3. IDENTIFICAÇÃO DO FÁRMACO NAS AMOSTRAS

#### 4.3.1. Cromatografia em camada delgada (CCD)

Foram analisadas amostras de NTZ SQR, pó para suspensão oral e comprimidos revestidos de NTZ. Estas amostras foram preparadas em acetonitrila na concentração de 1 mg/ml. As soluções compostas pelas formas farmacêuticas



foram mantidas em ultra-som por 10 minutos, com posterior filtração em papel filtro quantitativo.

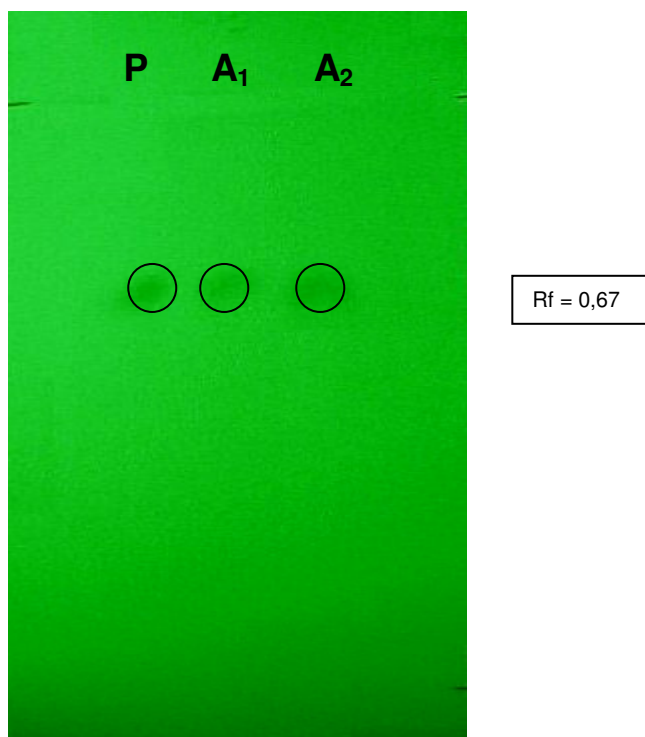
O desenvolvimento cromatográfico foi realizado em cromatoplasas aluminizadas (MERCK) de gel-sílica 60 F<sub>254</sub> com 12 cm de comprimento, 5,0 cm de largura e 0,25 cm de espessura de camada adsorvente. O sistema eluente proposto foi preparado a partir da mistura de hexano e etanol, na proporção de 60:40 (V/V), respectivamente. As soluções da SQR e das amostras foram aplicadas, por meio de tubos capilares (3 toques), a uma distância de 1 cm da borda inferior da placa e transferidos para cubas previamente saturadas com o sistema eluente. Após migração de 10 cm do ponto de aplicação, a placa foi retirada da cuba e mantida à temperatura ambiente até a evaporação do solvente residual. A seguir, realizou-se a visualização das manchas, através da exposição das placas à lâmpada de luz ultravioleta (UV) com emissão em 254 nm. Os valores dos fatores de retenção (Rf) foram obtidos através do quociente entre as distâncias de cada amostra submetida à análise e a migração do eluente.

#### **4.3.1.1. Resultados e discussão**

A CCD é uma técnica de separação que oferece fácil compreensão e execução, separações em breve espaço de tempo, versatilidade, grande reprodutibilidade e baixo custo. Além disso, apresenta flexibilidade, ou seja, permite a utilização dos mais variados sistemas eluentes e agentes reveladores, os quais são determinados de acordo com as características químicas da amostra em teste (LOPES, 1997).

A pesquisa por trabalhos com outros fármacos antiparasitários não contribuiu na avaliação das condições adequadas para esta técnica, pois as estruturas dos fármacos desta classe diferem muito. Para o desenvolvimento do método foram testadas diversas combinações e proporções de solventes orgânicos a fim de verificar qual sistema eluente permitiria a obtenção de Rf satisfatório. Os testes incluíram solventes como diclorometano, metanol, hexano, etanol, butanol, ácido acético, água, clorofórmio e acetona. Neste intuito, o sistema eluente constituído por hexano e etanol (60:40, V/V) se mostrou adequado. Os valores de Rf obtidos após a

migração cromatográfica foram de 0,67 (triplicata), para a NTZ SQR e para as amostras de pó para suspensão e comprimidos revestidos. Os perfis cromatográficos obtidos após revelação com luz ultravioleta a 254 nm podem ser observados na Figura 4.6.



**FIGURA 4.6.** Perfil cromatográfico obtido por CCD na análise da solução da NTZ SQR (P), solução amostra de pó para suspensão oral (A<sub>1</sub>) e da solução de comprimidos revestidos (A<sub>2</sub>), revelados por luz UV 254 nm.

O método desenvolvido apresentou resultados que sugerem a identidade do fármaco presente nas amostras de comprimidos e pó para suspensão oral frente a NTZ SQR, devido à similaridade no perfil cromatográfico e aos valores de Rf obtidos.

#### **4.3.2. Espectrofotometria na região do ultravioleta**

A identificação da NTZ nas formas farmacêuticas de pó para suspensão e comprimidos revestidos foi realizada em comparação com a SQR, na concentração de 12 µg/ml. As amostras foram preparadas utilizando acetonitrila como primeiro diluente. Pesou-se o equivalente a 15 mg de NTZ e transferiu-se para balão volumétrico de 100 ml. Adicionaram-se 50 ml e extraiu-se o fármaco em banho de

ultra-som por 10 min. Após filtração em papel filtro, uma alíquota de 2 ml do filtrado foi transferida para balão volumétrico de 25 ml e completou-se o volume com água pH 4,5 (ajustada com ácido fosfórico 10%, V/V), obtendo-se uma solução com concentração de 12 µg/ml. Preparou-se a SQR da mesma maneira, excetuando a etapa de filtração.

O equipamento utilizado foi espectrofotômetro UV/Vis SHIMADZU modelo UV 160A, equipado com cubetas de quartzo de 1,0 cm de espessura. Os espectros das amostras foram obtidos a partir de leituras na faixa de comprimento de onda de 200 a 400 nm, utilizando água pH 4,5 como branco.

A identificação de NTZ nas formas farmacêuticas em estudo foi realizada através da sobreposição dos espectros obtidos (SQR, pó para suspensão e comprimidos revestidos) e comparação dos mesmos quanto ao seu perfil característico e comprimentos de onda de máxima de absorção.

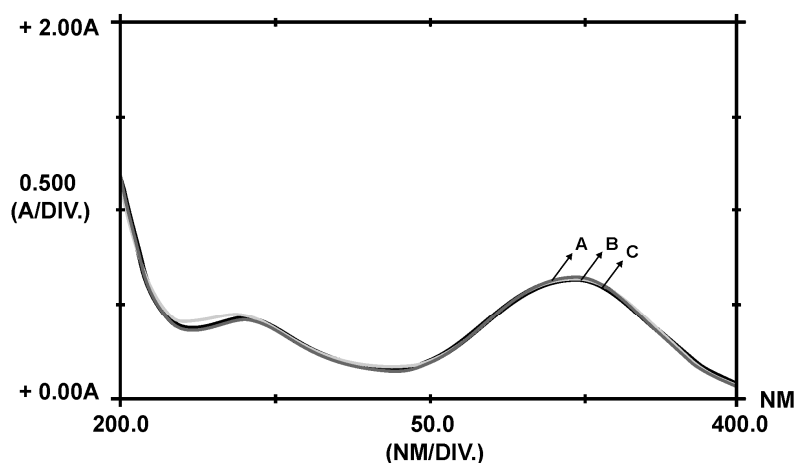
#### **4.3.2.1. Resultados e discussão**

Devido à sua facilidade, rapidez e custo relativamente baixo, a espectrofotometria na região do ultravioleta é um método amplamente utilizado para análise qualitativa e quantitativa de fármacos (CLURCZAK, 1998).

Muitos solventes estão disponíveis para análise na região do ultravioleta e a escolha do mesmo deve ser baseada na solubilidade, toxicidade, custo e facilidade da sua aplicação no controle de qualidade de rotina. A NTZ é praticamente insolúvel em solventes aquosos e pouco solúvel em etanol e metanol. Foram testadas como diluentes soluções ácidas (HCl 0,1 e 0,01 M) e básicas (NaOH 0,1 e 0,01 M), onde se verificou baixa solubilidade nos diluentes ácidos e instabilidade do fármaco em solventes básicos. Finalmente, acetonitrila foi utilizada para extração devido a boa solubilidade da NTZ neste solvente. Para redução da utilização do solvente orgânico, proporcionando um método menos oneroso, tóxico e poluente, foi empregado como segundo diluente água pH 4,5 (ajustada com ácido fosfórico 10%, V/V).

A estabilidade da NTZ em água pH 4,5 foi testada e não se verificou a ocorrência de modificações no espectro do fármaco após 3 h de estocagem à temperatura ambiente e abrigo da luz.

Os espectros de absorção no ultravioleta, referentes a NTZ SQR e as formas farmacêuticas, preparadas em água pH 4,5 na concentração de 12 µg/ml estão apresentados sobrepostos na Figura 4.7



**FIGURA 4.7.** Espectros sobrepostos de NTZ SQR (A), pó para suspensão (B) e comprimidos revestidos (C) em água pH 4,5, na concentração de 12 µg/ml.

Os espectros de absorção obtidos na análise da NTZ SQR e das formas farmacêuticas em estudo demonstraram perfis similares no solvente utilizado, sugerindo a mesma identidade das amostras. O comprimento de onda de máxima absorção foi o mesmo para todas as amostras em 345 nm. Em 240 nm ocorreu uma pequena modificação no espectro da amostra de pó para suspensão oral, provavelmente, devido à influência da absorção dos excipientes neste comprimento de onda.

Em virtude dos resultados obtidos, o método desenvolvido é útil na identificação de NTZ em amostras de pó para suspensão e comprimidos revestidos.

### 4.3.3. Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)

Foram analisadas as amostras de NTZ SQR, pó para suspensão e comprimidos revestidos de NTZ.

As análises cromatográficas foram realizadas em cromatógrafo a líquido Shimadzu equipado com controlador de sistema SCL10-ADvp operado pelo programa Class VP 6.12 SP2. O equipamento é composto de sistema binário de bombas LC-10ADvp, detector de arranjo de fotodiodos SPD- M10ADvp, forno CTO-10ACvp e auto-injetor SIL-10ADvp.

As condições cromatográficas definidas para identificação de NTZ por CLAE estão apresentadas na Tabela 4.4.

**TABELA 4.4.** Condições cromatográficas definidas para identificação de NTZ por CLAE.

| Parâmetro       | Descrição                                                                          |
|-----------------|------------------------------------------------------------------------------------|
| Fase móvel      | Ácido ortofosfórico 0,1% (V/V) pH 6,0 com trietilamina : acetonitrila (45:55, V/V) |
| Fluxo           | 1,0 ml/min                                                                         |
| Coluna          | Phenomenex® Synergi Fusion C <sub>18</sub> (250 x 4,6 mm, 4 µm)                    |
| Pré-coluna      | C <sub>18</sub> (4,0 x 3,0 mm, 4 µm)                                               |
| Detecção        | 240 nm                                                                             |
| Temperatura     | 25 °C                                                                              |
| Volume injetado | 20 µl                                                                              |

Os componentes da fase móvel foram misturados e filtrados, sob vácuo, através de membrana de *nylon* com diâmetro do poro de 0,45 µm e desgaseificados com gás hélio por 10 minutos. As amostras e a NTZ SQR foram preparadas utilizando acetonitrila como diluente, a concentração final de 30 µg/ml. Para extrair o fármaco das formas farmacêuticas, as soluções iniciais de cada uma foram mantidas

em banho de ultra-som por 10 min. As amostras foram filtradas em membrana de *nylon* (0,45  $\mu\text{m}$ ) antes da injeção.

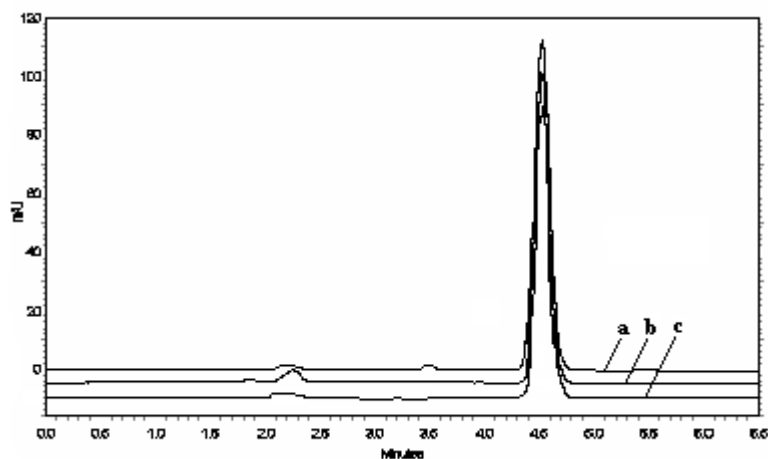
As identificações da NTZ nas amostras de pó para suspensão e comprimido revestido foram realizadas através da comparação dos tempos de retenção da solução destes com a NTZ SQR.

#### **4.3.3.1. Resultados e discussão**

A CLAE surgiu, essencialmente, como uma técnica de separação e ocupa, atualmente, um lugar de destaque como técnica analítica qualitativa e quantitativa, sendo considerada um dos métodos mais utilizados para quantificação de fármacos em formas farmacêuticas. Apresenta-se, também, muito útil na identificação de fármacos, através da comparação dos tempos de retenção de uma determinada amostra e sua respectiva substância de referência.

Com o intuito de desenvolver um método analítico adequado foram testadas diferentes fases móveis com proporções variadas de solvente orgânico e pH (5,0 – 7,0) da fase aquosa, compostas por ácido fosfórico 0,1% e acetonitrila, ácido fosfórico 0,1% e metanol.

A fase móvel composta por ácido ortofosfórico 0,1% (V/V) pH 6,0 com trietilamina : acetonitrila (45:55, V/V) demonstrou ser adequada, resultando em um tempo de retenção de, aproximadamente, 4,5 min para a NTZ. O sistema cromatográfico proposto também cumpriu com o teste de adequabilidade do sistema frente aos valores de simetria (1,3), pratos teóricos (4.000) e reprodutibilidade das injeções (DPR = 0,2%, n = 5). Os cromatogramas obtidos, na concentração de 30  $\mu\text{g/ml}$ , a partir da análise de NTZ SQR, pó para suspensão e comprimidos revestidos de NTZ podem ser visualizados sobrepostos na Figura 4.8.



**FIGURA 4.8.** Cromatogramas sobrepostos da NTZ SQR (a), solução amostra de pó para suspensão oral (b) e comprimidos revestidos em acetonitrila a 30 µg/ml. Condições cromatográficas: fase móvel constituída de ácido ortofosfórico 0,1% (V/V) pH 6,0 com trietilamina : acetonitrila (45:55, V/V), fluxo de 1,0 ml/min, coluna Phenomenex® Synergi Fusion C<sub>18</sub> (250 x 4,6 mm, 4 µm), detecção em λ de 240 nm, volume de injeção 20 µl, temperatura de análise 25 °C.

A similaridade dos tempos de retenção obtidos no método por CLAE para a NTZ SQR e para as soluções amostra de pó para suspensão oral e comprimido revestido de NTZ (Figura 4.8) permitiram identificar o fármaco nas referidas amostras. Os resultados demonstraram a adequabilidade do método para identificação de NTZ nas formas farmacêuticas em estudo.

#### 4.3.4. Eletroforese capilar (EC)

Foram analisadas as amostras de NTZ SQR, pó para suspensão e comprimidos revestidos de NTZ.

A análise por eletroforese capilar foi realizada em equipamento HP<sup>3D</sup>-CE (HEWLETT-PACKARD) equipado com detector de arranjo de fotodiodos, injetor automático e controlador de temperatura. O equipamento está instalado no Laboratório de Geoquímica Ambiental da Escola de Engenharia – UFRGS. O *software* HP Chemstation Rev.A.0601[403] foi utilizado para controle do sistema, aquisição e tratamento de dados.

As condições eletroforéticas definidas para identificação de NTZ estão apresentadas na Tabela 4.5.

**TABELA 4.5.** Condições eletroforéticas definidas para identificação de NTZ.

| <b>Parâmetro</b>       | <b>Descrição</b>                                                                  |
|------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------|
| Capilar                | Sílica fundida 48,5 cm de comprimento (40 cm efetivos, 75 µm de diâmetro interno) |
| Eletrólito             | Tampão acetato de sódio 30 mM pH 5,2 : acetonitrila (80:20, V/V)                  |
| Tensão aplicada        | 25 kV (corrente aproximada de 45 µA)                                              |
| Detecção               | Detector de fotodiodos em 360 nm                                                  |
| Injeção                | Hidrodinâmica 50 mBar                                                             |
| Tempo de injeção       | 5 segundos                                                                        |
| Pré-condicionamento    | 1,5 min NaOH 0,1M; 1,5 min água; 2 min eletrólito                                 |
| Temperatura de análise | 25 ± 1 °C                                                                         |

A identificação do fármaco nas amostras de comprimido revestido e pó para suspensão oral foi realizada através da comparação dos tempos de migração das amostras com aqueles da solução de NTZ SQR.

#### **4.3.4.1 Resultado e discussão**

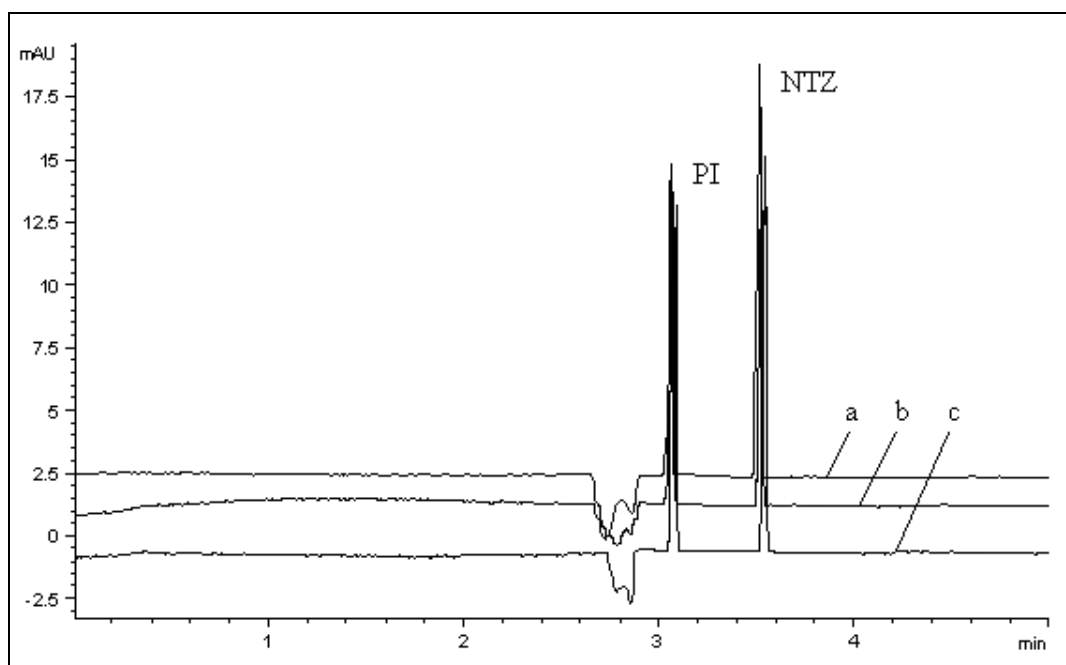
A EC é uma técnica de separação muito eficiente e que vem sendo utilizada cada vez mais na análise de produtos farmacêuticos. Sua aplicação pode ser voltada para um grande número de amostras, incluindo separação de compostos quirais, identificação, doseamento, determinação de impurezas e substâncias relacionadas. Além disso, é uma interessante alternativa na análise de produtos farmacêuticos devido à sua eficiência, flexibilidade e alta resolução, utiliza volume de amostra na ordem de nanolitros, consome baixa quantidade de solventes e



reagentes e, principalmente, gera baixíssimo volume de resíduos (ALTRIA *et al.*, 1998; SANTORO *et al.*, 2000).

As condições experimentais foram determinadas após testar diferentes parâmetros que influenciam diretamente na análise, tais como: meio de solubilização das amostras, temperatura a análise, voltagem aplicada, concentração e pH do tampão e proporção de solvente orgânico no eletrólito. Foi estudada a necessidade do emprego de padrão interno e se optou pela utilização da nimesulida devido à fácil ionização em diferentes eletrólitos e por ser um fármaco muito utilizado como padrão interno em diferentes estudos pelo nosso grupo de pesquisa.

Os eletroferogramas obtidos, na concentração de 30 µg/ml de NTZ e 40 µg/ml de padrão interno (PI), a partir da análise de NTZ SQR, pó para suspensão oral e comprimidos revestidos de NTZ podem ser visualizados sobrepostos na Figura 4.9. A similaridade dos tempos de migração obtidos (3,1 min para PI e 3,5 min para NTZ) permitiu identificar o fármaco nas referidas amostras, demonstrando a adequabilidade do mesmo para identificação de NTZ nas formas farmacêuticas em estudo.



**FIGURA 4.9.** Eletroferogramas obtidos por EC através das soluções de NTZ SQR (a), pó para suspensão (b) e comprimido revestido (c), na concentração de 30 µg/ml de NTZ e 40 µg/ml de PI. Condições eletroforéticas: capilar de sílica fundida 48,5 cm de comprimento (40 cm efetivos, 75 µm de diâmetro interno); eletrólito tampão acetato de sódio 30 mM pH 5,2 : acetonitrila (80:20, V/V); voltagem 25 kV; detecção UV em 360 nm; temperatura de 25 °C.

#### 4.4. DISCUSSÃO GERAL

Como mencionado anteriormente, no desenvolvimento de um método analítico a identidade e a pureza da substância utilizada como referência constituem fatores importantes para se obter resultados apropriados. Métodos adequados de identificação, como o DSC e espectroscópicos, tais como: IV, RMN  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  e MS, são de fundamental importância, pois permitem caracterizar a substância utilizada como referência.

No presente trabalho, os resultados obtidos confirmam a identidade e a pureza da NTZ SQR. A faixa de fusão obtida por DSC mostrou-se adequada (201,2 °C a 205,7 °C) em relação ao preconizado na literatura, com início da fusão em 201,2°C e pico em 202,3°C. A curva de aquecimento não apresentou formação de outros sinais o que denota a pureza da SQR utilizada. No espectro de IV foi possível verificar as bandas de absorção características dos grupamentos presentes na estrutura química da molécula. As atribuições dos sinais referentes ao espectro de RMN  $^1\text{H}$  e de RMN  $^{13}\text{C}$  obtidos nos testes estão de acordo com o descrito na literatura pertinente. O EM, finalizando a caracterização da SQR, demonstra a massa característica à molécula, juntamente com seus principais fragmentos.

Na análise qualitativa, a identificação da substância ativa em formas farmacêuticas é baseada na comparação de resultados obtidos por um padrão de referência com aqueles obtidos para as amostras. Neste estudo, foram desenvolvidos métodos como CCD, espectrofotometria na região do UV, CLAE e EC para identificar o fármaco nas formas farmacêuticas. A partir dos resultados alcançados pelos métodos utilizados foi possível identificar a NTZ nas amostras de pó para suspensão oral e comprimido revestido.

Na avaliação das técnicas, verificou-se que a CCD é o método mais simples, pois não necessita de instrumentação, e é de fácil execução na avaliação da identidade do fármaco nas formas farmacêuticas em estudo. Os métodos apresentam-se como alternativas versáteis para identificação do fármaco nas formas farmacêuticas, embora, algumas vezes, para termos um resultado de maior confiabilidade, seja necessária a utilização de mais de uma técnica.

#### 4.5. CONCLUSÕES

- A análise por DSC, juntamente com as análises espectroscópicas por IV, RMN  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  e MS possibilitaram a identificação e verificação da pureza da NTZ SQR;
- Os métodos por CCD, espectrofotometria no UV, CLAE e EC foram adequados para a identificação do fármaco em pó para suspensão oral e comprimido revestido.



---

## **5. CAPÍTULO II – DETERMINAÇÃO QUANTITATIVA**

---



## 5.1. INTRODUÇÃO

No desenvolvimento de métodos analíticos quantitativos para o controle de qualidade devemos utilizar um correto planejamento, pois a escolha do mesmo é influenciada por diversos fatores, como a natureza do fármaco, complexidade, identidade, pureza e quantidade de amostra, a precisão e exatidão a serem obtidas, a disponibilidade de reagentes e equipamento. O custo total da análise e a disponibilidade e a capacidade de aplicação em estudos de estabilidade também devem ser considerados. Além do mais, busca-se desenvolver métodos utilizando técnicas que estão disseminadas e largamente empregadas na literatura relacionada ao controle de qualidade de fármacos ou usualmente descritas nos códigos oficiais, tais como UV, CLAE, entre outras.

Após o desenvolvimento de um método, tem-se a necessidade de confirmar a qualidade das medições, exames ou testes químicos realizados. A ferramenta utilizada para este intuito é a validação, a qual busca dar evidências documentadas de que o método analítico gera informações confiáveis e interpretáveis, sendo apropriado para a finalidade pretendida. A validação de um método é um processo contínuo que começa no planejamento da estratégia analítica e continua ao longo de todo o seu desenvolvimento e transferência.

Pode-se dizer que os conceitos de validação continuam evoluindo e estão constantemente sob consideração pelas agências reguladoras (BRASIL, 2003; USP 32, 2009; FDA, 1994). A harmonização dos requisitos para validação de procedimentos analíticos foi realizada pelo *International Conference on Harmonization of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use*, a qual apresenta uma discussão a respeito das características que devem ser consideradas durante a validação de métodos analíticos (ICH, 2005).

Segundo essas guias, os principais parâmetros a serem avaliados na validação de um método analítico são: especificidade, linearidade, precisão, exatidão, robustez, limite de quantificação e limite de detecção. De acordo com a literatura consultada, nem todos os parâmetros analíticos necessitam ser empregados na validação de um método; a escolha vai depender do tipo do método

e sua aplicação, cabendo ao analista a seleção dos parâmetros relevantes (ERMER, 2001; USP 32, 2009; ICH, 2005; BRASIL, 2003; FDA, 1994).

No presente capítulo estão apresentados os métodos que foram desenvolvidos e validados para determinação quantitativa de NTZ em comprimidos revestidos: CLAE, espectrofotometria no UV e EC.

Os métodos cromatográficos são normalmente utilizados em laboratórios de análise para a determinação qualitativa e quantitativa de fármacos em matérias-primas, produtos acabados e amostras biológicas (SWARTZ e KRULL, 1998). Constitui-se em procedimento de larga utilização em razão de sua versatilidade, possibilitando a separação e quantificação de diferentes componentes de uma formulação e até produtos de degradação ou síntese, através da adequada escolha de parâmetros, tais como colunas, fase móvel e método de detecção (WATSON, 2005a).

A espectrofotometria no UV é uma técnica de fácil execução e custo reduzido. Pode ser utilizada, com boa precisão e exatidão, desde que não ocorra interferência dos excipientes, para análise quantitativa de fármacos presentes em formulações farmacêuticas. É um método muito utilizado devido ao potencial da grande maioria dos fármacos de absorver energia nessa região (WATSON, 2005a).

A EC é uma técnica relativamente recente, tendo alcançado desde sua introdução, rápido desenvolvimento e ampla aplicação. Possui uma característica que é sua capacidade única para separar macromoléculas carregadas eletricamente, fato que difere das outras técnicas utilizadas para quantificação de fármacos no controle de qualidade. É aplicável, não somente para fármacos, mas também na determinação de uma grande variedade de amostras, tais como, vitaminas, aminoácidos, íons inorgânicos, proteínas, peptídeos, entre outros (ALTRIA *et al.*, 1998; SANTORO *et al.*, 2000).

No início do desenvolvimento do projeto não havia trabalhos na literatura científica sobre a determinação quantitativa de NTZ em formas farmacêuticas e, até o momento, não há monografia oficial para o fármaco. Assim, o desenvolvimento e validação de métodos por CLAE, espectrofotometria no UV e EC para quantificação



dessa substância ativa em comprimidos revestidos e pó para suspensão oral constituiu um dos objetivos do presente trabalho.

Os métodos desenvolvidos e validados por CLAE, espectrofotometria no UV e EC para determinação quantitativa de NTZ nas formas farmacêuticas em estudo estão apresentados no formato de artigo científico e suas redações foram dispostas nas normas e formatos das revistas em que foram publicados ou submetidos para publicação.

A comparação dos métodos propostos, através da análise estatística dos resultados obtidos, também será apresentada no decorrer deste capítulo.



---

**5.2. ARTIGO CIENTÍFICO CLAE – Development of a validated stability-indicating LC method for nitazoxanide in pharmaceutical formulations**

**Chromatographia, v. 67, p. 131-136, 2008.**

---



### 5.2.1. Abstract

A reversed-phase liquid chromatography (LC) method was developed for the assay of nitazoxanide (NTZ) in solid dosage formulations. An isocratic LC separation was performed on a Phenomenex Synergi Fusion C<sub>18</sub> column (250 mm x 4.6 mm, i.d., 4 µm particle size) using a mobile phase of 0.1% *o*-phosphoric acid solution, pH 6.0: acetonitrile (45:55, v/v) at a flow rate of 1.0 mL min<sup>-1</sup>. Detection was achieved with a photodiode array detector at 240 nm. The detector response for NTZ was linear over the concentration range from 2 - 100 µg mL<sup>-1</sup> ( $r = 0.9999$ ). The specificity and stability-indicating capability of the method were proved using stress conditions. The RSD values for intra-day precision were less than 1.0% for tablets and powder for oral suspension. The RSD values for inter-day precision were 0.6% and 0.7% for tablets and powder for oral suspension, respectively. The accuracy was 100.4% (RSD = 1.8%) for tablets and 100.9% (RSD = 0.3%) for powder for oral suspension. The limits of quantitation and detection were 0.4 and 0.1 µg mL<sup>-1</sup>, respectively. There was no interference of the excipients on the determination of the active pharmaceutical ingredient. The proposed method was precise, accurate, specific, and sensitive. It can be applied to the quantitative determination of drug in tablets and powder for oral suspension.

Keywords: Nitazoxanide, Column liquid chromatography, Stability-indicating method, Validation

### 5.2.2. Introduction

Nitazoxanide (NTZ), 2-acetyloxy-N-(5-nitro-2-thiazolyl) benzamide, is a new broad-spectrum antiparasitic agent [1–3]. It is the first agent with proven efficacy for the treatment of cryptosporidiosis and giardiasis in children and adults [1, 2]. Its precise mechanism of action is unknown, but studies in anaerobic protozoa and bacteria (*Trichomonas vaginalis*, *Entamoeba histolytica*, and *Clostridium perfringens*) and in the microaerophile *Helicobacter pylori* have shown that NTZ inhibits pyruvate ferredoxin oxireductase (PFOR) enzyme-dependent electron transfer reactions essential to anaerobic energy metabolism in these organisms [3].

NTZ is currently available in tablets and powder for oral suspension. An official method for determination of this drug in oral formulation has not been described yet. However, there are works describing the determination of NTZ and metabolites in biological fluids by LC and LC-MS [4, 5]. Recently, spectrophotometric and high-performance thin-layer chromatographic (HPTLC) methods for the estimation of NTZ in tablets were developed [6, 7].

Therefore, the purpose of this work was to develop and to validate in compliance with ICH guideline [8] and USP Pharmacopeia [9] a simple and stability-indicating LC method for determination NTZ in pharmaceutical formulations.

### 5.2.3. Experimental

#### Chemicals and reagents

NTZ used as reference substance (assigned purity, 99.53%) was kindly supplied by Shin Yang–Hangzhou Shinyang Samwoo Fine Chemical CO. (Ningbo, China). According to guidelines [8, 15] and USP pharmacopeia [9] for drugs quality control the use of reference substance with checked purity is mandatory. The NTZ standard used was analyzed by analytical techniques such as: LC-mass

spectrometry, differential scanning calorimetric (DSC), infrared absorption spectroscopy, and  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  nuclear magnetic resonance spectroscopy. No impurities were found.

Nixoran<sup>®</sup> (manufactured by Roemmers, Buenos Aires, Argentina) tablets for oral administration (500 mg per tablet, excipients: maize starch, pregelatinized starch, hydroxypropyl methylcellulose, sodium starch glycolate, talc, magnesium stearate, triacetin, iron oxide yellow, titanium dioxide, polyethylene glycol 6000) and Alinia<sup>®</sup> (manufactured by Romark Laboratories, Tampa, FL, USA) powder for oral suspension (1.2 g per bottle, excipients: sodium benzoate, sucrose, xanthan gum, microcrystalline cellulose and carboxymethylcellulose sodium, anhydrous citric acid, sodium citrate dihydrate, acacia gum, sugar syrup, FD&C Red #40 and natural strawberry flavoring) were purchased. Acetonitrile LC grade was purchased from Tedia (Fairfield, CA, USA) *o*-phosphoric acid and triethylamine were from Merck (Darmstadt, Germany). Ultra-pure water was obtained from a Water Purification Unit from Labconco (Kansas, MO, USA).

### **Apparatus and chromatographic conditions**

The LC system consisted of a Shimadzu LC-10 ADVP pump, a SPD-M 10 AVP Diode Array Detector, a SCL-10 AVP system controller, SIL-10 ADVP auto injector, and a degasser module; data were acquired and processed by Shimadzu CLASS-VP 6.12 SP2 software (Shimadzu, Kyoto, Japan).

The column used was a Phenomenex<sup>®</sup> (Torrance, CA, USA) Synergi Fusion C<sub>18</sub> column (250 mm x 4.6 mm, i.d., 4  $\mu\text{m}$  particle size) coupled to a C<sub>18</sub> guard column (4.0 mm x 3.0 mm, i.d., 4  $\mu\text{m}$ ). The mobile phase was *o*-phosphoric acid 0.1% (v/v) pH 6.0 (adjusted by addition of triethylamine) : acetonitrile (45:55, v/v). The mobile phase was filtered through 0.45  $\mu\text{m}$  nylon filters (Whatman, England). The flow rate was 1.0 mL min<sup>-1</sup> and the samples injection volume was 20  $\mu\text{L}$ . The detection was achieved with a photodiode array detection at 240 nm. The temperature was at 25°C in the column oven. The quantitation was performed using the absolute area of the peak.

### **Standard preparation**

A stock solution of  $100 \mu\text{g mL}^{-1}$  NTZ reference substance was prepared in a volumetric flask by dissolving 10 mg of drug in 100 mL of acetonitrile, aliquot of the 3 mL of this solution was transferred into 10 mL volumetric flask and the same solvent added to make up the volume in order to give a final concentration of  $30 \mu\text{g mL}^{-1}$ .

### **Samples preparation**

Twenty tablets were weighed and crushed to a fine powder. An accurately weighed amount of powder of tablets and powder for oral suspension equivalent to 10 mg of NTZ were transferred to a 100 mL volumetric flask with 50 mL of acetonitrile and sonicated for 10 min, followed by adding the same solvent to make up to volume. After filtration, an aliquot of 3 mL of this solution was transferred into 10 mL volumetric flask and the same solvent was added to make up the volume in order to give a final concentration of  $30 \mu\text{g mL}^{-1}$ .

### **System suitability test**

System suitability test of the chromatography system was performed before each validation run using five replicates injections of a standard solution. Theoretical plates, tailing factor, and injection repeatability were determined.

### **Degradation studies**

In order to establish whether the proposed method was stability-indicating, pure active pharmaceutical ingredient of NTZ was stressed under various conditions to conduct forced degradation studies [10–12]. It is poorly soluble in ethanol and practically insoluble in water, but free soluble in acetonitrile. Most solutions prepared for use in forced degradation studies were prepared by dissolving NTZ in small



volume of acetonitrile (5%, v/v) and later diluted with either aqueous hydrochloric acid, or aqueous hydrogen peroxide, to achieve a concentration of 1 mg mL<sup>-1</sup>.

The study in alkaline condition was carried out in 0.01 M NaOH at room temperature (24 ± 2°C) for 2 h and neutralized. The acid hydrolysis was performed in 0.1 M HCl at 80 °C for 1 h, after the sample was allowed to cool at room temperature and neutralized. An aliquot of each solution was diluted in acetonitrile to give a final concentration of 30 µg mL<sup>-1</sup>.

The oxidative reaction was performed dissolving NTZ in a small volume of acetonitrile (5%, v/v) and later diluted with 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (1 mg mL<sup>-1</sup>), at room temperature. An aliquot of this solution was diluted in acetonitrile to give a final concentration of 30 µg mL<sup>-1</sup>.

The stress degradation study in direct UV radiation (254 nm) was performed exposing the NTZ solution in acetonitrile (1 mg mL<sup>-1</sup>) for 1 h at room temperature in a photostability chamber. This solution after de time was diluted to 30 µg mL<sup>-1</sup> in acetonitrile. Samples submitted to identical conditions, but protected of light, were used as a control.

Peak purity test performed by photodiode array detector was useful to show that the analyte chromatography peak did not contain more than one substance.

## **Validation of the method**

### **Linearity**

Stock solution (100 µg mL<sup>-1</sup>) of NTZ was prepared in acetonitrile and aliquots were transferred to volumetric flasks to obtain the final concentration of 2, 10, 20, 30, 40, 50, and 100 µg mL<sup>-1</sup>. Each one was prepared in triplicate. The linearity was evaluated by linear regression analysis, which was calculated by the least square regression method.

## **Limit of Detection (LOD) and Limit of Quantitation (LOQ)**

The LOD and LOQ were determined at a signal-to-noise ratio of 3:1 and 10:1, respectively, by injecting a series of dilute solutions with known concentrations. Precision study was also carried out at the LOQ level by injecting three individual preparations of NTZ and the relative standard deviation (RSD%) of the absolute area of the peak was evaluated.

## **Specificity**

Forced degradation studies were performed to evaluate the stability-indicating power of the proposed method. The interference of the excipients of the pharmaceutical formulations was also evaluated.

## **Precision**

The precision of the method was determined by repeatability (intra-day precision) and intermediate precision (inter-day precision) and was expressed as relative standard deviation (RSD%) of a series of measurement. The repeatability was evaluated by assaying six samples of each pharmaceutical formulation, at same concentration ( $30 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) during the same day. The intermediate precision was studied by comparing the results obtained on three different days, and in the last day (day 3) it was evaluated using different analyst and different instrument (The LC system consisted of a Shimadzu SLC-10A, equipped with a model LC-10AD pump, UV-Vis detector SPD-10A, Rheodyne injector fitted with a  $20 \mu\text{L}$  loop and a integrator C-R6A chromatopac model; Shimadzu, Kyoto, Japan) in the same laboratory.

## **Accuracy**

This parameter was determined by the recovery test, which consisted of adding known amounts of reference substance to the samples solutions (tablets and powder for oral suspension). Aliquots of 1.0, 2.0, and 3.0 mL of a NTZ standard solution (concentration of  $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) were transferred to 10 mL volumetric flasks of 3 commercial samples solutions, respectively (10.0, 20.0, and  $30 \mu\text{g}$ , respectively, corresponding to 33.0, 66.7, and 100% of the samples concentrations), prepared as described in *Samples preparation*. Each solution was prepared in triplicate.

## Robustness

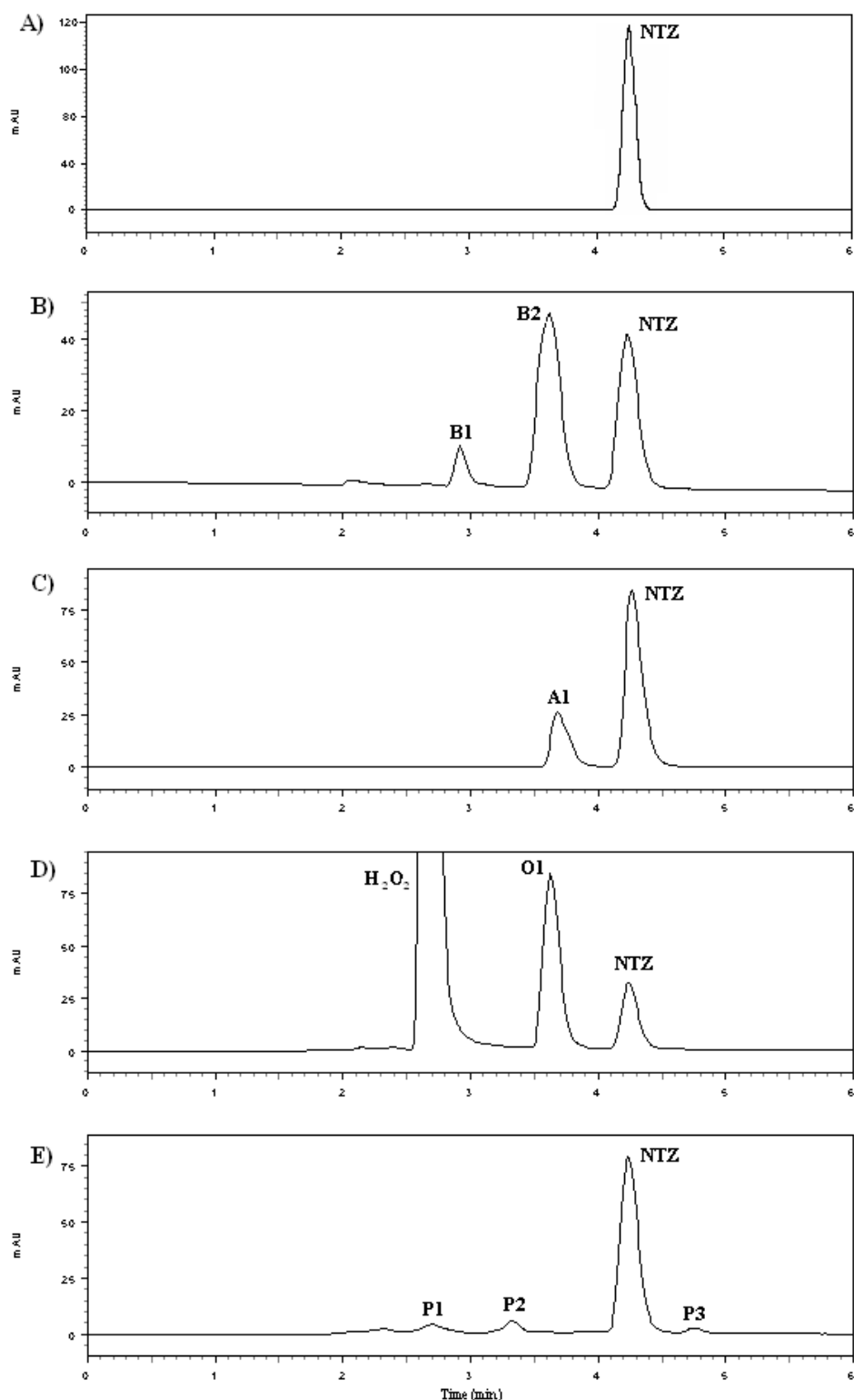
In order to evaluate the robustness of the method, small changes in the chromatography conditions were made, such as column (with the same specification, but acquired from different supplier), percentage of acetonitrile (50 and 60%), pH of aqueous phase (5.5 and 6.5), temperature (30°C), and flow rate (0.9 and 1.1 mL min<sup>-1</sup>).

### 5.2.4. Results and discussion

#### LC Method Development and Optimization

The development of LC methods requires the careful combination among the polarity of the analyte, stationary phase and mobile phase to obtain good separations in reasonable times [13, 14]. The LC procedure was optimized to develop a stability-indicating method to resolve the degradation products from the drug.

The chromatography conditions were chosen after the test of different mobile phases with different proportions of organic solvent. Acetonitrile and methanol are commonly used organic solvents in LC, and reversed-phase chromatography was performed with various mixtures of methanol : *o*-phosphoric acid 0.1% and acetonitrile : *o*-phosphoric acid 0.1%. The pH value of aqueous phase was checked over a range (pH 5.0 – 7.0) before mixing with acetonitrile or methanol. Finally, a mobile phase consisting of a mixture of *o*-phosphoric acid 0.1% (v/v) pH 6.0 (adjusted by addition of triethylamine) : acetonitrile (45:55, v/v) was adopted, because it is suitable to separate the degradation products and NTZ with good peak parameters. The developed mobile phase is stability-indicating and easily applicable in routine quality control. There are no salts (e. g., ammonium acetate, sodium sulfate or potassium phosphate) in solution and such fact could damage the chromatographic column and equipment (HPLC) in the routine quality control. Moreover, such mobile phase offers a fast method where little solvent demand and minor waste production occur. A Typical chromatogram for NTZ is shown in Fig. 5.1.



**FIGURE 5.1.** A) Typical chromatogram for  $30.0 \mu\text{g mL}^{-1}$  NTZ standard solution in the experimental selected conditions; B) Chromatogram of basic-degraded NTZ and degradation products B1 and B2; C) Chromatogram of acid-degraded NTZ and degradation product A1; D) Chromatogram of oxidative-degraded NTZ and degradation product O1; E) Chromatogram of photo-degraded NTZ and degradation products P1, P2, and P3.

## System Suitability Test

The system suitability test of the chromatography system was performed before validation run. The system suitability test is an integrated part of the analytical method and it ascertains the suitability and effectiveness of the operating system. The approximate results were: theoretical plates ( $N = 4010$ ), tailing factor or peak asymmetry ( $T = 1.3$ ), and injection repeatability ( $RSD = 0,2\%$ ,  $n = 5$ ). The values for these parameters were satisfactory in accordance with the literature [9, 15]. The tests ensure that the chromatography system generates safe results. Thus, it was established that the LC system and procedure are capable of providing acceptable quality data.

## Degradation Behavior

The forced degradation studies were conducted to evaluate the stability-indicating capability and selectivity of the proposed method using the NTZ reference substance. When submitted to alkaline conditions in 0.01 M NaOH, the chromatogram showed two degradation products at 2.9 and 3.6 min, and the area of NTZ decreased about 60% (Fig. 5.1B). When submitted to acid conditions (0.1 M HCl) and heat, the chromatogram showed one degradation product at 3.6 min, and the area of NTZ decreased about 30% after 1h (Fig. 5.1C).

The results of the oxidative reaction with 3%  $H_2O_2$  were demonstrated in Fig. 5.1D. It was observed one degradation product at 3.6 min and a decrease of NTZ area of approximately 70% after 15 min.

After the photolysis procedure, several product were observed (2.7, 3.3, and 4.8 min), and the area of NTZ decreased approximately 30% after 1h (Fig. 5.1E).

The chromatographic peak purity tool was applied to verify NTZ peak, showing that it was 100% pure in all cases. Thus, it was confirmed that there was no interference of any other substance in the retention time of the drug. Besides, it was observed that the NTZ peak presents appropriate resolution ( $R_s > 2$ ) and selectivity ( $\alpha > 1$ ) in relation to the degradation products. Also, it was observed that NTZ and degradation products peaks showed symmetric ( $T \leq 2$ ).

As it can be observed, the proposed method succeeded in separating drug from degradation products. Furthermore, the drug can be evaluated both qualitatively and quantitatively in presence of degradation products. The resolution ( $R_s > 2$ ) of all degradation products permits a qualitative and quantitative evaluation of the degradation products which is relevant when assessing toxic product. The results indicated that the method is stability-indicating.

Analyzing the diode-array UV spectrum (200 – 370 nm) of each degradation products it was verified that the products B2, A1, and O1 possess the same spectrum and retention time, then it is suggested that are the same substance, but the identification of these products was not performed yet.

The obtained results in the degradation studies show that the drug is susceptible to the hydrolysis, oxidation and photolysis. Thus, one must be careful when manipulating the drug.

### **Validation of the Method**

The analytical method was validated with respect to parameters such as linearity, limit of quantification, limit of detection, specificity, precision, accuracy, and robustness [8, 9].

Linearity was established by least squares linear regression analysis of the calibration curve. The regression equation for NTZ was found by plotting peak area ( $y$ ) versus the concentration ( $x$ ) studied from 2 – 100  $\mu\text{g mL}^{-1}$ . The representative linear equation was:  $y = 35346 x + 17698$  and the correlation coefficient ( $r = 0.9999$ ) was highly significant. The standard deviation of the slope and intercept were respectively  $\pm 204.2$  (RSD = 0.58%) and  $\pm 1798$  (RSD = 10.16%). The validity of the assay was verified by means of ANOVA (SAS 6.11 for windows, SAS Institute Inc. CARY, NC, USA), which demonstrated significant linear regression and no-significant linearity deviation ( $P < 0.05$ ).

The LOD of NTZ was achieved at 0.1  $\mu\text{g mL}^{-1}$  for 20  $\mu\text{L}$  injection volume. The LOQ of NTZ was achieved at 0.4  $\mu\text{g mL}^{-1}$ . Such value of 0.4  $\mu\text{g mL}^{-1}$  was the concentration that was accurately and reliably measured. The precision at the LOQ

concentrations of NTZ was 1.7% (RSD%). With such findings in LOD and LOQ we prove the method high sensibility.

No interferences from the results of stress testing studies, diluents, impurities, and excipients were observed, indicating a high degree of specificity of this method for determination of NTZ for both pharmaceutical formulations. The tests with the photodiode array detector showed that there was no co-eluting peak interfering in the analysis of NTZ.

The experimental values obtained for the determination of NTZ in samples are presented in Table 5.1. The precision results (RSD%) of the assay were 0.8, 0.7, and 0.4% for tablets and 0.9, 0.8, and 0.6% for powder for oral suspension. The variability of the results was low with RSD values less than 1.0% to intra-day, and the value to inter-day was 0.6% for tablets and 0.7% for powder for oral suspension, confirming good precision of the method.

**TABLE 5.1.** Precision results of LC assay of nitazoxanide in tablets and powder for oral suspension.

| Dosage forms               | Intra-day precision          |                              |                                           | Inter-day precision <sup>b</sup><br>mean ± RSD% |
|----------------------------|------------------------------|------------------------------|-------------------------------------------|-------------------------------------------------|
|                            | Day 1 (n = 6)<br>mean ± RSD% | Day 2 (n = 6)<br>mean ± RSD% | Day 3 (n = 6) <sup>a</sup><br>mean ± RSD% |                                                 |
| Tablets                    | 101.7 ± 0.8                  | 102.6 ± 0.7                  | 101.3 ± 0.4                               | 101.9 ± 0.6                                     |
| Powder for oral suspension | 98.6 ± 0.9                   | 99.1 ± 0.8                   | 99.9 ± 0.6                                | 99.2 ± 0.7                                      |

<sup>a</sup> Different analyst and instrument.

<sup>b</sup> Data expressed as mean of three days.

At each level of the NTZ concentration three determinations were performed. The mean recovery was 100.4% (RSD = 1.8%) for tablets and 100.9% (RSD = 0.3%) for powder for oral suspension. These values show the good accuracy of the proposed method.

The robustness of the method was demonstrated by the chromatograms obtained with the small variations in chromatographic conditions, which were cited in *Validation of the Method*. The obtained results (Table 5.2) show small changes in the retention time of NTZ, but no modifications in tailing factor of the peak (<2). This way, there are no important effects on the analysis, confirming the robustness of the proposed method.

**TABLE 5.2.** Results of the robustness test of the chromatography method for nitazoxanide determination.

| Chromatography conditions             | Parameters           |                |
|---------------------------------------|----------------------|----------------|
|                                       | Retention time (min) | Tailing Factor |
| Column (different supplier)           | 3.0                  | 0.8            |
| Acetonitrile (55 to 50%)              | 3.5                  | 1.5            |
| Acetonitrile (55 to 60%)              | 4.9                  | 1.3            |
| pH (6.0 to 5.5)                       | 6.6                  | 1.3            |
| pH (6.0 to 6.5)                       | 3.0                  | 1.5            |
| Temperature (30°C)                    | 3.6                  | 0.9            |
| Flow rate (0.9 mL min <sup>-1</sup> ) | 4.5                  | 1.2            |
| Flow rate (1.1 mL min <sup>-1</sup> ) | 4.1                  | 1.4            |
| Normal conditions                     | 4.3                  | 1.3            |

In addition to the mentioned data, we can assure all validation have proved the method proper to the aimed purpose.



### **5.2.5. Conclusions**

This study presents a simple and validated stability-indicating RP-LC method for determination NTZ, which separates all the degradation products formed under variety of conditons. The method proved to be linear, sensitive, precise, accurate, specific, and selective. The proposed method is suitable and recommended for the routine quality control of NTZ in tablets and powder for oral suspension.

### **5.2.6. Acknowledgement**

The authors thank to CAPES (Brazil) by the financial support.

### **5.2.7. References**

1. White C (2004) *Expert Rev Anti-infect Ther* 2:43–50
2. Fox LM, Saravolatz LD (2005) *Clin Infect Dis* 40:1173–1180
3. Raether W, Hänel H (2003) *Parasit Res* 90:S19–S39
4. Stockis A, Deroubaix X, Lins R, Jeanbaptiste B, Calderon P, Rossignol JF (1996) *Int J Clin Pharmacol Ther* 34:349–351
5. Broekhuysen J, Stockis A, Lins RL, De Graeve J, Rossignol JF (2000) *Int J Clin Pharmacol Ther* 38:387–394
6. Kapse GK, Prabhakar G, Raju SA (2006) *Indian J Pharm Sci* 68:403–406

7. Gopu CL, Thomas S, Paradkar AR, Mahadik KR (2007) J Sci Ind Res 66:141–145
8. ICH (2005) In: International conference on Harmonization of technical requirements for registration of pharmaceuticals for human use, Validation of analytical procedures: Text and Methodology Q2(R1), Switzerland
9. The United States Pharmacopoeia 30<sup>th</sup> (2007) Rockville, MD
10. Bakshi M, Singh S (2002) J Pharm Biomed Anal 28:1011–1040
11. ICH (2003) In: International conference on Harmonization of technical requirements for registration of pharmaceuticals for human use, Stability testing of new drug substance and products Q1A(R2), Switzerland
12. Breier AR, Steppe M, Schapoval EES (2006) Chromatographia 64:725–729
13. Snyder LR, Kirkland JJ, Glajch JL (1997) Practical HPLC method development and validation. In: John Wiley & Sons Inc. (2<sup>nd</sup> ed). New York, USA, p. 765
14. Lindsay S (1992) High performance liquid chromatography. In: John Wiley & Sons Inc. (2<sup>nd</sup> ed). New York, USA, p. 337
15. FDA (1994) Center of Drug Evaluation and Research. Reviewer guidance: validation of chromatographic methods, Rockville, MD

---

**5.3 ARTIGO CIENTÍFICO ESPECTROFOTOMETRIA NO UV – Development of a Simple, Rapid and Validated Spectrophotometric Method for Nitazoxanide in Pharmaceutical Formulations and Comparison with HPLC**

**Aceito para publicação no periódico Química Nova.**

---



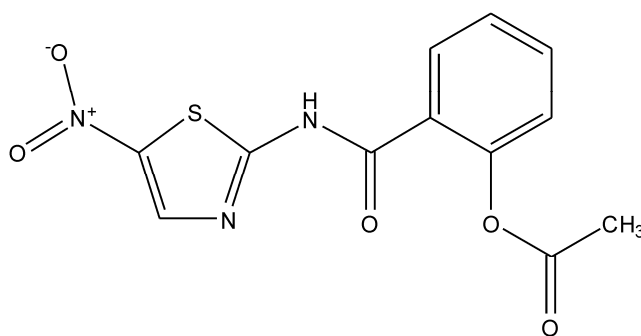
### **5.3.1. Abstract**

A rapid, economical, reproducible, and simple direct spectrophotometric method was developed and validated for the assay of nitazoxanide in pharmaceutical formulations. Nitazoxanide concentration was estimated in water at 345 nm and pH 4.5. The method was suitable and validated for specificity, linearity, precision, and accuracy. There was no interference of the excipients in the determination of the active pharmaceutical ingredient. The proposed method was successfully applied in the determination of nitazoxanide in coated tablets and in powders for oral suspension. This method was compared to a previously developed and validated method for liquid chromatography to the same drug. There was no significant difference between these methods for nitazoxanide quantitation.

Keywords: Keywords: Nitazoxanide; UV-spectrophotometry; Method validation

### 5.3.2. Introduction

Nitazoxanide (NTZ) (Figure 5.2) is a new antiparasitic drug agent of broad-spectrum. Its chemical structure is 2-acetyloxy-N-(5-nitro-2-thiazolyl) benzamide.<sup>1</sup> NTZ is a new nitrothiazole benzamide compound that is notable for its activity in treating both intestinal protozoal and helminthic intestinal infections.<sup>2</sup> It was first described in 1975 by Jean Francois Rossignol and was initially developed as a veterinary antihelminthic with activity against intestinal nematodes, cestodes, and trematodes.<sup>1,3</sup> In Humans, NTZ was approved by US Food and Drug Administration (FDA) in 2002.<sup>3</sup> The NTZ was been reported to be effective against a broad range of parasites, including *Entamoeba histolytica*, *Cryptosporidium parvum*, *Giardia lamblia*, *Trichomonas vaginalis*, *Isospora belli*, *Ascaris lumbricoides*, *Taenia saginata*, *Taenia solium*.<sup>3-5</sup> Its precise mechanism of action is unknown, but studies have shown that NTZ inhibits pyruvate ferredoxin oxireductase (PFOR) enzyme-dependent electron transfer reactions essential to anaerobic energy metabolism in these organisms.<sup>3,6</sup>



**FIGURE 5.2.** Chemical structure of NTZ.

NTZ is currently available in coated tablets and powders for oral suspension. An official method for the determination of this drug in oral formulation has not been described yet. However, there are works describing the determination of NTZ and its metabolites in biological fluids by liquid chromatography (LC) and LC-mass spectrometry (LC-MS).<sup>7-9</sup> Recently, methods for the estimation of NTZ in bulk and

pharmaceutical formulations were developed in visible spectrophotometry,<sup>10</sup> high-performance thin-layer chromatography (HPTLC) and LC.<sup>11-14</sup>

Several of these methods require the use of hazardous and expensive chemicals, which make the process not only a challenge for the environment but also complex and time consuming. Chromatographic techniques are time consuming, costly and require expertise. The development of a simple and accurate UV-spectrophotometric method can provide a very useful alternative for routine analysis of pharmaceutical formulations.<sup>15-18</sup>

In the current literature, there is no publication concerning UV-spectrophotometric determination of NTZ. The purpose of this work is to present the development and validation of a simple, fast, and environmental friendly and direct UV-spectrophotometric method for routine analysis of the NTZ in coated tablets and powder for oral suspension. We also present the comparison of our results with those obtained from LC analysis.

### **5.3.3. Experimental**

#### **Chemicals and reagents**

NTZ used as reference substance (assigned purity, 99.53%) was kindly supplied by Shin Yang–Hangzhou Shinyang Samwoo Fine Chemical CO. (Ningbo, China). According to guidelines and USP pharmacopeia for the quality control of drugs the use of a reference substance with checked purity is mandatory.<sup>19,20</sup> The NTZ standard in use was analyzed by analytical techniques such as: LC-MS spectrometry, differential scanning calorimetric (DSC), infrared absorption spectroscopy, and <sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C nuclear magnetic resonance spectroscopy. No impurities were found.

Nixoran<sup>®</sup> (manufactured by Roemmers, Buenos Aires, Argentina) coated tablets for oral administration (500 mg per tablet, excipients: maize starch, pregelatinized starch, hydroxypropyl methylcellulose, sodium starch glycollate, talc,

magnesium stearate, triacetin, iron oxide yellow, titanium dioxide, polyethylene glycol 6000) and Alinia<sup>®</sup> (manufactured by Romark Laboratories, Tampa, FL, USA) powder for oral suspension (1.2 g per bottle, excipients: sodium benzoate, sucrose, xanthan gum, microcrystalline cellulose and carboxymethylcellulose sodium, anhydrous citric acid, sodium citrate dihydrate, acacia gum, sugar syrup, FD&C Red #40 and natural strawberry flavoring) were purchased. Chemicals of analytical reagent grade were used in our analysis. Acetonitrile and o-phosphoric acid were obtained from Merck (Darmstadt, Germany). Distilled water was used to prepare all solutions for the UV method.

### **Instrumentation and conditions**

Spectral and absorbance measurements were made with a UV-Vis Shimadzu model UV 160A, using 10 mm quartz cells and detection at 345 nm.

### **Standard solution preparation**

A stock solution of 100  $\mu\text{g mL}^{-1}$  NTZ reference substance was prepared by dissolving 10 mg of drug in 100 mL of acetonitrile in a volumetric flask. An aliquot of 3 mL of this solution was transferred into 25 mL volumetric flask, marking up to volume with water previously adjusted to pH 4.5 by addition of o-phosphoric acid 10 % in order to give a final concentration of 12  $\mu\text{g mL}^{-1}$  (working solution).

### **Sample preparation**

Twenty tablets were weighed and crushed to a fine powder. An accurately weighed amount of tablet powder equivalent to 15 mg of NTZ was transferred to a 100 mL volumetric flask with 50 mL of acetonitrile and sonicated for 10 min, followed by adding the same solvent to make up the volume. After filtration, an aliquot of 2.0 mL of this solution was transferred into a 25 mL volumetric flask and marked up to volume with water at pH 4.5 in order to produce a final concentration of 12  $\mu\text{g mL}^{-1}$



(working solution). The same procedure was carried out in powder for oral suspension.

## **Method validation**

The developed analytical method was validated following ICH guidelines and USP requirements.<sup>19,20</sup>

### **Linearity**

Stock solution ( $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) of NTZ was prepared in acetonitrile and distinct aliquots were transferred to several volumetric flasks and marked up to volume with water at pH 4.5 in order to produce a final concentration of 2, 4, 8, 12, 16 and  $20 \mu\text{g mL}^{-1}$ . Each concentration was prepared in triplicate. The linearity was evaluated by linear regression analysis, which was calculated by the least square regression method.

### **Specificity**

The evaluation of the specificity of the method was performed by preparing placebos of tablet as well as powder for oral suspension containing the same excipients of the commercial products. Placebo solutions ( $12 \mu\text{g mL}^{-1}$  in theory) were prepared using the same procedure described for the *Sample Preparations* ( $n = 3$ ). In a separate study, drug with the same concentration was prepared independently from pure drug stock and analyzed. All the solutions were scanned from 400 to 200 nm and checked for any interference in the absorbance at all tested wavelengths (figures 5.3 and 5.4).

### **Precision**

The precision of the method was determined by repeatability (intra-day precision) and intermediate precision (inter-day precision) and was expressed as relative standard deviation (RSD%) of a series of measurement. The repeatability was evaluated by assaying six samples of each pharmaceutical formulation, at the

same concentration ( $12 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) during the same day. The intermediate precision was studied by comparing the results obtained on three different days.

### **Accuracy**

This parameter was determined by the recovery test, that consisted on adding known amounts of reference solution to the sample solutions (prepared according to "Sample preparation"). Aliquots of 0.5, 1.0, and 1.5 mL of NTZ standard solution  $100 \mu\text{g mL}^{-1}$  were transferred to the sample solutions during the last dilution of the samples. The final concentration of reference standard in each level was: 2, 4, and  $6 \mu\text{g mL}^{-1}$ .

### **Robustness**

Robustness of the proposed method was determined by changing the pH of the media in  $\pm 0.2$  units and by maintaining the solutions at room temperature ( $25 \pm 2$  °C) for 3 h to test the stability of NTZ in the working diluent (water at pH 4.5).

### **LC apparatus and conditions**

The LC system consisted of a Shimadzu LC-10AD<sub>VP</sub> pump, a SPD-M10A<sub>VP</sub> Photo Diode Array (PDA), a SCL-10A<sub>VP</sub> system controller, CTO-10AC<sub>VP</sub> column oven, SIL-10AD<sub>VP</sub> auto injector, and a degasser module DGU-14A. Data were acquired and processed by Shimadzu Class-VP<sup>®</sup> V 6.14 software program (Shimadzu, Kyoto, Japan). The LC method previously developed and validated by our research group was used for comparison with the proposed spectrophotometric method<sup>14</sup>. The column utilized was a Phenomenex<sup>®</sup> (Torrance, CA, USA) Synergi Fusion C<sub>18</sub> column (250 mm x 4.6 mm, i.d., 4  $\mu\text{m}$  particle size) coupled to a C<sub>18</sub> guard column (4.0 mm x 3.0 mm, i.d., 4  $\mu\text{m}$ ). The Shimadzu LC system was operated isocratically at 25 °C with a mobile phase of *o*-phosphoric acid 0.1 % (v/v) pH 6.0 adjusted by addition of triethylamine:acetonitrile (45:55, v/v), run at a flow-rate of 1.0 mL min<sup>-1</sup>, and using PDA detection at 240 nm. The injection volume was 20  $\mu\text{l}$  and the quantitation was performed using absolute peak area.

### 5.3.4. Results and discussion

In our previous research paper,<sup>14</sup> we reported a validated LC method for the determination of NTZ in pharmaceutical formulations, but the development of a more convenient, simple, less time-consuming and economical direct UV-spectrophotometric method for routine analysis of NTZ in pharmaceutical formulations is highly desirable.

In this work, different solvents were investigated to develop a suitable UV-spectrophotometric method for the analysis of NTZ in coated tablets and powder for oral suspension. For selection of diluents, the criteria employed were the sensitivity of the method, the easiness of the sample preparation, and the solubility of the drug.

NTZ is poorly soluble in ethanol and methanol, practically insoluble in water, but freely soluble in acetonitrile. By using methanol and ethanol in different proportions as diluent low precision in the drug solubilization was found. Acid (HCl 0.1 N and 0.01 N) and basic (NaOH 0.1 N and 0.01 N) solutions were tested. We found that in acid solution the drug has low solubility. In basic diluents the drug has good solubilization but does not maintain stability. Finally, acetonitrile was used as a first diluent because the total solubilization of the drug in this diluent and its accuracy in results. In order to reduce the use of organic solvent, water at pH 4.5 (adjusted with *o*-phosphoric acid 10 %) was used as diluent. The drug stability studies were accomplished in each solvent for the development and validation of the method. The stability of NTZ in acetonitrile and water at pH 4.5 was evaluated to verify if any spontaneous degradation occurs when the samples are prepared. The data obtained showed that sample solutions were stable during 3 h when stored at room temperature. Apparent molar absorptivity of the drug was found to be  $15.7 \times 10^3 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  in water at pH 4.5 and at 345 nm.

Before applying an analytical method it is mandatory that we validate it. The validation testifies that the procedure is suitable for the intended purpose. The analytical method was validated in relation to parameters such as linearity, specificity, precision, accuracy, and robustness.<sup>19,20</sup>

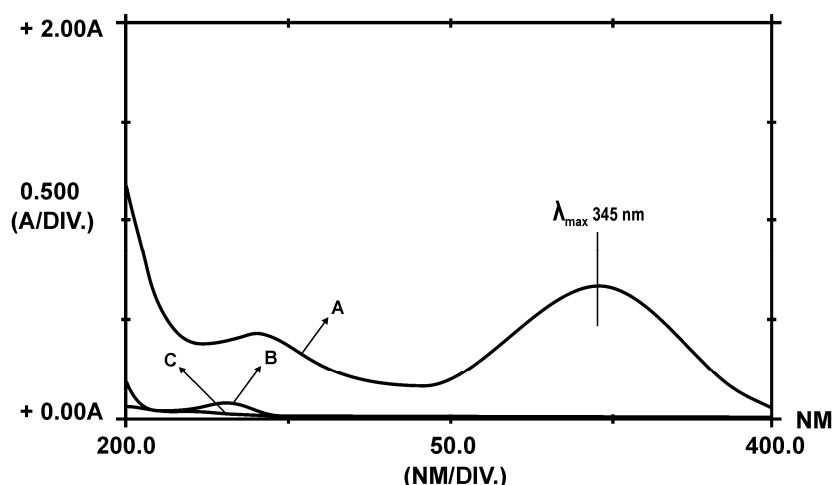
The linearity was established by least squares linear regression analysis of the calibration curve. The regression equation for NTZ was found by plotting peak absorbance ( $y$ ) versus concentration ( $x$ ) in the range of 2 – 20  $\mu\text{g mL}^{-1}$ . The representative linear equation was  $y = 0.0524x + 0.0016$ , and the correlation coefficient ( $r = 0.9999$ ) was highly significant. The validity of the assay was verified by means of ANOVA (SAS 6.11 for windows, SAS Institute Inc. CARY, NC, USA), which demonstrated significant linear regression:

$$F_{\text{calculated}} = 204931 > F_{\text{critical}} = 4.75; p < 0.05$$

and no significant linearity deviation:

$$F_{\text{calculated}} = 1.45 < F_{\text{critical}} = 3.26; p < 0.05$$

The specificity test demonstrated that there was no interference in the determination of the drug. The UV-spectrum of NTZ was not changed in the presence of common excipients, used in the formulation of coated tablets and powder for oral suspension, in the  $\lambda_{\text{max}}$  345 nm of NTZ. As shown in figure 5.3, the excipients present functional groups that absorb in the UV wavelength range of 200 – 250 nm, in the tested conditions.



**FIGURE 5.3.** UV spectrum obtained through the analysis of nitazoxanide standard solution (A), placebo solution of powder for oral suspension (B), and placebo solution of coated tablets (C).

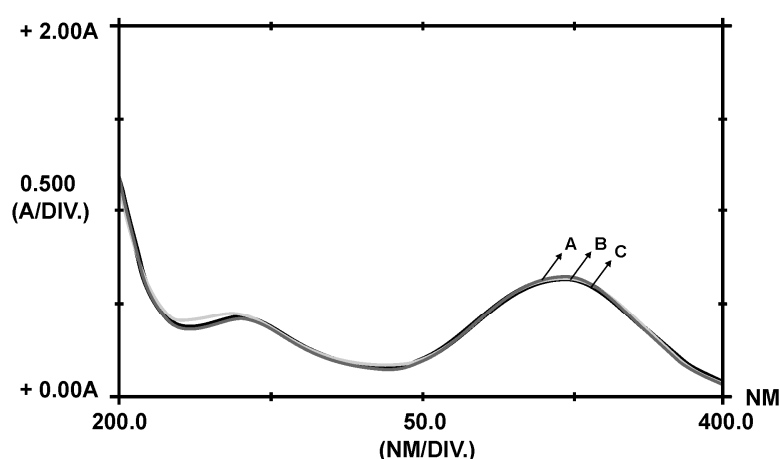
Precision was determined by studying the repeatability and intermediate precision. The experimental values obtained for the determination of NTZ in samples

are presented in Table 5.3. The precision results (RSD %) of the assay were 0.58, 0.50, and 0.56 % in coated tablets and 0.91, 0.99, 1.07 % in powder for oral suspension. The variability of the results was low with RSD values of less than 1.1 % for intra-day, and the values of inter-day was 0.73 % in coated tablets and 0.57 % for powder for oral suspension. RSD values found for the analytical method were within the acceptable range indicating that this method has excellent repeatability and intermediate precision. The Figure 5.4 shows an UV spectrum of NTZ standard solution and commercial samples solutions.

**TABLE 5.3.** Precision results of UV-spectrophotometric assay of NTZ in tablets and powder for oral suspension.

| Dosage forms               | Intra-day precision          |                              |                              | Inter-day precision <sup>a</sup><br>mean ± RSD% |
|----------------------------|------------------------------|------------------------------|------------------------------|-------------------------------------------------|
|                            | Day 1 (n = 6)<br>mean ± RSD% | Day 2 (n = 6)<br>mean ± RSD% | Day 3 (n = 6)<br>mean ± RSD% |                                                 |
| Tablets                    | 100.48 ± 0.58                | 99.16 ± 0.50                 | 100.38 ± 0.56                | 100.01 ± 0.73                                   |
| Powder for oral suspension | 100.2 ± 0.91                 | 100.13 ± 0.99                | 101.16 ± 1.07                | 100.5 ± 0.57                                    |

<sup>a</sup> Data expressed as mean of three days.



**FIGURE 5.4.** UV spectrum obtained through the analysis of NTZ standard solution (A) and commercial samples solutions of powder for oral suspension solution (B) and coated tablets (C).

The excellent mean percentage recovery values, about 100 %, and their low relative standard deviation values (RSD ≤ 1.0 %) were found satisfactory. At each

level of the NTZ concentration three determinations were performed. The mean recovery was 99.06 % (RSD = 1.0 %) for coated tablets and 99.97 % (RSD = 0.9 %) in powder for oral suspension (Table 5.4). These results revealed that any small change in drug concentration in these solutions could be accurately determined by the proposed analytical method.

**TABLE 5.4.** Experimental values obtained in the recovery test for NTZ by using the UV-spectrophotometric method.

| Dosage forms               | Amount of standard ( $\mu\text{g ml}^{-1}$ ) |                    | Recovery (%) | Mean $\pm$ RSD% |
|----------------------------|----------------------------------------------|--------------------|--------------|-----------------|
|                            | Added                                        | Found <sup>a</sup> |              |                 |
| Tablets                    | 2.00                                         | 2.00               | 100.0        | 99.06 $\pm$ 1.0 |
|                            | 4.00                                         | 3.92               | 98.00        |                 |
|                            | 6.00                                         | 5.95               | 99.17        |                 |
| Powder for oral suspension | 2.00                                         | 2.02               | 101.0        | 99.97 $\pm$ 0.9 |
|                            | 4.00                                         | 3.99               | 99.75        |                 |
|                            | 6.00                                         | 5.95               | 99.17        |                 |

<sup>a</sup> Data expressed as mean of three determinations.

The robustness was determined with changes in the pH. Variation of pH of the selected media by  $\pm 0.2$  did not have any effect on the absorbance value of NTZ. The assay values of NTZ were found 99.34 % (RSD = 0.45 %,  $n = 3$ ) in coated tablets and 99.71 % (RSD = 0.35 %,  $n = 3$ ) in powder for oral suspension. The NTZ solutions (coated tablets and powder for oral suspension) in working solutions exhibited no spectrophotometric changes over a period of 3 h when kept at room temperature.

### Comparison between UV-spectrophotometric method and LC method

The analytical methods were compared using statistical analysis. The Student's  $t$ -test was applied and did not reveal discrepancy between the experimental values obtained in the sample analysis by the two methods. The calculated  $t$ -values ( $t_{\text{calculated}} = 1.52$  for coated tablets and  $t_{\text{calculated}} = 0.92$  in powder

for oral suspension) were found to be less than the critical  $t$ -values ( $t_{\text{critical}} = 2.07$  for coated tablets and  $t_{\text{critical}} = 2.07$  in powder for oral suspension) at 5 % significance level. The developed and validated methods provided similar results for NTZ quantitation. Then, the proposed method can be applied directly and easily to the oral pharmaceutical preparations of NTZ.

### 5.3.5. Conclusion

This work presents a simple and validated UV-spectrophotometric method for the determination of NTZ in pharmaceutical formulations. The method was validated showing satisfactory data for all parameters tested. Thus, it offers advantages over other analytical methods due to its rapidity, simplicity, and lower cost. There is no significant difference between the previously validated LC method and UV-spectrophotometric method. Therefore, the proposed method is suitable and can be conveniently used for the routine quality control of NTZ in coated tablets and powder for oral suspension.

### 5.3.6. Acknowledgments

The authors thank CAPES (Brazil) for the financial support.

### 5.3.7. References

1. Rossignol, J. F.; Cavier, R. *Chem. Abst.* **1975**, 83, abstract 28216n.
2. Raether, W.; Hänel, H.; *Parasitol. Res.* **2003**, 90, S19.
3. Fox, L. M.; Saravolatz, L. D.; *Clin. Infect. Dis.* **2005**, 40, 1173.

4. Cabello, R. R.; Guerro, L. R.; Garcia, M. R. M.; Cruz, A. G.; *T. Roy. Soc. Trop. Med. H.* **1997**, *91*, 701.
5. Abaza, H.; El-zayadi, A. R.; Kabil, S. M.; Rizk, H.; *Curr. Ther. Res.* **1998**, *59*, 116.
6. White, A. C.; *Expert Rev. Anti Infect. Ther.* **2004**, *2*, 43.
7. Stockis, A.; Deroubaix, X.; Lins, R.; Jeanbaptiste, B.; Calderon, P.; Rossignol, J. F.; *Int. J. Clin. Pharm. Th.* **1996**, *34*, 349.
8. Broekhuysen, J.; Stockis, A.; Lins, R. L.; DE Graeve, J.; Rossignol, J. F.; *Int. J. Clin. Pharm. Th.* **2000**, *38*, 387.
9. Zhao, Z.; Zhang, L.; Xue, F.; Wang, X.; Zheng, W.; Zhang, T.; Fei, C.; Zhang, K.; Qiu, M.; Xin, R.; Yang, F.; *J. Chromatogr., B* **2008**, *875*, 427.
10. Kapse, G. K.; Prabhakar, G.; Appala, R. S.; *Indian J. Pharm. Sci.* **2006**, *68*, 403.
11. Gopu, C. L.; Thomas, S.; Paradkar, A. R.; Mahadik, K. R.; *J. Sci. Ind. Res.* **2007**, *66*, 141.
12. Jadhav, A. S.; Pathare, D. B.; Shingare, M. S.; *Chromatographia* **2007**, *66*, 595.
13. Rane, V. P.; Sangshetti, J. N.; Patil, K. R.; Yeole, R. D.; Shinde, D. B.; *Chromatographia* **2008**, *67*, 455.
14. Malesuik, M. D.; Cardoso, S. G.; Steppe, M.; *Chromatographia* **2008**, *67*, 131.
15. Nascimento, A. P.; Trevisan, M. G.; Kedor-Hackmann, E. R. M.; Poppi, R. J.; *Anal. Lett.* **2007**, *40*, 975.
16. Breier, A. R.; Steppe, M.; Schapoval, E. E. S.; *Anal. Lett.* **2007**, *40*, 2329.
17. Pattanayak, P.; Sharma, R.; Chaturvedi, S. C.; *Anal. Lett.* **2007**, *40*, 2288.
18. Valladão, D. M. S.; Ionashiro, M.; Netto, J. Z.; *Quim. Nova* **2008**, *31*, 44.
19. ICH. International Conference on Harmonization of technical requirements for registration of pharmaceuticals for human use, 2005.



20. USP 32. *The United States Pharmacopoeia*, 32 th Edn.; United States Pharmacopeial Convention.: Rockville, 2009.



---

**5.4. ARTIGO CIENTÍFICO EC – Stability-indicating CZE Method and Stress Degradation Studies of Nitazoxanide**

**Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies, v 33, p. 375-389, 2010.**

---



#### 5.4.1. Abstract

A new, simple and effective stability-indicating CZE method was developed and validated for the determination of nitazoxanide in pharmaceutical formulations, using nimesulide as an internal standard. The optimum separation was carried out on a fused-silica capillary (48.5 cm x 75  $\mu\text{m}$  i.d., effective length 40 cm) maintained at 25  $^{\circ}\text{C}$ , and a running electrolyte containing sodium acetate buffer (pH 5.2; 30 mM)-acetonitrile (80:20, V/V). The injections of the samples were performed using the pressure mode at 50 mbar for 5 s, with detection at 360 nm using a photodiode array detector. The method was suitably validated for specificity, linearity, precision, accuracy, limit of detection and quantitation, and robustness. The high sensitivity of the method was proved with the limit of detection ( $0.05 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) and quantitation ( $0.2 \mu\text{g mL}^{-1}$ ). The stability-indicating capability of the method was proved using stress conditions (acid and basic hydrolysis, oxidation and photolysis). The proposed method was successfully applied for the determination of nitazoxanide in coated tablets and oral suspension powder.

*Keywords:* Nitazoxanide; Capillary Zone Electrophoresis; Stability-indicating Method; Stress Degradation Studies

### 5.4.2. Introduction

According to the World Health Organization intestinal parasitic infections are among the most common infectious diseases in humans worldwide and are a significant cause of morbidity and mortality. Nitazoxanide (NTZ) is a new broad-spectrum antiparasitic drug agent. It is a new nitrothiazole benzamide compound (2-acetyloxyl-N-(5-nitro-2-thiazolyl) benzamide) notable for its activity in treating both intestinal protozoal and helminthic infections [1]. It was first described in 1975 by Jean Francois Rossignol and was initially developed as a veterinary antihelminthic with activity against intestinal nematodes, cestodes, and trematodes. In humans, NTZ was approved by US Food and Drug Administration (FDA) in 2002 [2]. It is the first agent with proven efficacy for the treatment of cryptosporidiosis and giardiasis in children and adults. Its precise mechanism of action is unknown, but studies have shown that NTZ inhibits pyruvate ferredoxin oxireductase (PFOR) enzyme dependent electron transfer reactions essential to anaerobic energy metabolism in these organisms [1,2].

NTZ is currently available in coated tablets (500mg) and powder for oral suspension (100mg/5ml). An official method for the determination of this drug in oral formulation has not been described yet. Literature concerning the quantitative determination of NTZ is relatively limited. However, there are studies describing the determination of NTZ and metabolites in biological fluids by liquid chromatography (LC) [3] and LC-MS [4,5]. Recently, visible spectrophotometrics [6], high-performance thin-layer chromatographic (HPTLC) [7] and LC methods for the estimation of NTZ in bulk and pharmaceuticals formulations were developed [8-10].

Capillary electrophoresis (CE) has emerged as a powerful analytical technique for pharmaceutical analysis, with distinct applicability toward the separation of compounds of different chemical character, size, and structural features. In pharmaceutical analysis, this separation technique is well established and shows many advantages, such as simple instrumentation, good efficacy, precision, and rapid analysis [11,12]. In some fields, CE is currently displacing LC due to its many advantageous features, such as extremely high efficiency, high resolution, rapid

analysis, small consumption of sample and reagents, and reduced cost of the operation, because no packed column, pumps or mobile phase gradient are used. However, at the present moment there is no stability-indicating CZE method published for the determination of NTZ. A stability-indicating method detects the changes in the pertinent properties of the drug substance and measures the active ingredients and/or its degradation products without interference from other degradation products, excipients, or other potential impurities [13-16].

The aim of the present study was to develop and validate a simple, rapid, and stability-indicating CZE method for the determination of NTZ in coated tablets and powder for oral suspension. We also present, here, the comparison between these results and the ones obtained from the LC analysis.

### **5.4.3. Experimental**

#### **Chemicals and reagents**

NTZ used as reference substance (assigned purity, 99.53%) was kindly supplied by Shin Yang–Hangzhou Shinyang Samwoo Fine Chemical CO. (Ningbo, China), and nimesulide (internal standard, IS) was purchased from Brazilian Pharmacopoeia. According to guidelines for drugs quality control the use of reference substance with checked purity is necessary [17,18]. The NTZ standard used was analyzed by analytical techniques such as: LC-mass spectrometry, differential scanning calorimetric (DSC), infrared absorption spectroscopy, and <sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C nuclear magnetic resonance spectroscopy. No impurities were found.

Nixoran<sup>®</sup> (manufactured by Roemmers, Buenos Aires, Argentina) coated tablets for oral administration (500mg per tablet, excipients: maize starch, pregelatinized starch, hydroxypropyl methylcellulose, sodium starch glycollate, talc, magnesium stearate, triacetin, iron oxide yellow, titanium dioxide, polyethylene glycol 6000) and Alinia<sup>®</sup> (manufactured by Romark Laboratories, Tampa, FL, USA) powder for oral suspension (100mg/5mL, excipients: sodium benzoate, sucrose, xanthan gum, microcrystalline cellulose and carboxymethylcellulose sodium, anhydrous citric

acid, sodium citrate dihydrate, acacia gum, sugar syrup, FD&C Red #40 and natural strawberry flavoring) were purchased. All chemicals used were of pharmaceutical or special analytical grade. All solutions were degassed by ultrasonication and filtered through a membrane diameter of 0.45 $\mu$ m.

### **CZE apparatus and conditions**

The CE instrument model HP<sup>3D</sup> was purchased from Hewlett-Packard (Waldbronn, Germany) and consisted of a photodiode array (PDA) detector, automatic injector, and temperature control system. The apparatus was connected to a personal computer equipped with a HP Chemstation CE software (rev. A.06.03 Hewlett-Packard) used for instrument control, data acquisition, and data analysis. At the beginning of each working day, the capillary was conditioned by rinsing with 0.1 M sodium hydroxide for 15 min, followed by water for 15 min, and then with running electrolyte for 30 min. The electrolyte solution was prepared and filtered in the analysis day. To achieve high migration time and reproducibility among injections, the capillary was conditioned with 0.1 M sodium hydroxide (1.5 min), water (1.5 min), and a running buffer (2 min). All experiments were carried out on a fused-silica capillary (Agilent, Waldbronn, Germany) with 75  $\mu$ m i.d. and 48.5 cm of total length (effective length 40 cm), thermostated at 25°C, and detected at 360 nm using a PDA detector. Samples were injected using the pressure mode for 5 s at 50 mbar and a constant voltage of 25 kV (current about 45  $\mu$ A) was applied during the analysis. The running electrolyte consisted of a mixture of 30 mM sodium acetate buffer at pH 5.2 (adjusted by addition of glacial acetic acid)-acetonitrile (80:20, V/V).

### **Preparation of reference substance solution**

Standard stock solutions of NTZ and nimesulide (IS) were prepared in acetonitrile. A stock solution of 100  $\mu$ g mL<sup>-1</sup> NTZ reference substance was prepared in a volumetric flask by dissolving 10 mg of the drug in 100 mL of acetonitrile. Aliquots of 3 mL of this solution and 2 mL of the IS solution (200  $\mu$ g mL<sup>-1</sup>) were transferred into 10 mL volumetric flask and the same solvent was added to complete



the volume in order to give a final concentration of  $30 \mu\text{g mL}^{-1}$  (NTZ) and  $40 \mu\text{g mL}^{-1}$  (IS).

### **Preparation of sample solution**

Twenty tablets were weighed and crushed to a fine powder. An accurately weighed amount of tablet powder and oral suspension powder equivalent to 10 mg of NTZ were transferred to a 100 mL volumetric flask with 50 mL of acetonitrile and sonicated for 10 min, followed by adding the same solvent to complete the volume. After filtration, 3 mL of this solution and 2 mL of IS solution were transferred into 10 mL volumetric flask. The same solvent was added to complete the volume in order to give a final concentration of  $30 \mu\text{g mL}^{-1}$  (NTZ) and  $40 \mu\text{g mL}^{-1}$  (IS).

### **System suitability test**

A system suitability test of the CZE system was performed before each validation run using five replicate injections of a standard solution. Theoretical plates, tailing factor, resolution, and injection repeatability were determined.

### **Degradation studies**

In order to establish if the proposed method is stability-indicating, pure active pharmaceutical ingredient of NTZ was stressed under different conditions to conduct forced degradation studies [13]. The drug is poorly soluble in ethanol and practically insoluble in water, but freely soluble in acetonitrile. The NTZ solutions for acid hydrolysis were prepared by dissolving the drug in small volume of acetonitrile (5%, v/v) and then diluted with aqueous hydrochloric acid to achieve a concentration of  $1 \text{ mg mL}^{-1}$ . The acid hydrolysis was performed in 0.1 M HCl at  $80^\circ\text{C}$  for 1 h, after the sample was cooled at room temperature and neutralized. The study in alkaline condition was carried out in 0.01 M NaOH at room temperature ( $24 \pm 2^\circ\text{C}$ ) for 2 h and

neutralized. An aliquot of each solution was diluted with acetonitrile to give a final concentration of  $30 \mu\text{g mL}^{-1}$ .

The oxidative reaction was performed dissolving NTZ in a small volume of acetonitrile (5%, v/v) and then diluted with 3%  $\text{H}_2\text{O}_2$  ( $1 \text{ mg mL}^{-1}$ ), at room temperature. An aliquot of this solution was diluted in acetonitrile to give a final concentration of  $30 \mu\text{g mL}^{-1}$ .

The stress degradation study in direct UV radiation (254 nm) was performed exposing the NTZ solution in acetonitrile ( $1 \text{ mg mL}^{-1}$ ) for 15 min at room temperature in a photostability chamber provided with mirrors. The distance between the lamp and the samples was 10 cm. After, this solution was diluted to  $30 \mu\text{g mL}^{-1}$  in acetonitrile. Samples submitted to identical conditions, but protected of light, were used as a control.

Peak purity test performed by photodiode array detector was useful to show that the analyte chromatographic peak did not contain more than one substance.

## **Validation of the method**

The developed analytical method was validated according to ICH guidelines [17] and USP requirements [18].

## **Linearity**

Linearity was determined by constructing three calibration curves each one with five calibration points of NTZ. Stock solution ( $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) of NTZ was prepared in acetonitrile and aliquots were transferred to volumetric flasks to obtain the final concentration of 10, 20, 30, 40, and  $50 \mu\text{g mL}^{-1}$ . In all cases,  $40 \mu\text{g mL}^{-1}$  of nimesulide were added as internal standard. Three replicate injections of each reference substance solution were made to verify the repeatability of the detector response. The peak area ratio of NTZ and IS was used for plotting the graph, and the linearity was evaluated by the least-square regression analysis.

## **Specificity**

Forced degradation studies were performed to evaluate the stability-indicating power of the proposed method. The interference of the excipients of the pharmaceutical formulations was determined by the injection of a sample containing only placebo (in-house mixture of tablet and oral suspension powder excipients) and a sample containing placebo added with NTZ at a concentration of  $30 \mu\text{g mL}^{-1}$  ( $40 \mu\text{g mL}^{-1}$  of nimesulide was added as internal standard). Then, the specificity of the method was established by determining the peak purity of NTZ in the degraded samples using a PDA detector.

## **Precision**

The precision of the method was determined by repeatability (intra-day precision) and intermediate precision (inter-day precision) and was expressed as relative standard deviation (RSD%) of a measurement series. The repeatability was examined by six evaluations of the same concentration of NTZ ( $30 \mu\text{g mL}^{-1}$  and IS), on the same day, under the same experimental conditions. The intermediate precision of the method was assessed by carrying out the analysis on three different days (inter-days) and also by other analyst performing the analysis in the same laboratory (between-analysts).

## **Accuracy**

This parameter was determined by the recovery test, which consisted of adding known amounts of reference substance to the samples solutions at a concentration of  $30 \mu\text{g mL}^{-1}$  (tablets and powder for oral suspension). Aliquots of 1.0, 2.0, and 3.0 mL of a NTZ standard solution (concentration of  $40 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) were transferred to 10 mL volumetric flasks of samples solutions, respectively (4, 8, and 12  $\mu\text{g}$ , respectively), prepared as described above and nimesulide was added as internal standard. Each solution was prepared in triplicate.

## **Limit of Detection (LOD) and Limit of Quantitation (LOQ)**

The LOD and LOQ were determined at a signal-to-noise ratio of 3:1 and 10:1, respectively, by injecting series of dilute solutions with known concentrations. Precision study was also carried out at the LOQ level by injecting three individual

preparations of NTZ and the relative standard deviation of the absolute area of the peak was evaluated.

### **Robustness**

The robustness was determined by analyzing the same samples under different conditions of the parameters method, such as: buffer pH and concentration, capillary temperature, voltage applied, and percentage of acetonitrile in the electrolyte. To assess the stability of NTZ, the samples were maintained at 4 – 8 °C for 48 h, and also placed inside the autosampler at room temperature for 48h.

### **LC apparatus and conditions**

The LC system consisted of a Shimadzu LC-10AD<sub>VP</sub> pump, a SPD-M10A<sub>VP</sub> Diode Array Detector, a SCL-10A<sub>VP</sub> system controller, CTO-10AC<sub>VP</sub> column oven, SIL-10AD<sub>VP</sub> auto injector, and a degasser module DGU-14A. Data were acquired and processed by Shimadzu Class-VP<sup>®</sup> V 6.14 software program (Shimadzu, Kyoto, Japan). The LC method previously developed and validated by our research group was used for comparison with the proposed CE method [9]. The column utilized was a Phenomenex<sup>®</sup> (Torrance, CA, USA) Synergi Fusion C<sub>18</sub> column (250 mm x 4.6 mm, i.d., 4 μm particle size) coupled to a C<sub>18</sub> guard column (4.0 mm x 3.0 mm, i.d., 4 μm). The Shimadzu LC system was operated isocratically at 25 °C using a mobile phase of *o*-phosphoric acid 0.1% (v/v) pH 6.0 (adjusted by addition of triethylamine) : acetonitrile (45:55, v/v), run at a flow-rate of 1.0 mL min<sup>-1</sup>, and using PDA detection at 240 nm. The injection volume was 20 μl of a solution containing 30 μg mL<sup>-1</sup> for both the reference substance and the samples. The quantitation was performed using the absolute area of the peak.

#### 5.4.4. Results and discussion

##### Development and optimization of the electrophoretic conditions

The experimental conditions were chosen after testing the different parameters that influence CE analysis, such as the dissolution medium, temperature, applied voltage, buffer concentration and pH. To develop the CZE method, the influences of these parameters on migration time, peak symmetry, resolution, baseline noise, and electric current were optimized. Because of the relative instability of this drug under acid (pH below 3.0) and basic (pH at least 8.0) conditions, acidic buffers tried to prevent its possible instability. Several running buffers such as phosphate (pH 3.5 – 6.0), citrate (pH 3.5 – 6.0), and acetate (pH 3.5 – 5.5) were tested for CZE analysis. The results demonstrated that NTZ was easily separated from IS in this pH range and the migration times of these compounds were decreased with decreasing pH. Taking into consideration different parameters (migration time, resolution, symmetry, etc.) best results were obtained in acetate buffer. The effect of the buffer pH was investigated within the range of 3.5 – 5.5 at 30 mM acetate buffer concentration. Considering both resolution and migration time, pH 5.2 was selected as optimum.

Buffer concentration has also a significant effect on the separation performance through its influence on the electroosmotic flow (EOF) and on the capillary current. The acetate buffer in the concentration range 10 – 50 mM was evaluated. The 30 mM acetate buffer was selected for its low current and for generating no significant increase on the migration time. The effects of the organic modifiers acetonitrile or methanol, in the concentration range of 5 – 25% (v/v), were also evaluated. Appreciable improvement was observed on the baseline when acetonitrile (20%) was added.

The influence of the temperature on analysis was investigated at 20, 25, and 30 °C, showing that an increase of the capillary temperature results in a decrease of the migration time and an increase of the current. A temperature of 25 °C was chosen due to the short run time, peak symmetry and acceptable current.

The effect of the applied voltage on the separation was studied through changes from 15 to 30 kV. As expected, increasing the applied voltage increases the EOF, leading to shorter analysis time and higher efficiencies. However, higher voltages also exhibited higher currents and increased joule's heating. The potential of 25 kV yielded a short analysis time with an acceptable current (about 45  $\mu$ A).

The drug has two maximum absorptions: at 240 and 360 nm. For the method detection it was applied 360 nm, because of its high molar absorptivity at the conditions used above.

### System suitability test

The system suitability test is an integrated part of the analytical method and it ascertains the suitability and effectiveness of the operating system. It was also carried out to evaluate the resolution and reproducibility of the system for the analysis to be performed, using five replicate injections of a reference substance solution containing 30  $\mu$ g mL<sup>-1</sup> of NTZ and 40  $\mu$ g mL<sup>-1</sup> of IS (Table 5.5). These parameters values were satisfactory in accordance with the literature [19]. The tests ensure that the CZE system generates trustful results. Thus, it was established that the CZE system and procedure are capable of providing acceptable quality data.

**TABLE 5.5.** Results of the system suitability test.

| Parameter                                                     | Nimesulid (IS) <sup>a</sup> | NTZ <sup>a</sup>  |
|---------------------------------------------------------------|-----------------------------|-------------------|
| Theoretical plates                                            | 70470                       | 87548             |
| Tailing factor                                                | 1.5                         | 1.2               |
| Resolution                                                    | -                           | 6.0               |
| Migration time (min)                                          | 3.55 (RSD = 0.2%)           | 3.90 (RSD = 0.7%) |
| The peak area ratio of NTZ to IS<br>(Injection repeatability) | 2.15 (RSD = 0.3%)           |                   |

<sup>a</sup> Mean of five replicates

## Degradation behavior

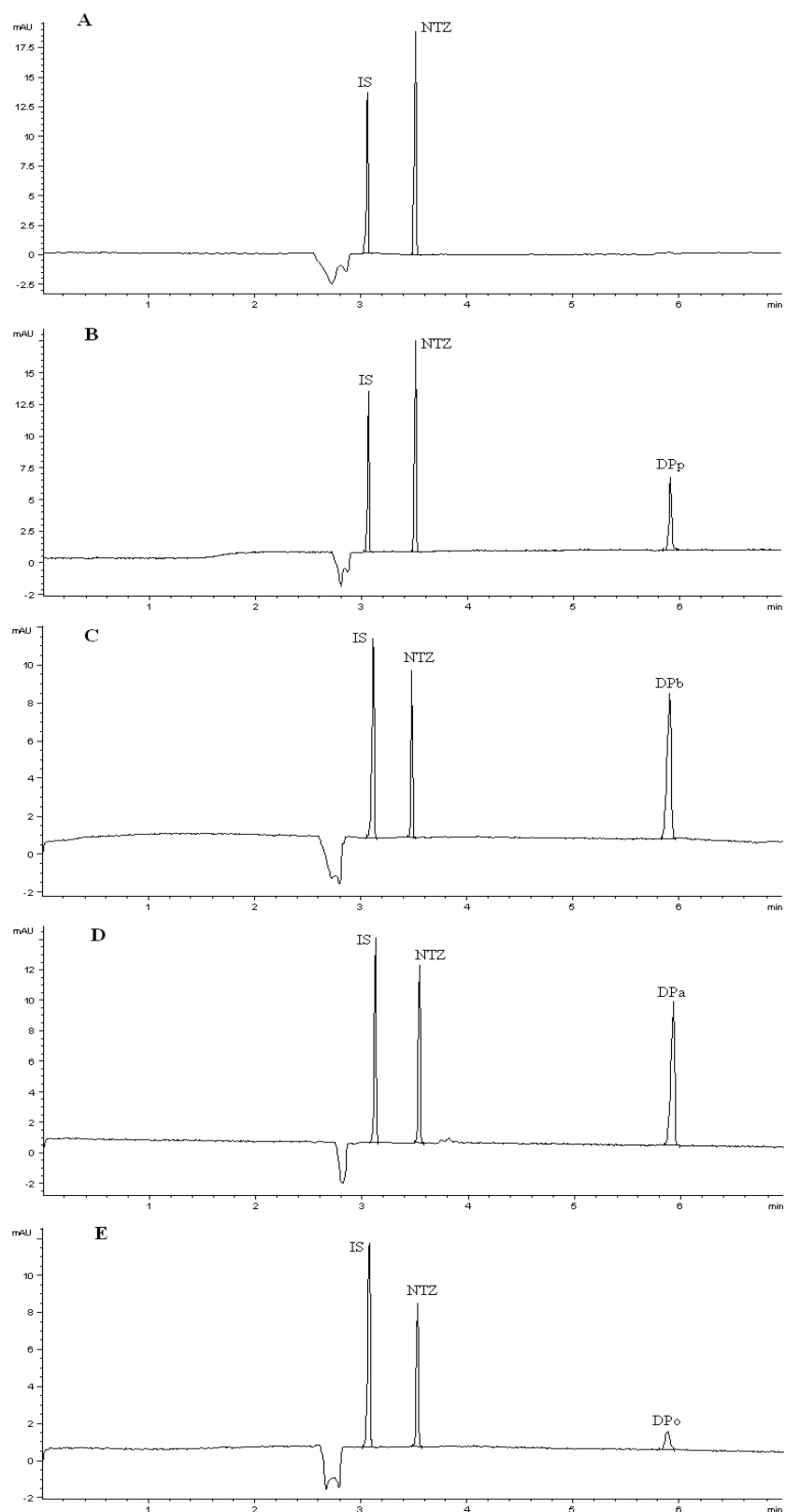
The forced degradation studies were conducted to evaluate the stability-indicating capability and selectivity of the proposed method using the NTZ reference substance. When submitted to acidic, basic, oxidative, and photolytic conditions the eletropherograms showed a significant decrease of the NTZ area and one additional peak at 6.38 min, in all cases (Figure 5.5).

The eletropherogram peak purity tool was applied to verify NTZ and IS peaks, showing that they were 100% pure in all cases. Thus, it was confirmed that there was no interference of any other substance at the drug and IS migration times. Besides, it was observed that the NTZ peak presents appropriate resolution and selectivity in relation to the degradation products.

As it can be observed, the proposed method succeeded in separating the drug from degradation products. Furthermore, the drug can be evaluated both qualitatively and quantitatively in the presence of degradation products. The resolution of all degradation products allows qualitative and quantitative evaluation of the degradation products which is relevant when assessing toxic products. The results indicated that the method is stability-indicating.

Analyzing the diode-array spectrum (200 – 500 nm) of each degradation product it was verified that the products DPP, DPb, DPa, and DPo have the same spectrum and migration time. Therefore, it suggests that they are of the same substance, but the identification of these products was not yet performed.

The results obtained from the degradation studies show that the drug is susceptible to hydrolysis, oxidation and photolysis. Thus, one must be careful when manipulating the drug.



**FIGURE 5.5. A:** Typical eletropherogram for 30.0  $\mu\text{g ml}^{-1}$  NTZ and 40.0  $\mu\text{g ml}^{-1}$  IS solution in the experimental selected conditions; **B:** IS, photo-degraded NTZ, and degradation product DPp; **C:** IS, basic-degraded NTZ, and degradation product DPb; **D:** IS, acid-degraded NTZ, and degradation product DPa; **E:** IS, oxidative-degraded NTZ, and degradation product Dpo.



## Validation of the method

The validation testifies that the procedure is suitable for the intended purpose. The ICH and USP 31 guidelines describe the analytical parameters that should be evaluated in a method validation. The method type and its intended use determine which parameters should be evaluated. It is the analyst responsibility to select the parameters considered relevant for each method [20]. The analytical method was validated for parameters such as linearity, specificity, precision, accuracy, limit of quantification, limit of detection, and robustness. Nimesulide was used as an internal standard to compensate injection errors and minor fluctuations on the migration time, thus improving the reproducibility of the CZE method.

Linearity was established by least squares linear regression analysis of the calibration curve. The calibration curves constructed for NTZ were linear in the 10 – 50  $\mu\text{g mL}^{-1}$  range. The representative linear equation was:  $y = 0.0728 (\pm 0.00054) x - 0.0268 (\pm 0.01804)$  and the correlation coefficient ( $r = 0.9999$ ) was highly significant. The validity of the assay was verified by ANOVA (SAS 6.11 for windows, SAS Institute Inc. CARY, NC, USA), which demonstrated significant linear regression:

$$F_{\text{calculated}} = 7201.41 > F_{\text{critical}} = 10.04; p < 0.05$$

and no significant linearity deviation:

$$F_{\text{calculated}} = 0.40 < F_{\text{critical}} = 3.71; p < 0.05$$

The specificity test demonstrated that there was no interference on the drug and on the IS peaks. No interferences from the stress testing studies, diluents, impurities, and excipients were observed, indicating a high degree of the method specificity for determination of NTZ for both pharmaceutical formulations. The tests with the photodiode array detector showed that there was no co-eluting peak interfering in the analysis of NTZ and IS.

Precision was determined by studying the repeatability and intermediate precision. The experimental values obtained for the determination of NTZ in samples are presented in Table 5.6. The assay precision results (RSD%) were 1.3, 1.6, and 1.4% for coated tablets and 1.0, 0.8, and 1.3% for oral suspension powder. The variability of the results was low with RSD values of less than 1.7% to intra-day, and

the values of inter-day were 1.1% for coated tablets and 0.6% for oral suspension powder. The found RSD values for the analytical method were within the acceptable range indicating that this method has excellent repeatability and intermediate precision.

**TABLE 5.6.** Precision results of CE assay of NTZ in tablets and powder for oral suspension.

| Dosage forms               | Intra-day precision                  |                                      |                                                   | Inter-day precision <sup>b</sup><br>mean ± RSD% |
|----------------------------|--------------------------------------|--------------------------------------|---------------------------------------------------|-------------------------------------------------|
|                            | Day 1 ( <i>n</i> = 6)<br>mean ± RSD% | Day 2 ( <i>n</i> = 6)<br>mean ± RSD% | Day 3 ( <i>n</i> = 6) <sup>a</sup><br>mean ± RSD% |                                                 |
| Tablets                    | 99.14 ± 1.3                          | 98.66 ± 1.6                          | 100.79 ± 1.4                                      | 99.53 ± 1.1                                     |
| Powder for oral suspension | 98.4 ± 1.0                           | 99.4 ± 0.8                           | 99.3 ± 1.3                                        | 99.03 ± 0.6                                     |

<sup>a</sup> Different analyst;

<sup>b</sup> Data expressed as mean of three days.

The excellent mean percentage recovery values, around 100%, and their low relative standard deviation values ( $RSD \leq 1.0\%$ ) were satisfactory. At each level of the NTZ concentration three determinations were performed. The mean recovery was 100.48% ( $RSD = 0.7\%$ ) for coated tablets and 100.58% ( $RSD = 0.8\%$ ) in oral suspension powder. These results revealed that any small change in the solutions drug concentration could be accurately determined by the proposed analytical method.

The LOD of NTZ was achieved at  $0.05 \mu\text{g mL}^{-1}$  for  $20 \mu\text{l}$  injection volume. The LOQ of NTZ was achieved at  $0.2 \mu\text{g mL}^{-1}$ . The concentration of  $0.2 \mu\text{g mL}^{-1}$  was accurately and reliably measured. The precision at the LOQ concentrations of NTZ was 1.0% (RSD%). With such findings in LOD and LOQ we prove that the method is highly sensible.

The results and the experimental range of the evaluated variables in the robustness assessment are given in Table 5.7, with the optimized conditions. Analyses were carried out in triplicate and only one parameter was changed in the experiments at a time. There were no important changes in the CZE pattern when small modifications were made in the experimental conditions, showing, then, that the method is robust. The solutions were also stable during the study period.

**TABLE 5.7.** Capillary electrophoresis conditions and investigated range during robustness testing

| Variable                  | Range investigated | NTZ (%) <sup>a</sup> |                            |
|---------------------------|--------------------|----------------------|----------------------------|
|                           |                    | Tablets              | Powder for oral suspension |
| Buffer pH                 | 5.1                | 100.79               | 99.80                      |
|                           | 5.3                | 98.35                | 98.95                      |
| Buffer concentration (mM) | 28                 | 99.02                | 98.64                      |
|                           | 30                 | 101.90               | 99.19                      |
| Temperature (°C)          | 20                 | 99.97                | 100.23                     |
|                           | 30                 | 99.79                | 100.81                     |
| Voltage (kV)              | 23                 | 100.85               | 99.19                      |
|                           | 27                 | 101.68               | 98.48                      |
| Percent acetonitrile      | 15                 | 99.46                | 101.82                     |
|                           | 25                 | 101.58               | 100.75                     |
| Solution stability        | Autosampler/48 h   | 100.83               | 101.05                     |
|                           | 4 – 8 °C/48 h      | 99.40                | 100.75                     |
| Normal conditions         | -                  | 99.21                | 99.47                      |

<sup>a</sup> Each value is the mean of three analysis

### Comparison between CZE and LC methods

In the spite of the fact that quality control analysis of pharmaceuticals is currently performed predominantly using LC, the number of CE instrumentation is increasing in the pharmaceutical laboratories, because it offers a real and attractive alternative to LC. The CE method developed and validated in this study was

compared with the previous LC method developed by our group. Both methods have some advantages and some drawbacks. However, LC is limited by expensive chromatographic columns and by the consumption of relatively high amounts of chemicals. Nevertheless, CE can offer benefits in terms of providing a faster method development, a lower operating cost, because it requires only few milliliters of running electrolyte, and it decreases the waste generation. Furthermore, CE separation efficiency is greater when sample volumes are very small. The required capillary and electrolyte cost for a specific number of analyses is evidently lower than in LC analysis.

The comparison between results of NTZ quantitative analysis in tablets and oral suspension powder were performed by statistical analysis. The Student's *t*-test was applied and did not reveal significance between the experimental values obtained for the sample analysis by the two methods. The calculated *t*-values were found to be less than the critical *t*-values at 5% significance level. The developed and validated methods provided similar results for NTZ quantitation. Then, the proposed method can be applied directly and easily to the oral pharmaceutical preparations of NTZ.

#### **5.4.5. Conclusions**

A simple and reliable stability-indicating CZE method was developed and validated for the determination of NTZ in pharmaceutical formulations. The method proved to be specific, selective, linear, precise, accurate and sensitive, and it offers a simple, fast, and inexpensive way for the drug determination. The developed method is also stability indicating and can be used for assessing the stability of NTZ in bulk drugs, tablets and oral suspension powder. Therefore, the proposed method was successfully applied as an alternative for the quantitative analysis of NTZ in pharmaceutical formulations, representing an improvement for the quality control, and also contributing to assure the therapeutic efficacy of the drug.

#### **5.4.6. Acknowledgments**

The authors thank CAPES, CNPq and UFRGS (Brazil) for the financial support.

#### **5.4.7. References**

1. Raether W, Hänel H (2003) *Parasit Res* 90:S19–S39
2. Fox LM, Saravolatz LD (2005) *Clin Infect Dis* 40:1173–1180
3. Stockis A, Deroubaix X, Lins R, Jeanbaptiste B, Calderon P, Rossignol JF (1996) *Int J Clin Pharmacol Ther* 34:349–351
4. Broekhuysen J, Stockis A, Lins RL, De Graeve J, Rossignol JF (2000) *Int J Clin Pharmacol Ther* 38:387–394
5. Zhao Z, Zhang L, Xue F, Wang X, Zheng W, Zhang T, Fei C, Zhang K, Qiu M, Xin R, Yang F (2008) *J. Chromatogr. B* doi:10.1016/j.jchromb.2008.09.017
6. Kapse GK, Prabhakar G, Raju SA (2006) *Indian J Pharm Sci* 68:403–406
7. Gopu CL, Thomas S, Paradkar AR, Mahadik KR (2007) *J Sci Ind Res* 66:141–145
8. Jadhav AS, Pathare DB, Shingare MS (2007) *Chromatographia* 66:595–600
9. Malesuik MD, Cardoso SG, Steppe M (2008) *Chromatographia* 67:131–136
10. Rane VP, Sangshetti JN, Patil KR, Yeole RD, Shinde DB (2008) *Chromatographia* 67:455–459
11. Santoro MIRM, Prado MSA, Steppe M, Hackmann ERMK (2000) *Braz J Pharm Sci* 36:97–110
12. Steppe M, Prado MSA, Tavares MFM, Pinto TJA, Hackmann ERMK, Santoro MIRM (2003) *J AOAC Int* 86:707–713

13. Bakshi M, Singh S (2002) J Pharm Biomed Anal 28:1011–1040
14. Shah RB, Bryant A, Collier J, Habib MJ, Khan MA (2008) Int J Pharm 360:77–82
15. Vaucher LC, Paim CS, Lange AD, Schapoval EES (2008) Int J Pharm, doi:10.1016/j.ijpharm. 2008.09.010
16. Sippel J, Sfair LL, Schapoval EES, Steppe M (2008) J AOAC Int 91:67–72
17. ICH Steering Committee (2005) International Conference on Harmonization of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use, Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology, Q2(R1), November, Geneva, Switzerland.
18. The United States Pharmacopoeia 31<sup>th</sup> (2008) Rockville, MD
19. FDA (1994) Center of Drug Evaluation and Research. Reviewer guidance: validation of chromatographic methods, Rockville, MD
20. Ermer J (2001) J Pharm Biomed Anal 24:755–767

## 5.5. ANÁLISE ESTATÍSTICA COMPARATIVA DOS MÉTODOS

Com o objetivo de estabelecer uma comparação e verificar a capacidade de utilizar indistintamente os métodos propostos por CLAE, espectrofotometria no UV e EC para quantificação de NTZ em comprimido revestido e pó para suspensão oral, realizou-se a análise estatística comparativa entre os resultados obtidos de repetibilidade para os três diferentes métodos, através da análise de variância (ANOVA).

### 5.5.1. Resultados

Os resultados obtidos com os métodos por CLAE, espectrofotometria no UV e EC foram comparados estatisticamente por ANOVA e estão apresentados nas Tabelas 5.8 e 5.9, para comprimido revestido e pó para suspensão oral, respectivamente.

**TABELA 5.8.** Análise de variância (ANOVA) dos métodos propostos por CLAE, espectrofotometria no UV e EC para determinação de NTZ em comprimido revestido.

| Fontes de variação | GL | Soma dos Quadrados | Variância | F               |
|--------------------|----|--------------------|-----------|-----------------|
| Entre              | 2  | 0,58084444         | 0,29      | 0,27            |
| Resíduo            | 15 | 16,42191667        | 1,09      | Fcrítico = 3,68 |
| Total              | 17 | 17,00276111        |           |                 |

**TABELA 5.9.** Análise de variância (ANOVA) dos métodos propostos por CLAE, espectrofotometria no UV e EC para determinação de NTZ em pó para suspensão oral.

| Fontes de variação | GL | Soma dos Quadrados | Variância | F               |
|--------------------|----|--------------------|-----------|-----------------|
| Entre              | 2  | 1,94414444         | 0,97      | 1,57            |
| Resíduo            | 15 | 9,30521667         | 0,62      | Fcrítico = 3,68 |
| Total              | 17 | 11,24936111        |           |                 |

### 5.5.2. Discussão

O resultado obtido através da análise de variância – ANOVA demonstrou não haver diferença significativa, num nível de significância de 5%, entre os métodos propostos por CLAE, espectrofotometria na região do UV e EC, para quantificação de NTZ nos comprimidos revestidos e pó para suspensão oral, ou seja, os métodos são equivalentes e podem ser intercambiáveis.

## 5.6. DISCUSSÃO GERAL

O crescente desenvolvimento de novos fármacos e novas formulações pela indústria farmacêutica faz com que aumente, na mesma proporção, a preocupação na prevenção de riscos na qualidade e segurança desses novos produtos ao consumidor. Neste contexto, torna-se imprescindível à realização de ensaios de controle de qualidade em todas as fases do processo.

Considerando que antes da elaboração do projeto não existiam trabalhos na literatura científica referente à determinação quantitativa de NTZ em formas farmacêuticas, aliado ao fato desse fármaco não constar, atualmente, em códigos oficiais, justificou-se o desenvolvimento e validação de metodologia de análise quantitativa em comprimidos revestidos e pó para suspensão oral como um dos objetivos do presente trabalho.



Para o desenvolvimento dos métodos foram levados em consideração diversos parâmetros, baseando-se em questões, tais como, tempo de análise, simplicidade, custo, amostragem, aplicabilidade na rotina do controle de qualidade e disponibilidade e capacidade de aplicação em estudos de estabilidade. Além disso, foram planejados, desenvolvidos e validados métodos analíticos comumente descritos na literatura científica e códigos oficiais relacionados ao controle de qualidade de produtos farmacêuticos.

A CLAE constitui-se no método quali e quantitativo mais utilizado para análises farmacêuticas. Apesar de necessitar de equipamentos e reagentes de maior custo, apresenta-se vantajosa devido à sua versatilidade, eficiência de separação, especificidade, fato pelo qual aplica-se ao monitoramento da estabilidade de produtos farmacêuticos, com possibilidade de quantificação de produtos de degradação. Como mencionado anteriormente, existem alguns trabalhos descritos na literatura para determinação quantitativa do fármaco por CLAE em formas farmacêuticas (NARAYAN & MAHENDRA, 2007; JADHAV *et al.*, 2007; SAKAMOTO & HIYAMA, 2008; RANE *et al.*, 2008). A comparação do método desenvolvido neste estudo demonstra algumas vantagens em relação aos demais na pesquisa e no controle de qualidade da NTZ, pois se apresenta como um método rápido que utiliza reagentes simples, com fácil preparação das amostras. Os parâmetros analíticos são usuais e comuns na rotina do controle de qualidade de fármacos, tais como: coluna empacotada com octadecilsilano, detecção UV, temperatura ambiente e fase móvel isenta de sais, como fosfatos e acetatos, que no controle de qualidade de rotina, podem, com uso prolongado, danificar o equipamento.

A espectrofotometria no UV também representa uma técnica muito utilizada na determinação quali e quantitativa de fármacos em formas farmacêuticas. Assim, o método por espectrofotometria no UV foi desenvolvido demonstrando facilidade de execução, rapidez e baixo custo operacional para determinação de NTZ em comprimido revestido e pó para suspensão oral. Em função dos resultados obtidos no desenvolvimento e validação, sugere-se a possível aplicabilidade da espectrofotometria no UV como método de quantificação em futuros estudos de dissolução e perfil de dissolução do fármaco em formas farmacêuticas.

A EC, apesar de não estar totalmente difundida no controle de qualidade de rotina, como a espectrofotometria no UV e CLAE, tem apresentado grande aplicabilidade. Representa um procedimento em rápida expansão, em termos de técnica de análise e separação em determinações farmacêuticas. Assim como a CLAE, a EC apresenta-se como um método que utiliza reagentes simples e fácil preparação das amostras. Outro fator relevante é a utilização da EC como alternativa aos diferentes métodos de quantificação do fármaco existentes na literatura, pois, até o momento, não existem trabalhos similares descritos com o mesmo intuito.

Após a definição da metodologia analítica utilizada para determinação do fármaco nas formas farmacêuticas de comprimidos revestidos e pó para suspensão oral foi necessário validá-la, ou seja, dar evidências documentadas que os procedimentos analíticos são adequados para o propósito pretendido. A validação foi realizada com base em algumas guias (BRASIL, 2003; USP 32, 2009; FDA, 1994; ICH, 2005) que nos fornecem diretrizes sobre validação de procedimentos analíticos, indicando os principais parâmetros a serem avaliados durante a validação de um método. Segundo estas guias, os parâmetros de especificidade, linearidade, precisão, exatidão, robustez, limite de detecção e quantificação são essenciais para garantir desempenho do método para fins de quantificação da substância ativa. Nem todos os parâmetros analíticos necessitam serem empregados na validação de um método; a escolha vai depender do tipo do método e sua aplicação, cabendo ao analista a seleção dos parâmetros relevantes.

Os métodos por CLAE, EC e espectrofotometria no UV mostraram-se específicos, nas condições testadas, pois não houve interferência dos excipientes presentes nas formulações dos comprimidos revestidos e pó para suspensão oral na determinação do fármaco. Os métodos por CLAE e EC possuem a capacidade de determinar a NTZ na presença de produtos de degradação obtidos por degradação forçada (condições ácidas, alcalinas, oxidativas e fotolíticas), sugerindo que os métodos são indicativos da estabilidade, ou seja, podem ser aplicados para verificação e monitoramento da estabilidade do fármaco nas formas farmacêuticas em estudo.

A linearidade foi avaliada para todos os métodos propostos, através da construção da curva padrão, que variou de 2 a 100 µg/mL para CLAE, 2 a 20 µg/mL para espectrofotometria no UV e 10 a 50 µg/mL para EC. Todos os métodos apresentam coeficientes de correlação próximos à unidade ( $r = 0,9999$ ), indicando haver relação linear entre as concentrações utilizadas e as respectivas respostas obtidas. Todas as análises realizadas forneceram regressão linear significativa, sem desvio significativo da linearidade, para um nível de significância de 5 %.

A precisão foi avaliada em termos de repetibilidade e precisão intermediária. Os resultados de desvio padrão relativos (DPR) obtidos para todos os métodos propostos, tanto intra como interdias, foi menor ou igual a 1,6 %, como pode ser verificado na Tabela 5.10. Foi observado que, em todos os testes realizados, o método que apresentou os maiores DPR na determinação da NTZ foi a EC, mas ainda inferior a 2%.

**TABELA 5.10.** Resultados da precisão da determinação da NTZ nas amostras de comprimidos e pó para suspensão oral por CLAE, espectrofotometria no UV e EC.

| Método | Produto     | Precisão intradia (média % ± DPR) |                  |                  | Precisão interdía<br>Média (%) ± DPR |
|--------|-------------|-----------------------------------|------------------|------------------|--------------------------------------|
|        |             | Dia 1<br>(n = 6)                  | Dia 2<br>(n = 6) | Dia 3<br>(n = 6) |                                      |
| CLAE   | Comprimidos | 101,7 ± 0,8                       | 102,6 ± 0,7      | 101,3 ± 0,4      | 101,9 ± 0,6                          |
|        | Pó susp.    | 98,6 ± 0,9                        | 99,1 ± 0,8       | 99,9 ± 0,6       | 99,2 ± 0,7                           |
| UV     | Comprimidos | 100,5 ± 0,6                       | 99,2 ± 0,5       | 100,4 ± 0,6      | 100,0 ± 0,7                          |
|        | Pó susp.    | 100,2 ± 0,9                       | 100,1 ± 1,0      | 101,2 ± 1,1      | 100,5 ± 0,6                          |
| CE     | Comprimidos | 99,1 ± 1,3                        | 98,7 ± 1,6       | 100,8 ± 1,4      | 99,5 ± 1,1                           |
|        | Pó susp.    | 98,4 ± 1,0                        | 99,4 ± 0,8       | 99,3 ± 1,3       | 99,0 ± 0,6                           |

A exatidão dos métodos foi avaliada através do teste de recuperação. Foram adicionadas diferentes quantidades de SQR às amostras e avaliou-se a percentagem de recuperação obtida para cada nível. Na avaliação dos resultados, a faixa de recuperação obtida, para todos os métodos, foi de 98,97 a 100,9 %, como pode ser observado na Tabela 5.11.

**TABELA 5.11.** Resultados do teste de recuperação realizado em amostras de pó para suspensão e comprimidos de NTZ por CLAE, espectrofotometria no UV e EC.

| Método | Produto              | Concentrações de SQR<br>( $\mu\text{g/mL}$ ) |            | Recuperação<br>(%) | Média (%)<br>$\pm$ DRP |
|--------|----------------------|----------------------------------------------|------------|--------------------|------------------------|
|        |                      | Adicionada                                   | Recuperada |                    |                        |
| CLAE   | Comprimidos          | 10                                           | 9,83       | 98,3               | 100,4 $\pm$<br>1,8%    |
|        |                      | 20                                           | 20,35      | 101,7              |                        |
|        |                      | 30                                           | 30,40      | 101,3              |                        |
|        | Pó para<br>suspensão | 10                                           | 10,10      | 101,0              | 100,9 $\pm$<br>0,3%    |
|        |                      | 20                                           | 20,12      | 100,6              |                        |
|        |                      | 30                                           | 30,36      | 101,2              |                        |
| UV     | Comprimidos          | 2                                            | 1,99       | 99,84              | 98,97 $\pm$<br>0,9%    |
|        |                      | 4                                            | 3,92       | 98,03              |                        |
|        |                      | 6                                            | 5,94       | 99,05              |                        |
|        | Pó para<br>suspensão | 2                                            | 2,02       | 100,99             | 100,02 $\pm$<br>0,8%   |
|        |                      | 4                                            | 3,99       | 99,83              |                        |
|        |                      | 6                                            | 5,95       | 99,25              |                        |
| CE     | Comprimidos          | 4                                            | 3,99       | 99,75              | 100,48 $\pm$<br>0,7%   |
|        |                      | 8                                            | 8,05       | 100,6              |                        |
|        |                      | 12                                           | 12,13      | 101,08             |                        |
|        | Pó para<br>suspensão | 4                                            | 4,05       | 101,31             | 100,58 $\pm$<br>0,8%   |
|        |                      | 8                                            | 7,98       | 99,71              |                        |
|        |                      | 12                                           | 12,09      | 100,72             |                        |

A robustez dos métodos propostos foi avaliada com pequenas e deliberadas modificações nos parâmetros analíticos. Nos métodos por CLAE e EC foram realizadas pequenas alterações nas condições cromatográficas e eletroforéticas, respectivamente, empregadas no doseamento do fármaco em estudo. Para o método por espectrofotometria no ultravioleta, avaliaram-se pequenas modificações no pH do último diluente. Com os resultados obtidos, verificou-se que os métodos são robustos nas condições testadas, podendo determinar o fármaco mesmo com pequenos desvios nas condições ideais.

A sensibilidade do método por CLAE e EC foi avaliada através da determinação dos limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) de NTZ nos sistemas empregados. Os valores obtidos para o LD e LQ foram de 0,1 e 0,4  $\mu\text{g/mL}$ , respectivamente, para CLAE e 0,05  $\mu\text{g/mL}$  e 0,2  $\mu\text{g/mL}$ , respectivamente, para EC, indicando boa sensibilidade em concentrações reduzidas para ambos os métodos.

A técnica empregada para detecção do fármaco nos diferentes métodos analíticos foi a espectrofotometria no ultravioleta. Foi possível utilizar diferentes

comprimentos de onda para análise da NTZ. A escolha de 240 nm para CLAE, 360 nm para EC e 345 nm para espectrofotometria no UV é devido aos diferentes máximos de absorção do fármaco nos diferentes solventes utilizados. Sugere-se que esta diferença está relacionada à ionização do fármaco nos diferentes meios, com posterior deslocamento da absorção para outro comprimento de onda e/ou devido ao aumento ou diminuição da intensidade de absorção.

Com o objetivo de realizar a conferência da intercambialidade dos métodos propostos, realizou-se análise comparativa dos resultados através da análise de variância – ANOVA. A avaliação estatística demonstrou que não houve diferença significativa entre os métodos para um nível de significância de 5%, indicando haver equivalência entre eles na determinação quantitativa do fármaco nas formas farmacêuticas estudadas.

Foi possível verificar a equivalência dos métodos nas determinações quantitativas, mas deve-se salientar algumas diferenças que podem ser determinantes na escolha dos mesmos para introdução no controle de qualidade de rotina. Os métodos desenvolvidos por CLAE e EC podem ser empregados para verificação e monitoramento da estabilidade do fármaco em comprimido revestido e pó para suspensão oral. O mesmo não pode ser considerado para a espectrofotometria no UV, pois não possui capacidade de separação de compostos e os produtos de degradação formados, na maioria dos casos, possuem cromóforos com absorção no comprimento de onda empregado. Na comparação dos métodos desenvolvidos por CLAE e EC foi possível verificar que a EC possui diversas vantagens, tais como a pequena quantidade de amostra necessária e o reduzido uso de solventes, minimizando a geração de resíduos. Além disso, proporciona um método de baixo custo, pois utiliza capilares não onerosos (principalmente se comparados às colunas cromatográficas) e o volume do eletrólito de corrida é composto por poucos mililitros.

## 5.7. CONCLUSÕES

- O método desenvolvido por CLAE, nas condições experimentais estabelecidas, mostrou-se linear, sensível, específico, preciso, exato e robusto para análise quantitativa de NTZ em comprimido revestido e pó para suspensão oral;
- O método desenvolvido através da espectrofotometria no UV a 345 nm, utilizando acetonitrila e água pH 4,5 como solventes, mostrou-se simples, rápido, linear, sensível, preciso e exato para análise quantitativa de NTZ nas formas farmacêuticas disponíveis comercialmente;
- O método quantitativo desenvolvido por EC cumpriu satisfatoriamente com os parâmetros de validação e apresenta-se como alternativa na determinação do fármaco em comprimido revestido e pó para suspensão oral.
- A análise comparativa entre os métodos propostos para a determinação quantitativa de NTZ demonstrou não haver diferença estatisticamente significativa, sendo caracterizada a equivalência dos mesmos.

---

## **6. CAPÍTULO III – ESTUDO DA ESTABILIDADE**

---





## 6.1. INTRODUÇÃO

A estabilidade é definida como a capacidade de uma determinada formulação, em um material de acondicionamento específico, manter suas especificações físicas, químicas, microbiológicas, terapêuticas e toxicológicas durante um período de tempo (O'DONNELL e BOKSER, 2006). O propósito do estudo de estabilidade é prover evidência de como a qualidade de um fármaco varia com tempo sob influência de uma variedade de fatores, e estabelecer um período de re-teste para a substância ou a vida de prateleira do produto, recomendando as condições de estocagem (ICH, 2003). Pode também ser definida como o tempo (em dias, meses, anos) durante o qual a especialidade farmacêutica ou mesmo a matéria-prima considerada isoladamente mantém, dentro dos limites especificados e durante todo o período de estocagem e uso, as mesmas condições e características que possuía quando da época de sua fabricação (BRASIL, 2005).

Diversos fatores afetam a estabilidade de um produto farmacêutico, incluindo a estabilidade da substância ativa; potencial de interação entre as substâncias ativas e excipientes, processo de produção; forma farmacêutica; sistema fechamento/embalagem; condições ambientais durante o transporte, estoque e comercialização e tempo entre a produção e uso. Propriedades ambientais tais como aquecimento, luz e umidade, bem como fatores químicos, tais como, oxidação, redução, hidrólise e racemização, possuem grande importância na estabilidade de produtos farmacêuticos (MATTHEUS, 1999; KOMMANABOYNA e RHODES, 1999).

As alterações podem ser rápidas ou lentas, podendo refletir ou não nas características organolépticas, levando sérias consequências à sua qualidade. Estas alterações podem levar à perda parcial ou total da atividade, alteração da biodisponibilidade, perda da uniformidade de conteúdo, perda da qualidade microbiológica, formação de produtos cuja toxicidade é elevada, entre outras. A partir dos dados obtidos com relação às modificações como, alterações de cor, solubilidade, pH, viscosidade, teor do fármaco ou presença de produtos de degradação, é possível, com boa margem de segurança, estabelecer um prazo

mínimo de validade, no qual a formulação será estável (CARSTENSEN e RHODES, 2000).

A literatura especializada recomenda que os testes de estabilidade devam consistir de duas etapas: testes acelerados e testes confirmatórios. Os estudos acelerados de estabilidade servem para acelerar a degradação química ou mudanças físicas de um produto farmacêutico em condições forçadas de armazenamento. Este tipo de estudo permite determinar quais os principais fatores que afetam a estabilidade do produto e qual a magnitude, além de elucidar produtos e rotas de degradação e fornecer dados importantes para o desenvolvimento de métodos analíticos a serem utilizados nos testes confirmatórios. Nesses ensaios as condições de degradação aos quais os produtos farmacêuticos e fármacos são submetidos são a degradação térmica, hidrólise ácida e básica, decomposição oxidativa e fotolítica. Os estudos confirmatórios de longa duração são realizados a fim de verificar as características físicas, químicas, biológicas e microbiológicas do produto durante e, opcionalmente, depois do prazo de validade esperado (NUDELMAN, 1975; CARSTENSEN e RHODES, 2000; ICH, 2003; KLICK *et al.*, 2005).

A avaliação da estabilidade também pode ser efetuada por ensaio de degradação forçada ou estresse, o qual permite determinar o efeito de condições extremas de degradação sobre o produto farmacêutico, excedendo aquelas utilizadas em estudos acelerados. É um recurso igualmente utilizado para a pesquisa de mecanismos de degradação dos fármacos e avaliação dos potenciais produtos de degradação. Nos ensaios de estresse, as condições de degradação aos quais os produtos farmacêuticos e fármacos são submetidos constam a degradação térmica, hidrólise ácida e básica, decomposição oxidativa e fotolítica (NUDELMAN, 1975; CARSTENSEN e RHODES, 2000; KLICK *et al.*, 2005).

O desenvolvimento dos ensaios de estabilidade exige uma pesquisa ampla em torno dos procedimentos utilizados e um conhecimento teórico das reações de degradação e dos princípios de cinética química, afinal sabe-se que as reações de degradação nos medicamentos ocorrem a velocidades definidas e são de natureza química, podendo ser aceleradas através do aumento na temperatura (NUDELMAN, 1975; CARSTENSEN e RHODES, 2000).

Os estudos de cinética de degradação, do ponto de vista técnico, apresentam vários objetivos, entre eles a obtenção experimental dos dados cinéticos, a proposição do mecanismo de reação, o planejamento dos experimentos necessários para confirmar as hipóteses propostas e o estabelecimento das condições para acelerar ou diminuir a velocidade de reação conforme necessidade (NUDELMAN, 1975; CARSTENSEN e RHODES, 2000).

Os princípios de cinética química envolvem a avaliação da velocidade e ordem de reação. A determinação da ordem de reação permite definir a variação da velocidade de reação com a concentração dos reagentes (CARSTENSEN e RHODES, 2000).

As reações de ordem zero são aquelas em que a velocidade independe da concentração dos reagentes. Nas reações de primeira ordem, a velocidade da reação é proporcional à concentração de um dos reagentes. As reações de segunda ordem se caracterizam por uma velocidade de reação proporcional à concentração de dois reagentes ou à segunda potência de um deles (NUDELMAN, 1975).

A partir da determinação da velocidade e ordem de reação, torna-se possível a obtenção de outros dados, característicos de estudos de estabilidade, tais como, o  $t_{90\%}$ , que representa o tempo em que a concentração do fármaco atinge 90% da concentração inicial (NUDELMAN, 1975).

A realização de um estudo de estabilidade está condicionada à existência de métodos indicadores de estabilidade. Os ensaios químicos devem estabelecer se o fármaco contido nas amostras, conservadas em condições adequadas, permanece inalterado, ou ainda parcial ou totalmente alterado. Para isso é necessário identificar o fármaco e verificar se não há formação de produtos que inicialmente não existiam. Em seguida é necessária a determinação quantitativa do fármaco e, se possível, seus produtos de degradação. Uma técnica muito empregada para identificação completa do fármaco inalterado e de seus possíveis produtos de alteração é a cromatografia líquida de alta eficiência. Os métodos de análises quantitativos devem ser, por sua vez, muito específicos de maneira a poderem distinguir entre o fármaco inalterado e o produto de degradação. Um método que não garanta esta diferenciação não deve ser utilizado, ou seja, não é adequado para verificar se o

medicamento é estável (CARSTENSEN e RHODES, 2000; SINGH e BAKSHI, 2002).

Métodos de análise específicos podem ser utilizados para separar, isolar e identificar fármacos, impurezas e produtos de degradação. Empregam-se técnicas como cromatografia em coluna, cromatografia preparativa em camada delgada, cromatografia gasosa, cromatografia líquida de alta eficiência, espectrofotometria no ultravioleta e infravermelho, ressonância magnética nuclear, espectrometria de massas (KOMMANABOYNA e RHODES, 1999; CARSTENSEN e RHODES, 2000).

No início do desenvolvimento do projeto não havia trabalhos na literatura científica sobre a estabilidade na NTZ. Entretanto, alguns autores realizaram, durante a validação de métodos indicativos da estabilidade, degradação forçada do fármaco frente a diferentes fatores (GOPU *et al.*, 2007; JADHAV *et al.*, 2007; RANE *et al.*, 2008). Os estudos relatam somente a capacidade dos métodos em determinar o fármaco na presença de produtos de degradação, não descrevem estudos de estabilidade ou isolamento e identificação dos produtos formados.

Considerando a fotossensibilidade da NTZ, verificada a partir dos resultados obtidos nos estudos de degradação forçada realizados no desenvolvimento dos métodos indicativos da estabilidade e a facilidade de parar a reação em tempos previamente estabelecidos, buscou-se obter dados sobre a velocidade de degradação fotoquímica do fármaco nas formas farmacêuticas de pó para suspensão e comprimidos revestidos em solução.

Nos estudos de degradação forçada foi observada a formação de um produto de degradação majoritário em todas as condições testadas. Para elucidação estrutural desse produto foram utilizadas diferentes técnicas de isolamento e identificação. Também, realizou-se a comparação do potencial citotóxico do produto frente a nitazoxanida *in vitro*.

Os resultados obtidos juntamente com suas considerações e discussões estão descritos no formato de artigos científicos redigidos nas normas e formatos dos periódicos aos quais foram publicados ou submetidos para publicação.

---

**6.2. ARTIGO CIENTÍFICO – LC: Analysis of Photodegradation Kinetics of Nitazoxanide in Pharmaceutical Formulations**

**Journal of Chromatographic Science, v. 47, p. 745-748, 2009.**

---



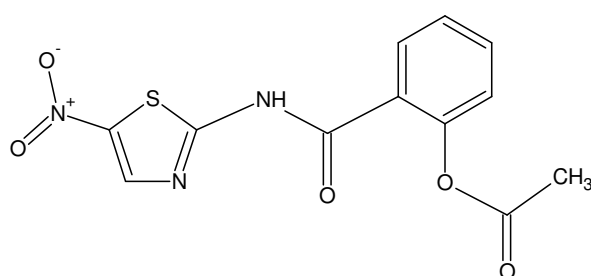
### 6.2.1. Abstract

Nitazoxanide is a new broad-spectrum antiparasitic drug agent. The photodegradation of nitazoxanide was studied in order to investigate the degradation kinetics of this drug. The analyses of the degraded samples were performed by stability-indicating liquid chromatographic method. The degradation was carried out in acetonitrile, with coated tablets or oral suspension powder, in quartz cells under UVC light at 254 nm. The kinetics parameters such as order of reaction, rate constants, half-life ( $t_{1/2}$ ) and the time when 90% of the drug original concentration is left were determined. The photodegradation of nitazoxanide for both pharmaceutical formulations in acetonitrile solution shows a zero-order kinetics under the applied experimental conditions. The obtained results confirm the reliability of the chromatographic method for determining the kinetics run of nitazoxanide in the presence of its degradation products. The present study reveals the photolability of the drug in solution. Thus, appropriated photoprotection is recommended during the manipulation of the drug.

*Keywords:* Nitazoxanide; Kinetics of degradation; Photodegradation; Stability-indicating method; Stress Degradation Studies

## 6.2.2. Introduction

Nitazoxanide (NTZ, Figure 6.1) is a new broad-spectrum antiparasitic drug agent. According to the World Health Organization intestinal parasitic infections are among the most common infectious diseases in humans worldwide and are a significant cause of morbidity and mortality. Nitazoxanide is a new synthetic nitrothiazole benzamide compound (2-acetyloxy-N-(5-nitro-2-thiazolyl) benzamide) notable for its activity in treating both intestinal protozoal and helminth infections (1-3). It was first described in 1975 by Jean François Rossignol and was initially developed as a veterinary antihelminthic with activity against intestinal nematodes, cestodes and trematodes. The US Food and Drug Administration (FDA) has approved this drug in 2002 for treatment of diarrhea caused by *Cryptosporidium parvum* and *Giardia lamblia*, in children 1-11 years for age (1-3). The NTZ was been reported to be effective against a broad range of parasites, including *Entamoeba histolytica*, *Cryptosporidium parvum*, *Giardia lamblia*, *Trichomonas vaginalis*, *Isospora belli*, *Ascaris lumbricoides*, *Taenia saginata*, *Taenia solium* (3-5). Its precise mechanism of action is unknown, but studies have shown that NTZ inhibits pyruvate ferredoxin oxireductase (PFOR) enzyme-dependent electron transfer reactions essential to anaerobic energy metabolism in these organisms (1,3).



**FIGURE 6.1.** Chemical structure of nitazoxanide

NTZ is currently available in coated tablets (500mg) and powder for oral suspension (100mg/5ml). An official method for determination of this drug in oral



formulation has not been described yet. However, there are studies describing the determination of NTZ and metabolites in biological fluids by liquid chromatography (LC) (6) and LC-MS (7). Recently, visible spectrophotometrics (8), high-performance thin-layer chromatography (HPTLC) (9) and stability-indicating LC methods for the estimation of NTZ in bulk and pharmaceuticals formulations were developed (10-12).

Forced degradation studies (hydrolysis, oxidation and photolysis) of NTZ pure active pharmaceutical ingredient have been reported (10-12). However, there is no photodegradation kinetics described in the literature for nitazoxanide in pharmaceutical formulations.

The effect of light is often considered an important factor in drug stability. Stability problems increase in shorter light wavelengths, particularly in the short visible and ultraviolet (13-15). Preliminary stability investigations realized by our research group revealed that nitazoxanide undergo degradation upon exposure to light and its photolability was established by forced degradation testing.

The purpose of this study was the determination of the photodegradation kinetics of nitazoxanide in acetonitrile, prepared from coated tablets and oral suspension powder, using a stability-indicating LC method.

### **6.2.3. Experimental**

#### **Chemicals and reagents**

NTZ used as reference substance (assigned purity, 99.53%) was kindly supplied by Shin Yang–Hangzhou Shinyang Samwoo Fine Chemical CO. (Ningbo, China). According to guidelines (16) and USP pharmacopeia (17) the use of reference substance with checked purity for drugs quality control is mandatory. The obtained NTZ standard was analyzed by analytical techniques such as: LC-mass spectrometry, differential scanning calorimetric (DSC), infrared absorption spectroscopy, and  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  nuclear magnetic resonance spectroscopy. No impurities were found.

Nixoran<sup>®</sup> (manufactured by Roemmers, Buenos Aires, Argentina) coated tablets for oral administration (500mg per tablet, excipients: maize starch, pregelatinized starch, hydroxypropyl methylcellulose, sodium starch glycollate, talc, magnesium stearate, triacetin, iron oxide yellow, titanium dioxide, polyethylene glycol 6000) and Alinia<sup>®</sup> (manufactured by Romark Laboratories, Tampa, FL, USA) powder for oral suspension (100mg/5ml, excipients: sodium benzoate, sucrose, xanthan gum, microcrystalline cellulose and carboxymethylcellulose sodium, anhydrous citric acid, sodium citrate dihydrate, acacia gum, sugar syrup, FD&C Red #40 and natural strawberry flavoring) were purchased. All chemicals were of pharmaceutical or analytical grade.

### **LC apparatus and conditions**

The LC system consisted of a Shimadzu LC-10AD<sub>VP</sub> pump, a SPD-M10A<sub>VP</sub> Diode Array Detector, a SCL-10A<sub>VP</sub> system controller, CTO-10AC<sub>VP</sub> column oven, SIL-10AD<sub>VP</sub> auto injector, and a degasser module DGU-14A. Data were acquired and processed by Shimadzu Class-VP<sup>®</sup> V 6.14 software program (Shimadzu, Kyoto, Japan). The LC method was previously developed and validated by our research group (12). The column utilized was a Phenomenex<sup>®</sup> (Torrance, CA, USA) Synergi Fusion C<sub>18</sub> column (250 mm x 4.6 mm, i.d., 4 μm particle size) coupled to a C<sub>18</sub> guard column (4.0 mm x 3.0 mm, i.d., 4 μm). The Shimadzu LC system was operated isocratically at 25 °C using a mobile phase of *o*-phosphoric acid 0.1% (v/v) pH 6.0 (adjusted by addition of triethylamine) : acetonitrile (45:55, v/v), run at a flow-rate of 1.0 ml min<sup>-1</sup>, and using PDA detection at 240 nm. The injection volume was 20 μl of a solution containing 20 μg ml<sup>-1</sup> for the reference substance and for the samples. The quantitation was performed using the absolute area of the peak.

### **Photodegradation studies**

The effect of light was studied exposing the pharmaceutical formulations solutions in 1 cm quartz cells. The light source was an UVC – 254 nm 30 W lamp (Philips, Holland), fixed to a chamber in horizontal position. The chamber was

internally coated with mirrors (0.16 x 0.16 x 1m – width x height x length), for distributing the light uniformly. The distance between the lamp and the samples was 10 cm. The temperature was controlled into the chamber.

### **Preparation of sample stock solutions**

Twenty tablets were weighed and crushed to a fine powder. An accurately weighed amount of tablet powder or oral suspension powder equivalent to 20 mg of NTZ was transferred to a 100 ml volumetric flask with 50 ml of acetonitrile and sonicated for 10 min, followed by the addition of the same solvent to complete the volume in order to give a final concentration of 200  $\mu\text{g ml}^{-1}$ . The solutions were filtered using 0.45  $\mu\text{m}$  nylon membranes.

### **Kinetics determination**

The photodegradation kinetics of NTZ in pharmaceutical formulations was evaluated in acetonitrile, under the same conditions described above. Stock solutions of each pharmaceutical formulation were prepared, and the stress degradation study was performed in the chamber exposing closed quartz cells containing the solutions. The samples were positioned horizontally, to provide maximum area of exposure to the light source. The pharmaceutical formulations solutions were exposed to the UVC irradiation in the following time intervals: 0, 60, 120, 150, 180, 210, 240 and 270 min. Three samples were analysed for each time interval. The influence of the temperature was evaluated through analysed protected samples, wrapped in aluminium foil, were the dark controls. After the required time, aliquots of 1 ml were transferred to a 10 ml volumetric flask and diluted with acetonitrile to 20  $\mu\text{g ml}^{-1}$ , for the LC determination. The standard solution was prepared in acetonitrile at the concentration of 20  $\mu\text{g ml}^{-1}$  for the quantitation of the drug. Placebo solutions were prepared at the same way, for both pharmaceutical formulations, for verifying the influence of the excipients in the degradation process. All solutions were injected in triplicate. Peak purity test performed by photodiode array detector and it was useful

to show that the analyte chromatographic peak did not contain more than one substance.

The concentration of the remaining NTZ determined at different time intervals was used in the plots. The plots were: (a) values of concentration versus time (zero-order reaction), (b) log of concentration versus time (first-order reaction) and (c) reciprocal of concentration versus time (second-order reaction). The regression coefficients ( $r$ ) were obtained, and the best fit observed indicates the reaction order. The kinetics parameters like apparent order degradation rate constant ( $k$ ), half-life ( $t_{1/2}$ ) and  $t_{90}$  (time where 90% of original concentration of the drug is left) were obtained.

The kinetics models can be represented as:

$$\text{Zero-order reaction:} \quad C = C_0 - kt \quad t_{90\%} = 0.1 C_0 / k \quad t_{1/2} = C_0 / 2k$$

$$\text{First-order reaction:} \quad \ln C = \ln C_0 - kt \quad t_{90\%} = 0.106 / k \quad t_{1/2} = \ln 2 / k$$

$$\text{Second-order reaction:} \quad 1 / C = 1 / C_0 + kt \quad t_{90\%} = 1 / 9k C_0 \quad t_{1/2} = 1 / k C_0$$

where  $C_0$  is the concentration of the reactants under consideration at time zero,  $C$  is the concentration after reaction time  $t$  and  $k$  is the reaction rate constant.

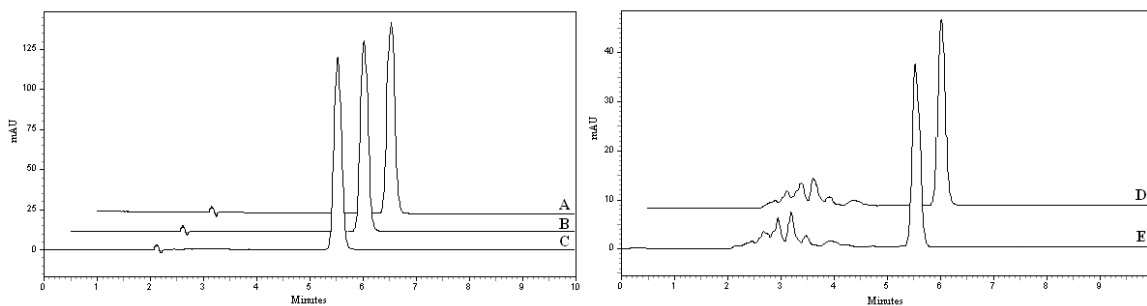
#### 6.2.4. Results and discussion

The purpose of photostability testing is to provide evidence on how the quality of a drug varies with the time under the influence of the light. In this study, the photodecomposition of NTZ was carried out through the employment of a stress condition during different periods of time. Many factors can affect the stability of a pharmaceutical product, such as the stability of the active ingredient, the manufacturing process, the environmental conditions (heat, light and moisture during storage), as well as some chemical reactions like oxidation, reduction, hydrolysis and racemization that might occur (13-15,18). Photochemical degradation is an important factor of pharmaceuticals stability. Since ultraviolet radiation has high-energy, it can

be the cause of many degradation reactions (13-15). Usually, the photodegradation of a chemical compound is caused by oxidation or by the breakdown of certain weak chemical bond, where both phenomena are energy related and consequently they are preceded by photons with specified wavelengths. On the other hand, the rate of photodegradation reaction is dependent of light intensity, so higher light intensity, provides the faster reaction rates. The presence of chromophores groups in the chemical structure of NTZ, such as conjugated double bonds, nitro and amide, suggests that NTZ is susceptible to UV radiation (254 nm). The International Conference on Harmonization (ICH) guideline requires that stress testing should be carried out to elucidate the inherent stability characteristics of the active substance in a pharmaceutical preparation. The light testing should be an integral part of stress testing (19,20).

LC has become the most used method in drug analysis due to its advantage in being a separating tool and it is appropriate for stability studies. The stability-indicating LC method was previously developed and validated for NTZ quantitation in pharmaceutical formulations, and it was applied in this study (12).

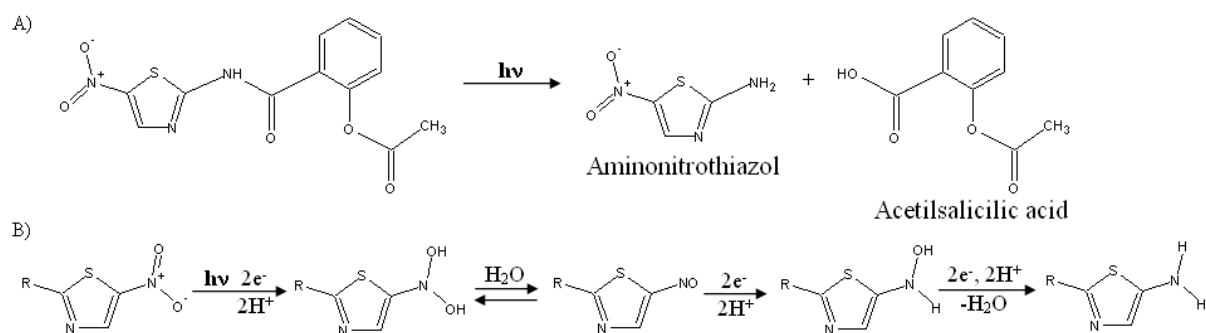
The NTZ photodegradation profile was evaluated at different time intervals, under the same conditions described above. Approximately 67 and 72% of drug degradation were observed during 270 min of light exposure for tablets and oral suspension powder solutions in acetonitrile. The solutions developed a slightly yellow color, which decreased along the exposure time until they became colorless. The temperature, which was controlled into the chamber, was maintained below 25 °C. Figure 6.2 shows the modification in the samples chromatographic profile after 270 min comparing to time 0 (zero).



**FIGURE 6.2.** Typical chromatogram for 20.0  $\mu\text{g ml}^{-1}$  nitazoxanide standard solution (A); chromatograms showing the nitazoxanide intact peak for oral suspension powder (B) and coated tablets (C) at time 0 (zero). The degradation after 270 min of light exposure for oral suspension powder (D) and tablets (E) in acetonitrile solution.

Five majority photodegradation products eluted at 2.64, 2.95, 3.20, 3.45 and 3.93 min resulted from degradation of each pharmaceutical formulation solution in acetonitrile. The shorter retention times of the photodegradation products compared to the NTZ retention time are due to more polar features of the degradation products. The presence of chromophores groups in the chemical structure of NTZ, such as nitro and amide, suggests the formation of some products as shows in Figure 6.3, but the identification of these products was not performed yet. The isolation of those degradation products is in avaluation. Broekhuysen et al. (2000) observed the formation of aminonitrothiazole as a drug metabolite in human plasma.

The placebo chromatograms solutions didn't show any peak, neither in the retention time of NTZ nor in the photodegradation products. So, there is no influence of the excipients in the determination of the potodegradation kinetics of this drug. The software chromatographic peak purity tool was applied to verify NTZ peak, showing that it was 100% pure in all cases. Thus, it was suggested that there was no interference of any other substance in the retention time of the drug.



**FIGURE 6.3.** The suggested mechanism of amide degradation (A) and reductive nitro compounds (B) by photo irradiation process (254 nm).

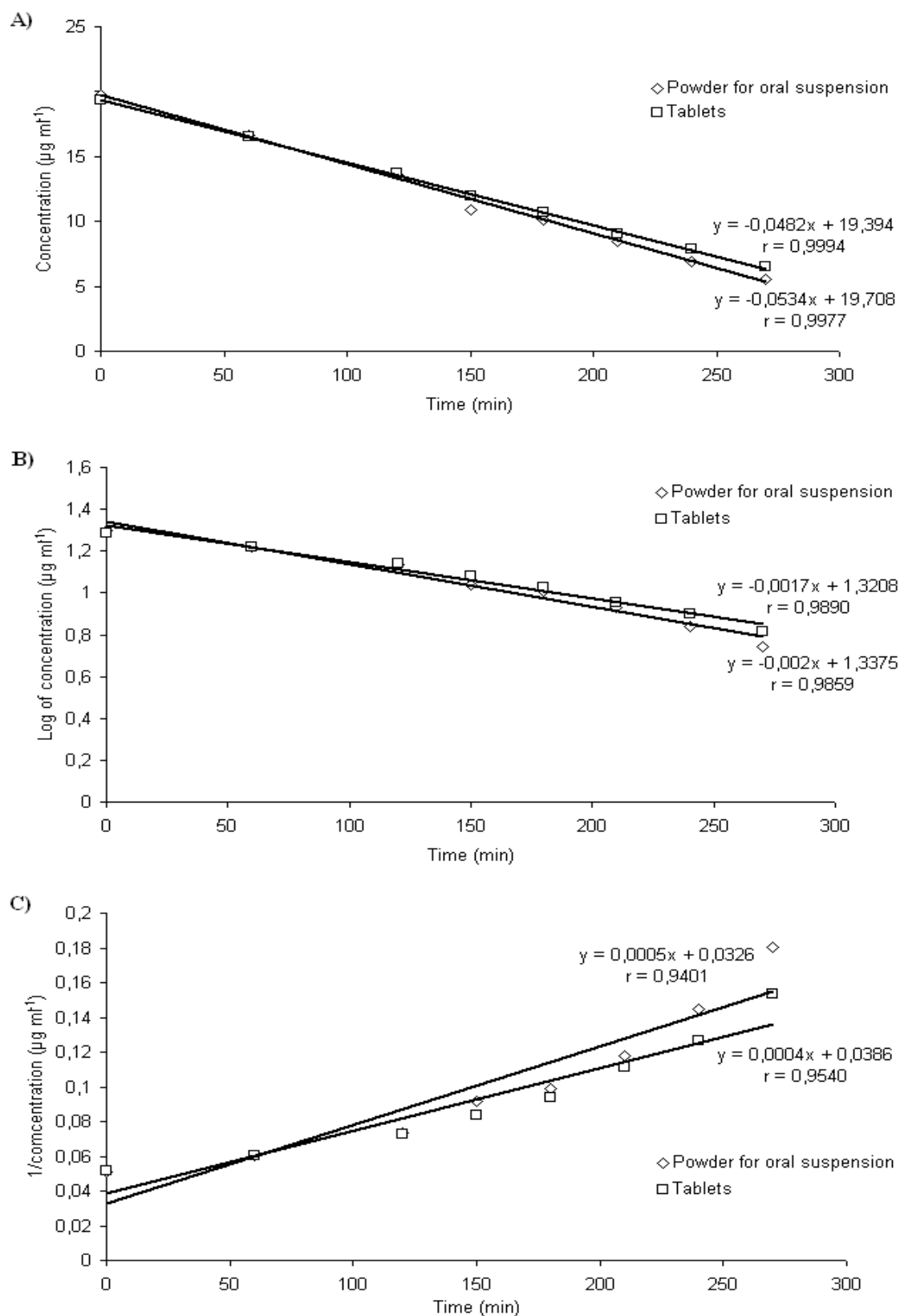
The photodegradation kinetics was calculated for both pharmaceutical formulations, through the decreasing in drug concentration by time. The concentration, log and reciprocal concentration values of the remaining drug versus time are shown in Table 6.1. The NTZ concentration remaining was calculated at each time interval for the three replicates, comparing the mean drug concentration of the standard solution. The concentration, log and reciprocal concentration plots of remaining drug versus time obtained during the kinetic studies are shown in Figure 6.4. According to the evaluation of the correlation coefficients, it can be concluded that the NTZ photodegradation for both pharmaceutical formulations in acetonitrile solution show a zero-order kinetics under the experimental conditions applied. Analyzing the straight lines slopes it was possible to calculate the apparent zero-order degradation rate constant  $k$ ,  $t_{1/2}$  and  $t_{90}$  at each pharmaceutical formulation in acetonitrile solutions tested (Table 6.2).

**TABLE 6.1.** Photodegradation kinetics of nitazoxanide pharmaceutical formulations solutions exposed to UVC lamp.

| Dosage forms               | Time (min) | Concentration <sup>a</sup> |                     | Log of Concentration | 1/Concentration |
|----------------------------|------------|----------------------------|---------------------|----------------------|-----------------|
|                            |            | %, RSD (%)                 | µg ml <sup>-1</sup> |                      |                 |
| Tablets                    | 0          | 98.60, 1.6                 | 19.39               | 1.2877               | 0.05156         |
|                            | 60         | 84.27, 0.8                 | 16.58               | 1.2195               | 0.06033         |
|                            | 120        | 69.91, 1.4                 | 13.75               | 1.1383               | 0.07272         |
|                            | 150        | 60.81, 0.3                 | 11.96               | 1.0778               | 0.08360         |
|                            | 180        | 54.37, 2.6                 | 10.69               | 1.0291               | 0.09351         |
|                            | 210        | 45.76, 2.1                 | 9.00                | 0.9543               | 0.11109         |
|                            | 240        | 40.28, 1.1                 | 7.92                | 0.8989               | 0.12622         |
|                            | 270        | 33.14, 2.8                 | 6.52                | 0.8141               | 0.15342         |
| Powder for oral suspension | 0          | 98.92, 0.6                 | 19.78               | 1.2963               | 0.05055         |
|                            | 60         | 83.11, 1.0                 | 16.62               | 1.2207               | 0.06016         |
|                            | 120        | 68.06, 0.9                 | 13.61               | 1.1339               | 0.07346         |
|                            | 150        | 54.69, 0.8                 | 10.94               | 1.0389               | 0.09143         |
|                            | 180        | 50.67, 1.8                 | 10.13               | 1.0058               | 0.09867         |
|                            | 210        | 42.38, 2.5                 | 8.48                | 0.9281               | 0.11799         |
|                            | 240        | 34.63, 2.6                 | 6.93                | 0.8405               | 0.14439         |
|                            | 270        | 27.76, 2.3                 | 5.55                | 0.7444               | 0.18015         |

<sup>a</sup>Data expressed as mean of three determinations





**FIGURE 6.4.** Plots of concentration (zero-order reaction - **A**), log of concentration (first-order reaction - **B**) and reciprocal of concentration (second-order reaction - **C**) of remaining nitazoxanide versus time.

**TABLE 6.2.** Degradation rate constant ( $k$ ), half-life ( $t_{1/2}$ ) and  $t_{90}$  for nitazoxanide in pharmaceutical formulations solutions submitted to photodegradation, and determined by LC method.

| Dosage forms               | $k$ ( $\text{min}^{-1}$ ) | $t_{1/2}$ (min) | $t_{90}$ (min) |
|----------------------------|---------------------------|-----------------|----------------|
| Tablets                    | $4.81 \times 10^{-2}$     | 201.56          | 40.30          |
| Powder for oral suspension | $5.38 \times 10^{-2}$     | 183.83          | 36.75          |

### 6.2.5. Conclusions

The nitazoxanide photodegradation kinetics studies in acetonitrile solutions were determined in the tablets and oral powder suspension. The degradation of this drug during photodegradation processing follows zero-order reaction kinetics for both pharmaceutical formulations. The kinetics parameters of degradation rate constant,  $t_{1/2}$  and  $t_{90}$  can be predicted. The nitazoxanide photolability showed by the present study indicates that it is necessary to avoid exposure of the drug from light effects. So, this special care must be taken during the manipulation, manufacture and storage for the pharmaceutical preparations.

### 6.2.6. Acknowledgments

The authors thank CAPES, CNPq and UFRGS (Brazil) for the financial support.

### 6.2.7. References

1. White. Nitazoxanide: a new broad spectrum antiparasitic agent. *Expert. Rev. Anti-infect. Ther.* 2: 43–50 (2004).

2. Raether and H. Hänel. Nitroheterocyclic drugs with broad spectrum activity. *Parasit. Res.* 90:S19–S39 (2003).
3. M. Fox and L.D. Saravolatz. Nitazoxanide: A new thiazolide antiparasitic agent. *Clin. Infect. Dis.* 40:1173–1180 (2005).
4. Abaza, A.R. El-zayadi, S.M. Kabil and H. Rizk. Nitazoxanide in the treatment of patients with intestinal protozoan and helminthic infections: a report on 546 patients in Egypt. *Curr. Ther. Res.* 59(2):116–121(1998).
5. R. Cabello, L.R. Guerro, M.R.M. Garcia and A.G. Cruz. Nitazoxanide for the treatment of intestinal protozoan and helminthic infections in México. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.* 91:701–703 (1997).
6. A. Stockis, X. Deroubaix, R. Lins, B. Jeanbaptiste, P. Calderon and J.F. Rossignol. Pharmacokinetics of nitazoxanide after single oral dose administration in 6 healthy volunteers. *Int. J. Clin. Pharmacol. Ther.* 34:349–351 (1996).
7. J. Broekhuysen, A. Stockis, R.L. Lins, J. De Graeve and J.F. Rossignol. Nitazoxanide: pharmacokinetics and metabolism in man. *Int. J. Clin. Pharmacol. Ther.* 38:387–394 (2000).
8. G.K. Kapse, G. Prabhakar and S.A. Raju. Spectrophotometric methods for the estimation of nitazoxanide in pharmaceutical formulations. *Indian J. Pharm. Sci.* 68:403–406 (2006).
9. C.L. Gopu, S. Thomas, A.R. Paradkar and K.R. Mahadik. A validated stability indicating HPTLC method for determination of nitazoxanide. *J. Sci. Ind. Res.* 66:141–145 (2007).
10. A.S. Jadhav, D.B. Pathare and M.S. Shingare. A validated stability indicating RP-LC method for nitazoxanide, a new antiparasitic compound. *Chromatographia* 66:595–600 (2007).
11. V.P. Rane, J.N. Sangshetti, K.R. Patil, R.D. Yeole and D.B. Shinde. Stability-indicating LC determination of nitazoxanide in bulk drug and in pharmaceutical dosage form. *Chromatographia* 67:455–459 (2008).

12. M.D. Malesuik, S.G. Cardoso and M. Steppe. Development of a validated stability-indicating LC method for nitazoxanide in pharmaceutical formulations. *Chromatographia* 67:131–136 (2008).
13. A.R. Breier, M. Steppe and E.E.S. Schapoval. Photodegradation kinetics of fexofenadine hydrochloride using a LC method. *chromatographia* 64:725–729 (2006).
14. C.V. Garcia, N.S. Nudelman, M. Steppe and E.E.S. Schapoval. Structural elucidation of rabeprazole sodium photodegradation products. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 46:88-93 (2008).
15. A.R. Breier, N.S. Nudelman, M. Steppe and E.E.S. Schapoval. Isolation and structure elucidation of photodegradation products of fexofenadine. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 46:250-257 (2008).
16. ICH In: International Conference on Harmonization of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use. Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology, Q2 (R1) (2005).
17. USP 31 In: The United States Pharmacopoeia, 31 ed., United States Pharmacopeial Convention, Rockville, 2008, pp. 683–687
18. A. Mendez, P. Chagastelles, E. Palma, N. Nardi and E.E.S. Schapoval. Thermal and alkaline stability of meropenem: Degradation products and cytotoxicity. *Int. J. Pharm.* 350:95–102 (2008).
19. ICH, In: International Conference on Harmonisation of Technical requirements for registration of pharmaceuticals for human use, Photostability testing of new drug substances and products (1996).
20. ICH, In: International Conference on Harmonisation of Technical requirements for registration of pharmaceuticals for human use, Stability testing of new drug substances and products (2000).

---

**6.3. ARTIGO CIENTÍFICO – Identification, Characterization and Cytotoxicity *in vitro* Assay of Nitazoxanide Major Degradation Product**

**Submetido para o periódico Journal of Pharmaceutical and Biomedical  
Analysis**

---



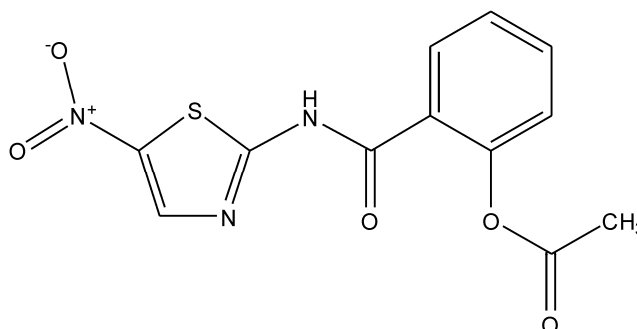
### 6.3.1. Abstract

Stress studies of the broad-spectrum antiparasitic nitazoxanide were conducted in order to isolate and elucidate the major degradation product involved in thermal, acid, alkaline, oxidative and photolytic decomposition of the drug in solution and solid state. The major degradation product has been identified and characterized using techniques namely LC-DAD,  $^1\text{H}$  NMR,  $^{13}\text{C}$  NMR, IR, and MS/MS. The stability of nitazoxanide raw material and nitazoxanide in tablets and in suspension powder was studied under different conditions and the results suggest that the formation of the same deacetylated degradation product occur in all cases. This product was also studied in order to determine the preliminary cytotoxicity *in vitro* against mononuclear cells. In the tested conditions, the assay demonstrated that the degradation product has a higher cytotoxicity when compared to NTZ in high concentrations. So, stress studies showed that special care must be taken during the preparation, manufacture, and storage of this pharmaceutical drug.

**Keywords:** Nitazoxanide; Stress degradation; Degradation product; Cytotoxicity *in vitro* assay.

### 6.3.2. Introduction

Nitazoxanide (NTZ, Figure 6.5) is a new nitrothiazole benzamide compound (2-acetyloxy-N-(5-nitro-2-thiazolyl) benzamide) notable for its activity in treating both intestinal protozoal and helminthic. NTZ has been reported to be effective against a broad range of parasites, including *Giardia lamblia*, *Entamoeba histolytica*, *Cryptosporidium parvum*, and *Ascaris lumbricoides* [1]. The US Food and Drug Administration (FDA) approved the oral suspension of NTZ for the treatment of diarrhea caused by *Cryptosporidium* species and *Giardia lamblia* in pediatric patients in December 2002 [2]. It is the first agent with proven efficacy for the treatment of cryptosporidiosis and giardiasis in children and adults. Its precise mechanism of action is unknown, but studies have shown that NTZ inhibits pyruvate ferredoxin oxidoreductase (PFOR) enzyme-dependent electron transfer reactions essential to anaerobic energy metabolism in these organisms [1,2].



**FIGURE 6.5.** Chemical structure of nitazoxanide.

NTZ is currently available in coated tablets (500mg) and oral suspension powder (100mg/5ml). An official method for determination of this drug in oral formulation has not been described yet. Literature concerning the quantitative determination of NTZ is relatively limited. However, there are studies describing the determination of NTZ and metabolites in biological fluids by liquid chromatographic (LC) [3] and LC-MS [4,5]. Recently, visible spectrophotometric [6], high-performance thin-layer chromatographic (HPTLC) [7] and LC methods for the estimation of NTZ in bulk and pharmaceuticals formulations were developed [8-10].



In these studies, some authors have developed stability-indicating methods evaluating the forced degradation of the drug. These studies also evaluated the methods capability (specificity/selectivity) for drug determination in the presence of degradation products, which were formed under oxidative, acidic, basic and photolytic conditions. In all cases, isolation and characterization of the degradation products were not performed. The study of degradation products formation in pharmaceutical formulations, their isolation, and characterization is a very important area, because it can help to understand the decomposition patterns of drug molecules, what is a valuable information about its stability [11-13]. Many factors can affect the stability of a pharmaceutical product, such as the manufacturing process, the stability of the active ingredient, the environmental conditions (heat, light and moisture during storage), as well as some chemical reactions like oxidation, reduction, hydrolysis and racemization that might occur [14,15]. Such information is used for determining storage and packaging conditions of raw material and the drug in the pharmaceutical product. According to ICH, the stress testing of drug substance can help to identify the likely degradation products, which helps to establish the degradation pathways [16].

In preliminary forced stress testing, we have observed the instability of the drug under thermal, oxidative, acid, basic and photolytic conditions [9,17]. Considering the extensive degradation of NTZ in different conditions and the possibility to identify the major degradation product, the aim of the present study was to evaluate the NTZ stability under forced degradation conditions and to isolate the majoritary degradation product, employing  $^1\text{H}$  NMR,  $^{13}\text{C}$  NMR, IR, MS/MS and LC-DAD for its characterization. The isolated degradation product was also evaluated to determine the preliminary cytotoxicity *in vitro* against mononuclear cells. In agreement with ICH (ICH, 2006), it is important to evaluate the biological safety of an individual impurity or a given impurity profile, including degradation products [18].

### 6.3.3. Experimental

#### Chemicals and reagents

NTZ applied as reference substance (assigned purity, 99.53%) and raw material were kindly supplied by Shin Yang–Hangzhou Shinyang Samwoo Fine Chemical CO. (Ningbo, China).

Annita<sup>®</sup> (manufactured by Farmoquímica, Rio de Janeiro, Brazil) coated tablets for oral administration (500 mg per tablet, excipients: maize starch, pregelatinized maize starch, talc, hydroxypropyl methylcellulose, magnesium stearate, granulated sugar, primogel, purified water, eudragit, eudracolor yellow, isopropyl alcohol and acetone) and oral suspension powder (20 mg/mL, excipients: sodium benzoate, granulated sugar, xanthan gum, sodium citrate dihydrate, strawberry flavoring, citric acid, avicel RC- 591 and red corant n<sup>o</sup>33) were purchased in the local market. All chemicals were of pharmaceutical or analytical grade.

#### Instrumentation

The analysis of the degraded samples was carried out by using the LC method previously validated by our research group [9]. The applied column was C<sub>18</sub> (250 mm x 4.6 mm, i.d., 4 µm particle size) coupled to a C<sub>18</sub> guard column (4.0 mm x 3.0 mm, i.d., 4 µm). The system was operated isocratically at 25°C using a mobile phase composed of *o*-phosphoric acid 0.1% (v/v) pH 6.0 (adjusted by addition of triethylamine) : acetonitrile (45:55, v/v), at a flow-rate of 1.0 mL min<sup>-1</sup>. The detection wavelength was 240 nm (DAD), and the injection volume was 20 µL.

Nuclear magnetic resonance spectra were recorded on two spectrometers: a Bruker DPX 400 MHz and a Bruker 200 MHz (Karlsruhe, Germany). Mass spectrometry analyses were conducted using a Micromass Quattro spectrometer equipped with an electrospray ion (ESI) source operating in negative ion mode (Manchester, UK). The infrared spectroscopy was recorded in Perkin-Elmer instrument using universal ATR sampling accessory (Beaconsfield, UK). Ficoll-Paque gradient centrifuge (Uppsala, Sweden) and a FACScalibur cytometer equipped with 488 nm argon laser (San Diego, USA) were used for cytotoxic assay.

## **Stress degradation**

The thermal degradation was conducted by exposing samples of oral suspension powder, oral suspension reconstituted with water and tablets powder in an oven at a temperature of 60 °C for 5, 1.5 and 5 months, respectively. After, the samples were maintained at room temperature and aliquots were diluted with acetonitrile to achieve a final concentration of 30 µg mL<sup>-1</sup>.

The drug is poorly soluble in ethanol and practically insoluble in water, but freely soluble in acetonitrile. The NTZ solutions for acid hydrolysis were prepared dissolving the drug (tablets powder and oral suspension powder) in small volume of acetonitrile (5%, V/V) and then diluted with aqueous hydrochloric acid to achieve a concentration of 1 mg mL<sup>-1</sup>. The acid hydrolysis was performed in 0.1 M HCl at 70 °C for 2 h, after the sample was maintained at room temperature and neutralized. The study in alkaline condition was carried out in 0.01 M NaOH at room temperature (25 ± 2°C) for 2 h and neutralized. An aliquot of each solution was diluted with acetonitrile to a final concentration of 30 µg mL<sup>-1</sup>.

The oxidative reaction was performed dissolving the powders in a small volume of acetonitrile (5%, V/V) and then diluted with 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (1 mg mL<sup>-1</sup>), at room temperature for 30 min. After, an aliquot of this solution was diluted in acetonitrile to a final concentration of 30 µg mL<sup>-1</sup>.

The stress degradation study in direct UV radiation (254 nm) was performed exposing the NTZ solutions in acetonitrile (1 mg mL<sup>-1</sup>) for 15 min at room temperature in a photostability chamber provided with mirrors. The distance between the lamp and the samples was 10 cm. After that, this solution was diluted to 20 µg mL<sup>-1</sup> in acetonitrile.

## **Identification of the degradation product**

The identification of the isolated degradation product was carried out by LC-DAD, <sup>1</sup>H NMR, <sup>13</sup>C NMR, IR and MS/MS spectroscopy analysis. The same analyses were also done for the nitazoxanide reference substance.

## **Cytotoxicity study**

Human mononuclear cells were separated from the peripheral blood of three healthy donors, after receiving their written informed consent. Heparinized venous blood was diluted 4:3 with Hank's balanced salt solution (Sigma). Mononuclear cells were isolated by centrifugation on Ficoll-Paque (Amersham) gradient centrifuge and washed twice in Hank's medium. Viable cells were counted in Neubauer chamber by tripan blue exclusion. Mononuclear cells were washed and resuspended in RPMI to a concentration of  $10^6$  viable cells in 1.0 mL.

The isolated degradation product and NTZ reference substance were prepared in dimethyl sulfoxide (DMSO - Merck) ( $10.0 \text{ mg mL}^{-1}$ ) and diluted in RPMI 1640 medium (Sigma) immediately before using until the concentrations of 1.0, 10.0, 20.0, 40.0, 80.0 and  $100.0 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$ .

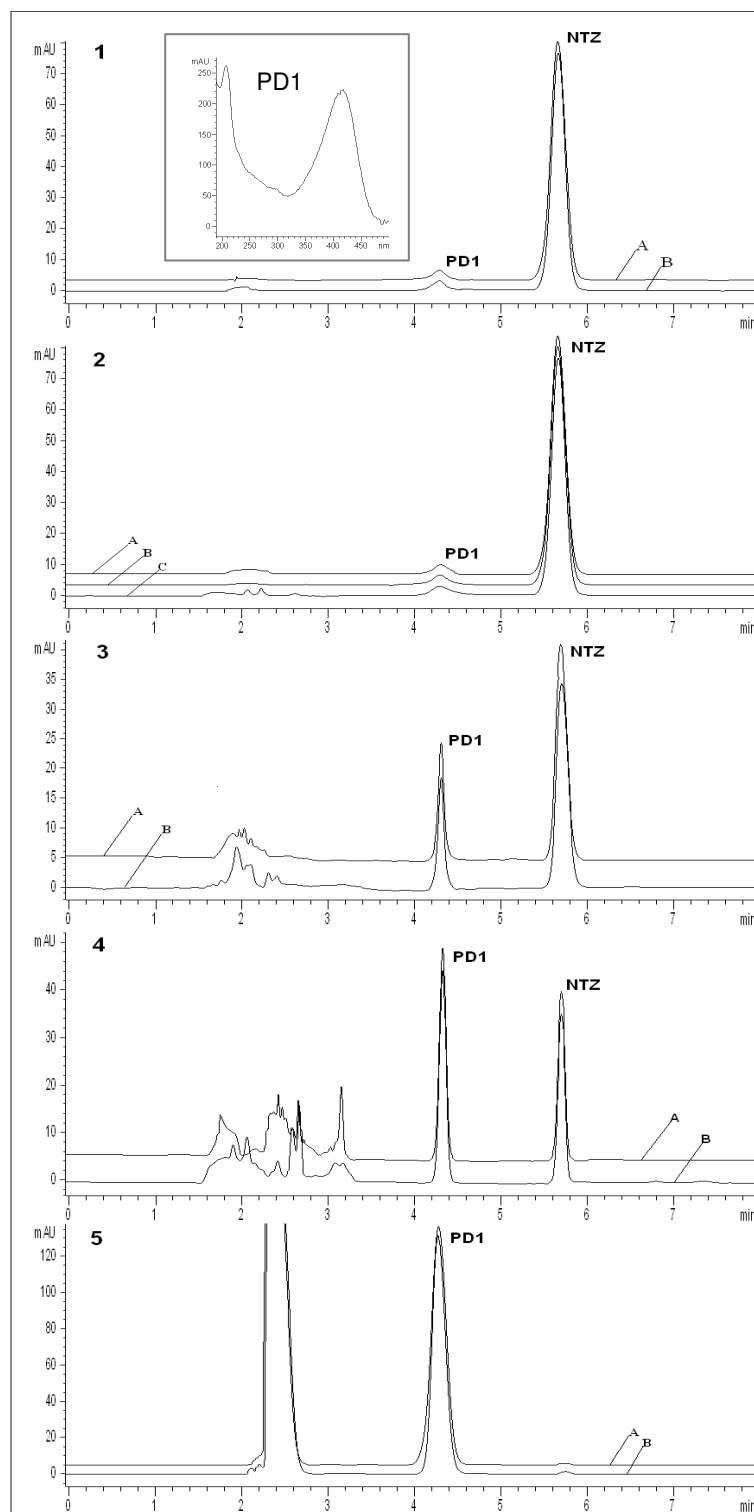
The cell suspensions were dispensed in two 96-well plates (100  $\mu\text{L}$  in each well), and the samples were immediately added (100  $\mu\text{L}$  in each well). In the first plate, the final analyzed concentration of each sample was 1.0, 10.0 and  $100.0 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$ , in each well. In the second plate, the final analyzed concentration of each sample was 20.0, 40.0 and  $80.0 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$ . Both assays were prepared in triplicate. Controls with the sample diluent (DMSO) and mononuclear cells were included. After the addition of the samples, the cells were cultivated in a humidified 5%  $\text{CO}_2$  incubator at  $37^\circ \text{C}$  for 48 h. Cell viability was determined by flow cytometry after addition of propidium iodide. Analyses were conducted on a FACScalibur cytometer equipped with 488 nm argon laser using the CellQuest Software. At least 5.000 events were collected, and the WinMDI 2.8 software was used to obtain the final results.

### **6.3.4. Results and discussion**

The stability studies are of great importance in the development and quality control of pharmaceutical products. The stress testing is the first part of the stability evaluation and can help to identify the likely degradation products, establish the degradation pathways and the intrinsic stability of the molecule. In general, these

goals achieved in forced degradation studies should be conducted, in most cases, under conditions that induce thermal, alkaline, acid, oxidative and photolytic drug decomposition [11-13].

In thermal decomposition study, the drug percentage present in the samples of oral suspension powder, oral suspension reconstituted with water and tablets powder, stored at 60 °C for 5, 1.5 and 5 months, respectively, decreased approximately 20%, in all cases. When submitted to acid (0.1 M HCl, 70 °C) and alkaline (0.01 M NaOH, 25 °C) conditions the area of NTZ decreased about 70% and 60% after 2h, respectively. In the oxidative reaction (3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), it was observed a total drug degradation after 30 min. In the photolysis procedure, the area of NTZ decreased approximately 10% after 15 min. The different pharmaceutical preparations (oral suspension powder, oral suspension reconstituted with water and tablets powder) showed similar drug residual levels in all conditions tested, as shown in Figure 6.6. The chromatograms obtained by LC assay showed a decrease of the NTZ area and one additional majoritary peak (PD1) at 4.3 min, in all cases (Figure 6.6). Analyzing the diode-array spectrum (200 – 500 nm) of each condition degradation products (at 4.3 min), it was verified that absorbance spectrum was the same. In all degradation studies, a yellow crystalline precipitate was formed. During oxidative degradation, it was observed only this degradation product and its concentration increased proportionally to the degradation of NTZ. This precipitate was isolated by filtration, washed with acetonitrile and dried under reduced pressure. Several solvents were tested, but the product has high solubility only in DMSO. Chromatograms, obtained from LC analysis, showed that the precipitate had the same retention time and absorption spectrum of the degradation product PD1. Also, it was observed that the product was pure. This study was also conducted with the raw material and found that the degradation profile was maintained, with the formation of the same product. Thus, we decided to perform the raw material product isolation and identification, removing any possibility of pharmaceutical excipients interference. Considering the obtained results, it is suggested the formation of the same degraded product when nitazoxanide is exposed to thermal, alkaline, acid, oxidative and photolytic conditions.

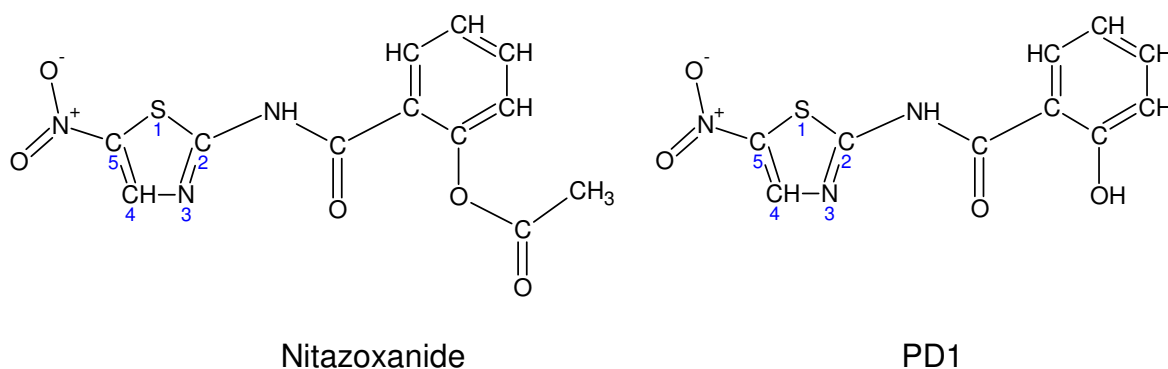


**FIGURE 6.6.** Chromatograms showing decomposition of nitazoxanide in the stability studies and absorption spectrum of the degradation product PD1. Key: (A) tablets powder (B) oral suspension powder (C) oral suspension reconstituted with water. Tested experimental conditions: (1) photolytic – UV 254 nm, 15 min, (2) thermal – 60 °C, (3) alkaline – NaOH 0.01 M, 2 h, (4) acid – HCl 0.1 M, 70 °C, 2 h, and (5) oxidative – H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 3%, 30 min. Chromatographic conditions: column Phenomenex C<sub>18</sub> (250 mm x 4.6 mm, 4 μm), mobile phase *o*-phosphoric acid 0.1% (V/V) pH 6.0 – acetonitrile (45:55, V/V), flow-rate 1.0 mL min<sup>-1</sup>, UV-DAD detection at 240 nm, temperature 25°C.

The structure of the majority product – PD1 was proposed according to the results obtained by  $^1\text{H}$  NMR,  $^{13}\text{C}$  NMR, MS/MS, and IR techniques.

The  $^1\text{H}$  NMR and  $^{13}\text{C}$  NMR spectra were interpreted by comparing the chemical shifts of NTZ standard with those of degradation product, as shown in Table 6.3.

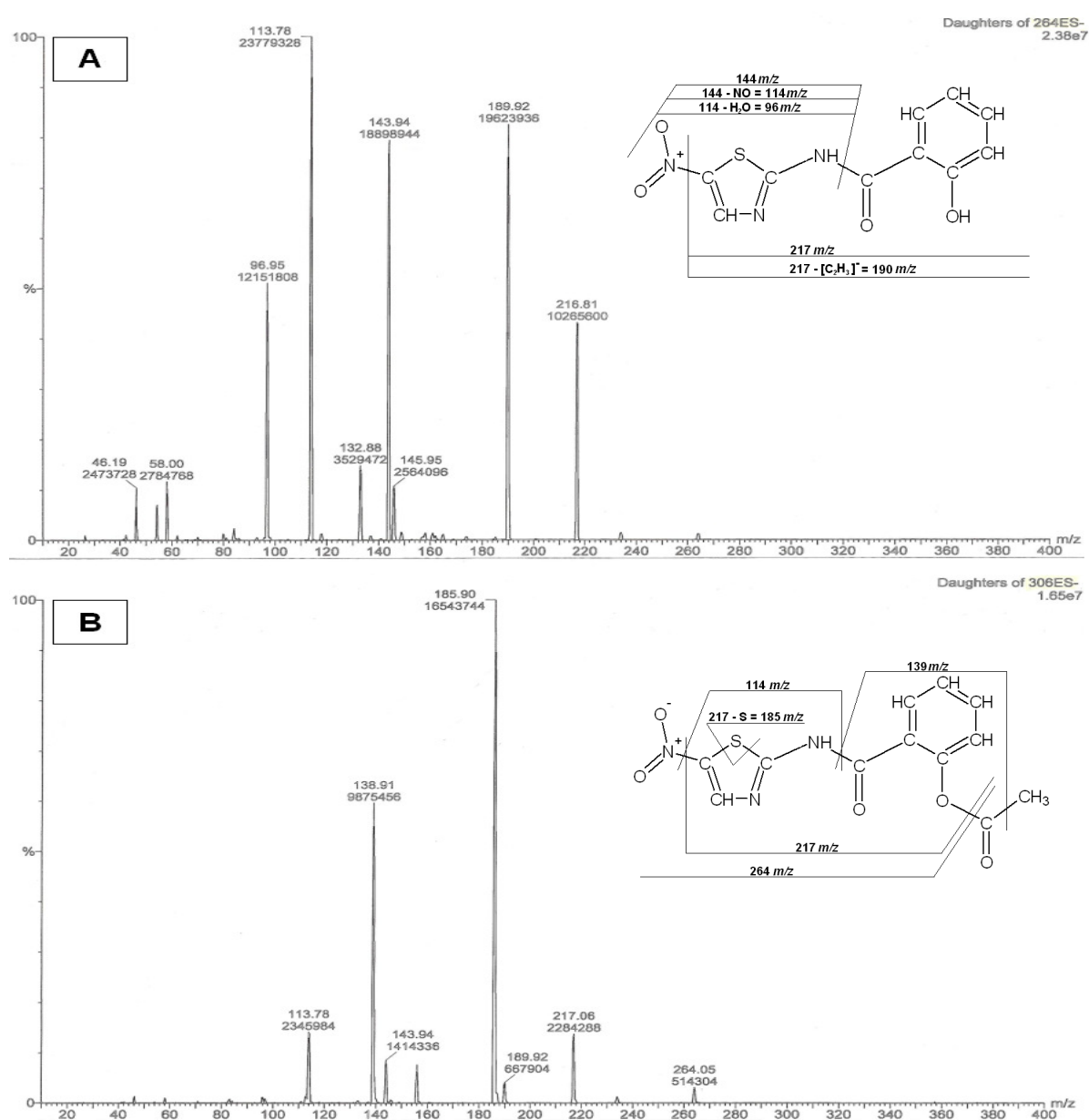
**TABLE 6.3.**  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  NMR chemical shift assignments for nitazoxanide and its degradation product – PD1.



| Assignments     | Chemical Shifts (ppm)                                                                                                                                                     |                                                                                                                           |
|-----------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|                 | Nitazoxanide (DMSO- $d_6$ )                                                                                                                                               | PD1 (DMSO- $d_6$ )                                                                                                        |
| $^1\text{H}$    | 13.56 (s.a., 1H, NH), 8.57 (s, 1H, H4), 7.86-7.82 (m, 1H, Ph), 7.69-7.62 (m, 1H, Ph), 7.45-7.38 (m, 1H, Ph), 7.29-7.25 (m, 1H, Ph), 2.27 (s, 3H, CH <sub>3</sub> )        | 12.15 (s.a., 1H, NH), 8.67 (s, 1H, H4), 7.91-7.88 (m, 1H, Ph), 7.53-7.47 (m, 1H, Ph), 7.06-6.97 (m, 2H, Ph + 1H, OH)      |
| $^{13}\text{C}$ | 168.57 (OCO), 164.99 (C2), 161.85 (NCO), 148.69 (C4), 142.15 (C5), 141.66 (Ph), 133.20 (Ph), 129.57 (Ph), 125.62 (Ph), 125.25 (Ph), 123.21 (Ph), 20.60 (CH <sub>3</sub> ) | 165.5 (C2), 161.5 (NCO), 152.3 (C4), 142.3 (C5), 141.9 (Ph), 135.05 (Ph), 130.5 (Ph), 119.82 (Ph), 117.2 (Ph), 116.5 (Ph) |

The chemical shifts are in good agreement for the proposed structure. The decomposition applied in this study allowed a small molecular modification. The NMR preliminary analysis spectra suggests the deacetylation of NTZ molecule, due to the disappearance of the ester signals of carbons and hydrogens, as shown in Table 6.3.

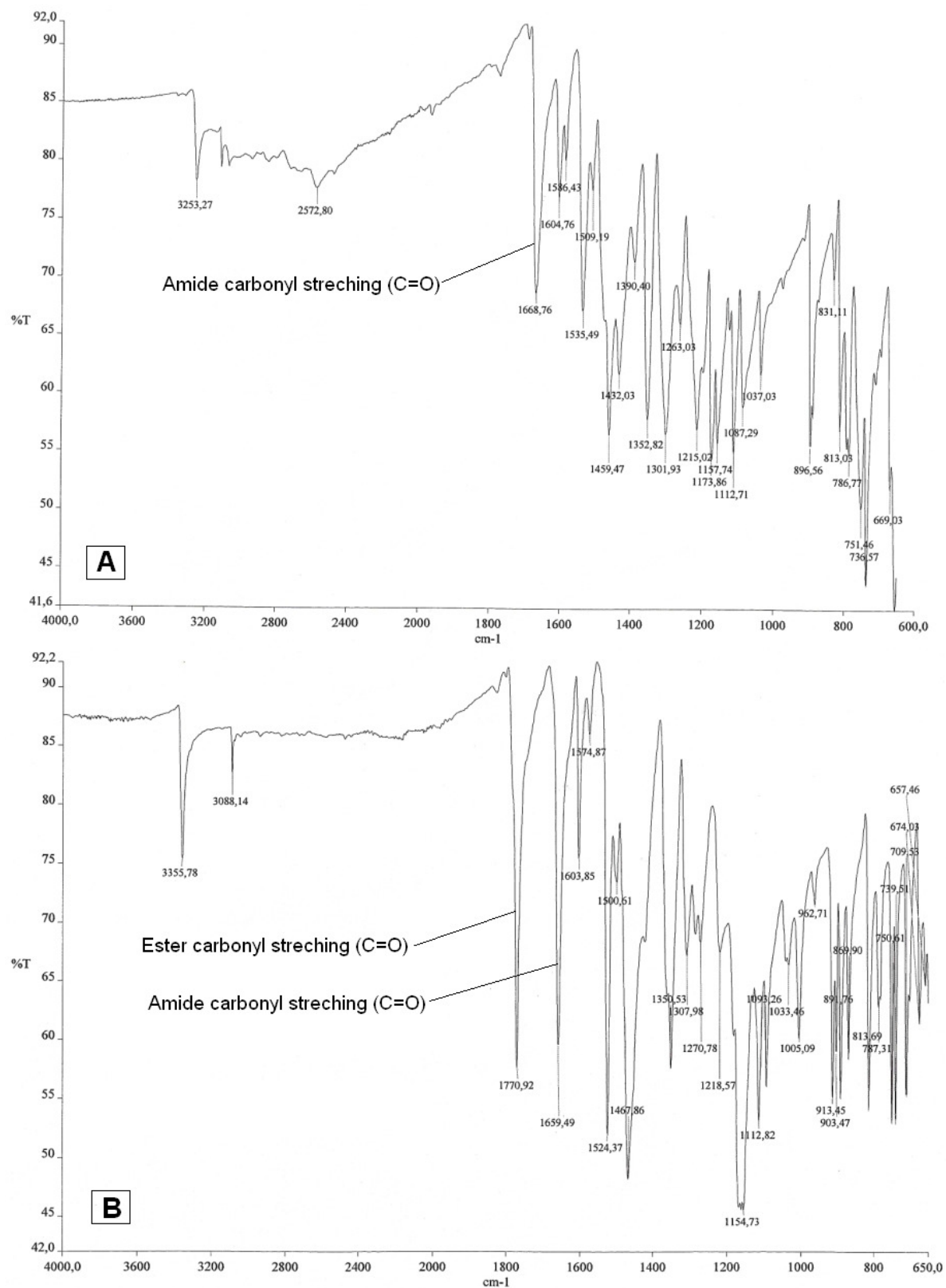
The mass spectral properties characterization of the degradation product confirm the NMR results and PD1 structure. The analyses were conducted using the direct insertion technique, without coupling with LC method. Full scan mass spectral analysis of NTZ and PD1 showed deprotonated ( $M - H^+$ ) molecular ions of  $m/z$  306 and 264, respectively. Fragmentation of deprotonated molecular ions of NTZ in the mass spectrometer lead to seven main product ions  $m/z$ : 264, 217, 190, 186, 139 and 114. The MS/MS spectrum of PD1 generated series of fragment ions at 217, 190, 144 and 114 (Figure 6.7). The fragments obtained are in agreement with the literature [3-5,19], and the mass of the PD1 corresponds to loss of acetyl group.



**FIGURE 6.7.** MS/MS fragmentation of PD1 (A) and nitazoxanide (B).



According to the IR spectrum characterization, DP1 showed a similar absorption pattern to NTZ. The largest change easily seen in the spectrum was the loss of the band corresponding to the ester carbonyl stretching, shown in Figure 6.8.



**FIGURE 6.8.** Infrared transmission spectrum of PD1 (A) and nitazoxanide (B).

The complete examination of the MS, NMR and IR spectra of the degradation product suggest the deacetylation of NTZ and formation of PD1 – Tizoxanide (2-Hydroxy-N-(5-nitro-2-thiazolyl)benzamide). According to some authors, the tizoxanide was first reported as active metabolite of nitazoxanide in plasma and its formation occur when nitazoxanide is hydrolyzed by plasma esterases into its deacetyl derivative [3-5,19]. However, at this moment, the tizoxanide had not been reported in the literature as a degradation product from a stability study.

The cytotoxicity assay with mononuclear cells was performed to evaluate the effect of the PD1 in relation to the intact molecule, to foresee possible undesirable effects resulting from the degradation products. In this study, samples were considered cytotoxic when they presented a minim reduction of 50% in cell viability. The results obtained indicate that the degraded product at  $40.0 \mu\text{g mL}^{-1}$ , after 48 h of incubation, present cytotoxic effects with a reduction in cell viability of 75.24% (Table 6.4). This value is approximately 27% higher than that obtained with NTZ at the same concentration, showing a higher cytotoxic potential of the PD1 compared with the NTZ, in the tested conditions. According to some authors, following oral administration of 500 mg nitazoxanide tablet, the drug is partially absorbed from the gastrointestinal tract and rapidly hydrolised in plama to form its active circulating metabolite, tizoxanide. Maximum serum concentrations of tizoxanide reach approximately  $10.0 \mu\text{g mL}^{-1}$ , and its elimination half-life from plasma is approximately 1.5 h [3-5,19]. Therefore, common dose administration has no potential to reach cytotoxic concentrations. These results corroborate the importance of conducting these biological assays in stability studies.

**TABLE 6.4.** Results of cell viability obtained by *in vitro* cytotoxic assay for NTZ and degraded product (PD1 – Tizoxanide) against mononuclear cells.

| Concentration<br>( $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) | Cell viability (%) <sup>*</sup> $\pm$ SD |                   |                 |                   |
|--------------------------------------------|------------------------------------------|-------------------|-----------------|-------------------|
|                                            | NTZ                                      | PD1               | Control         | Diluent<br>(DMSO) |
| 1.0                                        | 99.26 $\pm$ 0.19                         | 98.74 $\pm$ 0.64  |                 |                   |
| 10.0                                       | 98.7 $\pm$ 0.73                          | 97.47 $\pm$ 1.18  |                 |                   |
| 20.0                                       | 90.45 $\pm$ 3.33                         | 88.95 $\pm$ 2.43  |                 |                   |
| 40.0                                       | 51.02 $\pm$ 4.03                         | 24.76 $\pm$ 10.14 | 1.11 $\pm$ 0.27 | 0.87 $\pm$ 0.49   |
| 80.0                                       | 0.33 $\pm$ 0.11                          | 0.28 $\pm$ 0.17   |                 |                   |
| 100.0                                      | 0.80 $\pm$ 0.48                          | 0.57 $\pm$ 0.27   |                 |                   |

\* Mean of three analyses

### 6.3.5. Conclusion

NTZ demonstrated to be unstable in solid form and solution for different factors, such as heat, oxidation, acid, basic and light. The major degradation product, isolated by filtration and identified by LC-DAD, MS/MS,  $^1\text{H}$  NMR,  $^{13}\text{C}$  NMR and IR, was tizoxanide originated from the deacetylation of NTZ. In this study, we suggest the formation of this degradation product in all tested stress conditions. In the tested conditions, the *in vitro* cytotoxicity assay against mononuclear cells demonstrated that the degradation product has a higher cytotoxicity when compared to NTZ in high concentrations. Considering the obtained results, special care must be taken during the manipulation, manufacture and storage of the pharmaceutical preparations.

### 6.3.6. Acknowledgments

The authors thank CAPES, CNPq and UFRGS (Brazil) for the financial support.

### 6.3.7. References

1. Raether, W.; Hänel, H. Nitroheterocyclic drugs with broad spectrum activity. *Parasit. Res.* **2003**, 90, S19-S39.
2. Fox, L.M.; Saravolatz, L.D. Nitazoxanide: A new thiazolide antiparasitic agent. *Clin. Infect. Dis.* **2005**, (40), 1173-1180.
3. Stockis, A.; Deroubaix, X.; Lins, R.; Jeanbaptiste, B.; Calderon, P.; Rossignol, J.F. Pharmacokinetics of nitazoxanide after single oral dose administration in 6 healthy volunteers. *Int. J. Clin. Pharmacol. Ther.* **1996**, 34, 349-351.
4. Broekhuysen, J.; Stockis, A.; Lins, R.L.; De Graeve, J.; Rossignol, J.F. Nitazoxanide: pharmacokinetics and metabolism in man. *Int. J. Clin. Pharmacol. Ther.* **2000**, 38, 387-394.
5. Zhao, Z.; Zhang, L.; Xue, F.; Wang, X.; Zheng, W.; Zhang, T.; Fei, C.; Zhang, K.; Qiu, M.; Xin, R.; Yang, F. Liquid chromatography–tandem mass spectrometry analysis of nitazoxanide and its major metabolites in goat. *J. Chromatogr. B* **2008**, 875, 427-436.
6. Kapse, G.K.; Prabhakar, G.; Raju, S.A. Spectrophotometric methods for the estimation of nitazoxanide in pharmaceutical formulations. *Indian J. Pharm. Sci.* **2006**, 68, 403-406.
7. Gopu, C.L.; Thomas, S.; Paradkar, A.R.; Mahadik, K.R. A validated stability indicating HPTLC method for determination of nitazoxanide. *J. Sci. Ind. Res.* **2007**, 66, 141-145.
8. Jadhav, A.S.; Pathare, D.B.; Shingare, M.S. A validated stability indicating RP-LC method for nitazoxanide, a new antiparasitic compound. *Chromatographia.* **2007**, 66, 595-600.

9. Malesuik, M.D.; Cardoso, S.G.; Steppe, M. Development of a validated stability-indicating LC method for nitazoxanide in pharmaceutical formulations. *Chromatographia*. **2008**, 67, 131-136.
10. Rane, V.P.; Sangshetti, J.N.; Patil, K.R.; Yeole, R.D.; Shinde, D.B. Stability-Indicating LC Determination of Nitazoxanide in Bulk Drug and in Pharmaceutical Dosage Form. *Chromatographia*. **2008**, 67, 455-459.
11. A.R. Breier, N.S. Nudelman, M. Steppe and E.E.S. Schapoval. Isolation and structure elucidation of photodegradation products of fexofenadine. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 46:250-257 (2008).
12. A. Mendez, P. Chagastelles, E. Palma, N. Nardi and E.E.S. Schapoval. Thermal and alkaline stability of meropenem: Degradation products and cytotoxicity. *Int. J. Pharm.* 350:95–102 (2008).
13. C.V. Garcia, N.S. Nudelman, M. Steppe and E.E.S. Schapoval. Structural elucidation of rabeprazole sodium photodegradation products. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 46:88-93 (**2008**).
14. N.S. Nudelman, *Estabilidad de Medicamentos*, El Ateneo, Buenos Aires, 1975.
15. B. Kommanaboyina, C.T. Rhodes, *Drug Dev. Ind. Pharm.* 25 (**1999**) 857–868.
16. ICH, In: International Conference on Harmonisation of Technical requirements for registration of pharmaceuticals for human use, *Stability testing of new drug substances and products* (**2003**).
17. Malesuik, M.D.; Gonçalves, H.M.L.; Paim, C.S.; E.E.S. Schapoval and Steppe, M. LC: Analysis of photodegradation of nitazoxanide in pharmaceutical formulations. *Journal of Chromatographic Science*, 47:745–748, **2009**.

18. ICH, In: International Conference on Harmonisation of Technical requirements for registration of pharmaceuticals for human use, Impurities in new drug products **(2006)**.

19. Zhao, Z.; Zhang, L.; Xue, F.; Zhang, T. Metabolic profile of nitazoxanide in goat feces. *Chromatographia*. **2008**, 68, 731-738.

#### 6.4. DISCUSSÃO GERAL

A avaliação da estabilidade em condições forçadas permite determinar o efeito de condições extremas de degradação sobre o produto farmacêutico. É um recurso muito utilizado para pesquisa de mecanismos de degradação dos fármacos e avaliação dos potenciais produtos de degradação (NUDELMAN, 1975; CARSTENSEN e RHODES, 2000).

Assim, o estudo da estabilidade da NTZ em condições forçadas constitui-se parte importante dos objetivos gerais deste trabalho. Foram realizados estudos preliminares da estabilidade com o objetivo da seleção dos fatores relevantes de degradação do fármaco nas formas farmacêuticas de pó para suspensão oral, comprimidos revestidos e soluções ou suspensões obtidas a partir dos mesmos. As amostras foram submetidas à degradação térmica, oxidativa, fotólise, básica e ácida.

Avaliando-se os resultados obtidos foi possível verificar que o fármaco é instável a todas as condições testadas. Maior instabilidade ocorre em meio alcalino, oxidativo e fotolítico.

Após o estudo dos resultados da avaliação preliminar da estabilidade, apresentados anteriormente, foi possível verificar nos cromatogramas obtidos com detector de fotiodos a formação de um produto, com tempo de retenção de 4,3 min, em todas as condições de degradação testadas, para ambas as formas farmacêuticas e matéria-prima. Na análise dos espectros de absorção na faixa de 200 a 500 nm constatou-se a semelhança nos perfis e nos máximos de absorção obtidos. Esses resultados sugerem a mesma identidade aos produtos, ou seja, o mesmo tempo de retenção na análise cromatográfica e o mesmo perfil espectral nos levam a sugerir que ocorre em todas as condições de degradações testadas a formação do mesmo produto (PD1).

O estudo da cinética de fotodegradação do fármaco na forma de pó para suspensão oral e comprimidos revestidos foi realizado em solução com acetonitrila. A partir dos resultados foi possível verificar cinética de ordem zero para ambas as formas farmacêuticas em estudo, nas condições empregadas. Quanto aos

parâmetros cinéticos, tais como tempo de meia vida ( $t_{1/2}$ ),  $t_{90\%}$  e  $k$ , a sua determinação é dependente da ordem da reação, tendo em vista a que as equações cinéticas dependem dessa informação. O  $t_{90\%}$  calculado foi de 40,3 e 36,8 min para comprimidos revestidos e pó para suspensão oral, respectivamente.

No início do presente trabalho, foi sugerida a formação de alguns produtos baseada na análise da estrutura química da NTZ. A presença de compostos contendo grupos auxocromos tais como ligações duplas conjugadas, nitro e amida permitiram sugerir que a luz poderia ser um fator capaz de acelerar a degradação química desta substância, pois são mais sensíveis à radiação luminosa. A sensibilidade é tanto maior quanto maior for o número destes cromóforos na molécula e, especialmente se estiverem conjugados, permitindo a interação dos elétrons livres. Isomerização, racemizações, rearranjos, oxidações e rupturas de ligações estão entre as mais importantes catalisadas pela luz (CARSTENSEN e RHODES, 2000). Com base nos resultados obtidos, foi possível verificar extensa degradação da amostra frente à luz UV, nas condições testadas. Na etapa de isolamento foi observada a formação de grande quantidade de produtos de degradação. As primeiras tentativas objetivaram separar os produtos por cromatografia em camada delgada preparativa e, para tanto, foram testados diversos sistemas eluentes, com diferentes polaridades. Tendo em vista a grande quantidade de produtos em solução, independente do sistema eluente testado, a resolução entre as manchas não foi adequada, impedindo sua separação.

A partir de então, empregou-se a cromatografia em coluna em paralelo com a cromatografia em camada delgada preparativa, possibilitando o isolamento de alguns produtos, mas que ainda permaneciam contaminados. Sucessivas análises por CCD preparativa foram realizadas, entretanto, verificou-se que os mesmos continuavam a apresentar instabilidade, dificultando seu isolamento em quantidades adequadas para posterior identificação.

A NTZ quando submetida à degradação oxidativa apresenta a formação de apenas um produto de degradação (PD1) que aumenta com a mesma intensidade da redução do teor do fármaco. Esta observação direcionou nossos estudos para o isolamento deste produto de degradação, pois após algumas horas o PD1 precipitou nas condições escolhidas e facilitou seu isolamento. O precipitado depois de isolado apresentou características de pó levemente amarelado. O produto foi submetido à



análise por espectrômetro de massas (MS/MS), infravermelho e RMN de carbono e hidrogênio. Os resultados dessas análises atribuem o PD1 como o 2-hidroxi-n-(5-nitro-2-tiazolil)benzamida, ou seja, tizoxanida inicialmente reportado como metabólito desacetilado da NTZ no plasma. Entretanto, até o presente momento, a tizoxanida não havia sido referida como um produto de degradação da nitazoxanida proveniente de estudos de estabilidade em condições forçadas de armazenamento.

Da mesma forma que o isolamento e identificação dos produtos de degradação são de grande importância, o estudo da citotoxicidade constitui, atualmente, área de investigação imprescindível em controle de qualidade. Por esta razão, foi avaliada a citotoxicidade do produto de degradação PD1 permitindo a complementação do estudo de estabilidade proposto. Embora preliminares, os resultados obtidos indicam maior potencial citotóxico *in vitro* do produto, quando comparado a NTZ, em concentrações altas e em tempos a partir de 48 horas de incubação. Mesmo sabendo da drasticidade das condições do ensaio e das baixas concentrações da tizoxanida no plasma, os dados finais são indicativos da necessidade de atenção para a degradação da NTZ. Sendo assim, sugere-se maior aprofundamento dos estudos nesta área para garantir a segurança e eficácia terapêutica dos novos produtos farmacêuticos comercializados.

## 6.5. CONCLUSÕES

- O estudo preliminar da estabilidade da nitazoxanida, na forma farmacêutica de comprimidos revestidos e pó para suspensão oral, demonstra que esse fármaco é instável ao meio ácido e básico, temperatura elevada, oxidação e fotólise, nas condições estudadas;
- O estudo da cinética de fotodegradação da nitazoxanida em solução a partir de comprimidos revestidos e pó para suspensão oral demonstrou extensa degradação do fármaco em ambas as formas farmacêuticas;
- As reações de fotodegradação da nitazoxanida em solução com acetonitrila para comprimidos revestidos e pó para suspensão oral apresentam cinética de ordem zero, para ambas as formas farmacêuticas nas condições de estudo;
- Os resultados obtidos na degradação acelerada da nitazoxanida demonstram que ocorre a formação da tizoxanida em todas as condições de degradação estudadas.
- A tizoxanida após 48 horas de incubação na concentração de 40 µg/mL apresentou efeito citotóxico *in vitro* frente a células mononucleares superior a nitazoxanida.

---

## **7. REFERÊNCIAS**

---



ABAZA, H.; EL-ZAYADI, A. R.; KABIL, S. M.; RIZK, H.; Nitazoxanide in the treatment of patients with intestinal protozoan and helminthic infections: a report on 546 patients in Egypt. **Current Therapy Reserch**, v. 59, p. 116-121, 1998.

ADAGU, I. S.; NOLDER, D.; WARHURST, D. C.; ROSSIGNOL, J. F. *In vitro* activity of nitazoxanide and related compounds against isolates of *Giardia intestinalis*, *Entamoeba histolytica* and *Trichomonas vaginalis*. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 49, p. 103-111, 2002.

ALTRIA, K. D.; KELLY, M. A.; CLARK, B. J. Current applications in the analysis of pharmaceuticals by capillary electrophoresis. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 17, p. 204-213, 1998.

BAKSHI, M.; SINGH, S. Development of validated stability-indicating assay methods – critical review. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 28, p. 1011-1040, 2002.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução nº 899, de 29 de maio de 2003. Determina a publicação do guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 02 jun. 2003.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. RE nº 1, de 29 de julho de 2005. Guia para a Realização de Estudos de Estabilidade. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, 2005.

BREIER, A. R.; STEPPE, M.; SCHAPOVAL, E. E. S. Photodegradation kinetics of fexofenadine hydrochloride using a LC method. **Chromatographia**, v. 64, p. 725-729, 2006.

BREIER, A. R.; STEPPE, M.; SCHAPOVAL, E. E. S. Validation of UV Spectrophotometric Method for Fexofenadine Hydrochloride in Pharmaceutical Formulations and Comparison with HPLC. **Analytical Letters**, v. 40, p. 2329-2337, 2007.

BREIER, A. R.; NUDELMAN, N. S.; STEPPE, M.; SCHAPOVAL, E. E. S. Isolation and structure elucidation of photodegradation products of fexofenadine. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 46, p. 250-257, 2008.

BROEKHUYSEN, J.; STOCKIS, A.; LINS, R. L.; DE GRAEVE, J.; ROSSIGNOL, J. F. Nitazoxanide: pharmacokinetics and metabolism in man. **International Journal of Clinical Pharmacology and Therapeutics**, v. 38, p. 387-394, 2000.

CABELLO, R. R.; GUERERRO, L. R.; GARCIA, M. R. M.; CRUZ, A. G.; Nitazoxanide for the treatment of intestinal protozoan and helminthic infections in México. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 91, p. 701-703, 1997.

CARSTENSEN, J. T.; RHODES, C. T. **Drug Stability Principles and Practices**. Third Edition, Revised and Expanded, Ed. Marcel Dekker, New York, 2000, 773 p.  
CEDILLO-RIVERA, R.; CHAVES, B.; GONZALES-ROBLES, A.; TAPIA, A.; YEPEZ-MULIA, L. *In vitro* effects of nitazoxanide against *Entamoeba histolytica*, *Giardia intestinalis*, and *Trichomonas vaginalis* trophozoites. **Journal Eukaryotic Microbiology**, v. 49, p. 201-208, 2002.

CHIEFFI, P. P.; NETO, V. A. Vermes, verminoses e a saúde pública. **Ciência e Cultura**, v. 55, p. 41-43, 2003.

CIMERMAN, S.; LADEIRA, M. C. T.; IULIANO, V. Blastocistose: nitazoxanida como nova opção terapêutica. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 36, p. 415-417, 2003.

CLURCZAK, E. W. Validação de métodos em espectroscopia para análises farmacêuticas. **Pharmaceutical Technology**, p. 22-28, junho, 1998.

DUBREUIL, L.; HOUCKE, I.; MOUTON, Y.; ROSSIGNOL, J. F. *In vitro* evaluation of activities of nitazoxanide and tizoxanide against anaerobes and aerobic organisms. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 40, p. 2266-2270, 1996.

ERMER, J. Validation in pharmaceutical analysis. Part I: An integrate approach. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 24, p. 755-767, 2001.

ESPOSITO, M.; MOORES, S. L.; HEMPHILL, A. Nitazoxanide and thiazolides, a novel class of broad-spectrum anti-parasitic drugs. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 6, p. 1-11, 2006.

ESPOSITO, M.; MÜLLER, N.; HEMPHILL, A. Structure-activity relationships from *in vitro* efficacies of the thiazolide series against the intracellular apicomplexan protozoan *Neospora caninum*. **International Journal for Parasitology**, v. 37, p. 183-190, 2007.

FARTHING, M. J. G.; KELLY, P. Infectious diarrhoea. **Medicine**, v. 35:5, p. 251-256, 2007.

FERRARI, M. B. G.; RODRIGUEZ, R. Prevalência de helmintíases em apêndices cecais. **Revista do Colégio Brasileiro de Cirurgiões**, v. 31, n. 2, p. 77-82, 2004.

FOOD AND DRUG ADMINISTRATION (FDA). Reviewer Guidance: Validation of chromatographic methods. Center for Drug Evaluation and Research (CDER), November, 1994.

FOOD AND DRUG ADMINISTRATION (FDA), System Suitability Workshop, Nutley, NJ, June 1997.

FOX, L. M.; SARAVOLATZ, L. D. Nitazoxanide: A new thiazolide antiparasitic agent. **Reviews of Anti-infective Agents**, v. 40, p. 1173-1180, 2005.

GARCIA C. V.; NUDELMAN N. S.; STEPPE M.; SCHAPOVAL E. E. S. Structural elucidation of rabeprazole sodium photodegradation products. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 46, p. 88-93, 2008.

GEARY T. G.; WOOB, K.; MCCARTHY, J. S.; MACKENZIE, C. D.; HORTON, J.; PRICHARD, R. K.; SILVA, N. R.; OLLIARO, P. L.; LAZDINS-HELDS, J. K.; ENGELS, D. A.; BUNDY, D. A.; Unresolved issues in anthelmintic pharmacology for helminthiasis of humans. **International Journal for Parasitology**, v. 40, p. 1-13, 2010.

GILLES, H. M.; HOFFMAN, P. S. Treatment of intestinal parasitic infections: a review of nitazoxanide. **Trends in Parasitology**, v. 18, p. 95-97, 2002.

GOPU, C. L.; S. THOMAS; A. R. PARADKAR; K. R. MAHADIK. A validated stability indicating HPTLC method for determination of nitazoxanide. **Journal of Scientific & Industrial Research**, v. 66 (2), p.141-145, 2007.

GOTTLIEB, H.; KOTLYAR, V.; NUDELMAN, A. NMR chemical shifts of common laboratory solvents as trace impurities. **Journal of Organic Chemistry**, v. 62, p. 7512-7515, 1997.

ICH, In: International Conference on Harmonisation of Technical requirements for registration of pharmaceuticals for human use, Photostability testing of new drug substances and products. ICH Steering Committee, Switzerland, 1996.

ICH, In: International Conference on Harmonisation of Technical requirements for registration of pharmaceuticals for human use, Stability testing of new drug substances and products Q1A(R2). ICH Steering Committee, Switzerland, 2003.

ICH, In: International Conference on Harmonisation of Technical requirements for registration of pharmaceuticals for human use, Validation of analytical methods: text and methodology Q2(R1). ICH Steering Committee, Switzerland, 2005.

ICH, In: International Conference on Harmonisation of Technical requirements for registration of pharmaceuticals for human use, Impurities in new drug products. ICH Steering Committee, Switzerland, 2006.

JADHAV, A. S.; PATHARE, D. B.; SHINGARE, M. S. A validated stability indicating RP-LC method for nitazoxanide, a new antiparasitic compound. **Chromatographia**, v. 66, p. 595-600, 2007.

KALTA, R. R.; SHARMA, R.; CHATURVEDI, S. C. Simultaneous RPHPLC determination of nitazoxanide and ofloxacin in combined tablet dosage form. **Indian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 70 (4), p. 491-494, 2008.

KLICK, S.; MUIJSELAAR, P. G.; WATERVAL, J.; EICHINGER, T.; KORN, C.; GERDING, T. K.; DEBETS, A. J.; GRIEND, C. S.; BELD, C. V. D.; SOMSEN, G. W.; JONG, G. J. Toward a generic approach for stress testing of drug substances and drug products. **Pharmaceutical Technology**, February, p. 48-66, 2005.

KAPSE, G. K.; PRABHAKAR, G.; APPALA, R. S. Spectrophotometric methods for the estimation of nitazoxanide in pharmaceutical formulations. **Indian journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 68 (3), p. 403-406, 2006.

KOMMANABOYINA, B.; RHODES, C. T. Trends in stability testing, with emphasis on stability during distribution and storage. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, v. 25, p. 857-868, 1999.

KORBA, B.; ABIGAIL, M.; MARC, A.; ROSSIGNOL, J. F.; Nitazoxanide is an Effective Antiviral Agent Against Both HBV and HCV replication in vitro. **Antiviral Research**, v. 74, p. A1-A97, 2007.

Lindsay, S. High performance liquid chromatography. In: John Wiley & Sons Inc. (2<sup>nd</sup> ed), New York, 1992, 337 p.



LOPES, J. Cromatografia em Camada Delgada. In: COLLINS, C.; BRAGA, G.; BONATO, P. (Coord.). **Introdução a Métodos Cromatográficos**. 7. ed. São Paulo: Editora da Unicamp, 1997. p. 45-56.

MACEDO, H. S. Prevalência de parasitos e comensais intestinais em crianças de escolas da rede pública municipal de Paracatu (MG). **Revista Brasileira de Análises Clínicas**, v. 37, n. 4, p. 209-213, 2005

MACEDO, M. F. M.; ANDRADE, S. M. S.; MARTINS, C. S.; FRANCO, A. R.; MACEDO, P.; LIMA, L. B.; BELÉM, A. C. Helmintíases em pré-escolares de uma escola pública no município de Manaus, Amazonas, Brasil. **Boletim da Saúde**. V. 22, n. 1, p. 40-47, 2008.

MACHADO, R. C.; MARCARI, E. L.; CRISTANTE, S. F. V.; CARARETO, C. M. A. Giardíase e helmintíase em crianças de creches e escolas de 1º e 2º graus (públicas e privadas) da cidade de Mirassol (SP, Brasil). **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 32, n. 6, p. 697-704, 1999.

MATTHEUS, B. R. Regulatory aspects of stability testing in Europe. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, v. 25, p. 831-856, 1999.

MELO, M. C. B.; KLEM, V. G. Q.; MOTA, J. A. C.; PENNA, F. J. Parasitoses intestinais. **Revista Médica de Minas Gerais**, v. 14, s. 1, S3-S12, 2004.

MENDEZ, A.; CHAGASTELLES, P.; PALMA, E.; NARDI, N.; SCHAPOVAL, E. E. S. Thermal and alkaline stability of meropenem: Degradation products and cytotoxicity. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 350, p. 95-102, 2008.

METHA, A. C. Quality management in drug analysis. **Analyst**, v. 122, p. 83R-88R, 1997.

NASCIMENTO, A. P.; TREVISAN, M. G.; KEDOR-HACKMANN, E. R. M.; POPPI, R. J.; Simultaneous determination of dipyron and papaverine in pharmaceutical formulation using PLS regression and UV spectrophotometry. **Analytical letters**, v. 40, p. 975-986, 2007.

NARAYAN, H. J.; MAHENDRA, A. A. High performance liquid chromatography reverse phase method for determination of nitazoxanide from pharmaceutical formulations (oral suspension and tablets). **Research Journal of Chemistry and Environment**, v. 11, n. 3, p. 42-46, 2007.

NUDELMAN, N. S. **Estabilidad de medicamentos**. 1. ed. Buenos Aires: El Ateneo, 1975, 187 p.

O'DONNELL, P. B.; BOKSER, A. D. Stability of pharmaceutical products. In: TROY, D. B. (Ed). **REMINGTON: THE SCIENCE AND PRACTICE OF PHARMACY**. 21th ed. Philadelphia: The university of the sciences, 2006. cap. 52, p. 10251036.

PATTANAYAK, P.; SHARMA, R.; CHATURVEDI, S. C.; Simultaneous Spectrophotometric Estimation of Rabeprazole Sodium and Itopride HCl. **Analytical Letters**, v. 40, p. 2288-2294, 2007.

PAVIA, D. L.; LAMPAMAN, G. M.; KRIZ, G. S. **Introduction to spectroscopy**, 3<sup>a</sup> Edition, Washington: Thomson Learning. 2001, 579 p.

RAETHER, W.; HÄNEL, H. Nitroheterocyclic drugs with broad spectrum activity. **Parasitology Research**, v. 90, p. S19-S39, 2003.

RANE, V. P.; SANGSHETTI, J. N.; PATIL, K. R.; YEOLE, R. D.; SHINDE, D. B. Stability-indicating LC determination of nitazoxanide in bulk drug and in pharmaceutical dosage form. **Chromatographia**, v. 67, p. 455-459, 2008.

RANE, V. P.; SHINDE, D. B. Simultaneous high-performance liquid chromatographic determination of nitazoxanide and ofloxacin in tablet formulation. **Eurasian Journal of Analytical Chemistry**, v. 4 (3), p. 304-310, 2009.

Rossignol, J. F.; Cavier, R. **Chemical. Abstract**. 1975, 83, abstract 28216n.

ROSSIGNOL, J. F. Cryptosporidium and Giardia: Treatment options and prospects for new drugs. **Experimental Parasitology**, v. 124, p. 45-53, 2010.

ROSSIGNOL, J. F.; STACHULSKI, A. V. Syntheses and antibacterial activities of tizoxanide, an *N*-(nitrothiazolyl)salicylamide, and its *O*-aryl glucuronide. **Journal Chemical Research**, v. (S), p. 44-45, 1999.

SAKAMOTO, T.; HIYAMA, Y. Rapid determination of nitazoxanide in tablets using reversed-phase ultra-performance liquid chromatography (UPLC) and high-performance liquid chromatography. **Pharmazie**, v. 63, n. 7, p. 503-507, 2008.

SANTORO, M. I. R. M.; PRADO, M. S. A.; STEPPE, M.; KEDOR-HACKMANN, E. R. M. Eletroforese capilar: teoria e aplicações na análise de medicamentos. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 36, n. 1, p. 97-107, 2000.

SANTORO, M. G.; CIUCCI, A.; GIANFERRETTI, P.; BELARDO, G.; LA FRAZIA, S.; CARTA, S.; ROSSIGNOL, J. F. Thiazolides: a new class of broad-spectrum antiviral drugs targeting virus maturation. **Antiviral Research**, v. 74, p. A1-A97, 2007.

SARRAZIN, C.; ZEUZEM, S. Reviews in basic and clinical gastroenterology - resistance to direct antiviral agents in patients with hepatitis C virus Infection. **Gastroenterology**, v. 138, p. 447-462, 2010.

SHAH, R. B. ; BRYANT, A.; COLLIER, J.; HABIB, M. J. ; KHAN, M. A. Stability indicating validated HPLC method for quantification of levothyroxine with eight degradation peaks in the presence of excipients. **International Journal of Pharmceutics**, v. 360, p. 77-82, 2008.

SILVERSTEIN, R.M.; WEBSTER, F.X. Espectroscopia no infravermelho. **Identificação espectrométrica de compostos orgânicos**. 6 ed. Rio de Janeiro: LTC, 2000, p. 67-135.

SINGH, S.; BAKSHI, M. Guidance on Conduct of Stress Tests to Determine Inherent Stability of Drugs. **Pharmaceutical Technology On-Line**. p. 1-14, 2000.

SIPPEL, J.; SFAIR, L. L.; SCHAPOVAL, E. E. S.; STEPPE, M. New High-Performance Liquid Chromatographic Method for Determination of Clopidogrel in Coated Tablets. **Journal of AOAC International**, v. 91, p. 67-72, 2008.

Snyder, L. R.; Kirkland, J. J.; Glajch, J. L. **Practical HPLC method development and validation**. In: John Wiley & Sons Inc. (2<sup>nd</sup> ed). New York, USA, 1997, 765 p.

STEPPE, M.; PRADO, M. S. A.; TAVARES, M. F. M.; PINTO, T. J. A.; HACKMANN E. R. M. K.; SANTORO, M. I. R. M. Comparison of Micellar Electrokinetic Chromatography, Liquid Chromatography, and Microbiologic Assay for Analysis of Cephalexin in Oral Suspensions. **Journal of AOAC International**, v. 86, p. 707-713, 2003.

STOCKIS, A.; DEROUBAIX, X.; LINS, R.; JEANBAPTISTE, B.; CALDERON, P.; ROSSIGNOL, J. F. Pharmacokinetics of nitazoxanide after single oral dose administration in 6 healthy volunteers. **International Journal of Clinical Pharmacology and Therapeutics**, v. 34, p. 349-351, 1996.

SWARTZ, M. E.; KRULL, I. S. Validação de métodos cromatográficos. **Pharmaceutical Technology**, v. 2, p. 12-20, 1998.

THE MERCK Index. **An encyclopedia of chemicals, drugs and biologics**. Version 12.3. New Jersey: Merck & Co. Inc., 2000. Nitazoxanide. CD ROM.

UNITED STATES PHARMACOPEIA, The (USP) 32 ed. Rokville, United States Convention, 2009.

VALLADÃO, D. M. S.; IONASHIRO, M.; NETTO, J. Z.; Determinação de fármacos diuréticos em associação por cromatografia em camada delgada e espectrofotometria. **Química Nova**, v. 31, p. 44-46, 2008.

VAUCHER, L. C.; PAIM, C. S.; LANGE, A. D.; SCHAPOVAL, E. E. S. LC method for telithromycin in tablets: A stability-indicating assay. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 366, p. 82-87, 2009.

WATSON, G. D. High pressure liquid chromatography. **Pharmaceutical Analysis: A textbook for pharmacy students and pharmaceutical chemists**. London: Churchill Livingstone, 2005a. Cap. 12, p. 237-276.

WATSON, G. D. Nuclear magnetic resonance spectroscopy. **Pharmaceutical Analysis: A textbook for pharmacy students and pharmaceutical chemists**. London: Churchill Livingstone, 2005b. Cap. 7, p. 145-166.

WHITE, A. C. Nitazoxanide: a new broad spectrum antiparasitic agent. **Expert Review of Anti-infective Therapy**, v. 2, p. 43-50, 2004.

WHITE, A. C. Nitazoxanide: an important advance in anti-parasitic therapy. **American Journal Tropical Medicine and Hygiene**, v. 68, p. 382-383, 2003.

ZHAO, Z.; ZHANG, L.; XUE, F.; ZHANG, T. Metalobic profile of nitazoxanide in goat feces. **Chromatographia**, v. 68, p. 731-738, 2008a.

ZHAO, Z.; ZHANG, L.; XUE, F.; WANG, X.; ZHENG, W.; ZHANG, T.; FEI, C.; ZHANG, K.; QIU, M.; XIN, R.; YANG, F. Liquid chromatography-tandem mass spectrometry analysis of nitazoxanide and its major metabolites in goat. **Journal of Chromatography B**, v. 875, p. 427-436, 2008b.

ZULU, I.; KELLY, P.; NJOBVU, L.; SIANONGO, S.; KAONGA, K.; MCDONALD, V.; FARTHING, M.; POLLOK, R. Nitazoxanide for persistent diarrhoea in Zambian acquired immune deficiency syndrome patients: a randomized-controlled trial. **Alimentary Pharmacology & Therapeutics**, v. 21, p. 757-763, 2005.