

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

Faculdade de Farmácia

Trabalho de Conclusão de Curso de Farmácia

**ESTUDO DE SOLUBILIDADE E ENSAIO PRELIMINAR DO PERFIL DE
DISSOLUÇÃO DO FÁRMACO NITAZOXANIDA EM SUSPENSÃO ORAL**

Leonardo Capra Pezzi

Porto Alegre, Dezembro de 2019

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

Faculdade de Farmácia

Trabalho de Conclusão de Curso de Farmácia

**ESTUDO DE SOLUBILIDADE E ENSAIO PRELIMINAR DO PERFIL DE
DISSOLUÇÃO DO FÁRMACO NITAZOXANIDA EM SUSPENSÃO ORAL**

Leonardo Capra Pezzi

Trabalho de conclusão de curso apresentado à
Faculdade de Farmácia da Universidade Federal
do Rio Grande do Sul como requisito parcial para
obtenção do grau de bacharel em farmácia.

Orientador: Prof. Dr. Andreas Sebastian
Loureiro Mendez

Co-Orientador: Ms. Fábio de Souza Barbosa

Porto Alegre, Dezembro de 2019

AGRADECIMENTOS

Sempre gostei muito de escrever, por mais que às vezes seja um pouco difícil de colocar as palavras em papel. Mas nesse momento elas vem com uma facilidade enorme. Esse é, sem dúvidas, um dos momentos mais esperados dos últimos cinco anos, o momento em que começamos a escrever o agradecimento do TCC.

Dizer obrigado nem sempre é fácil, ainda mais num momento como esse, que representa o fim de um ciclo de nossas vidas e o início de outro, muito maior e provavelmente mais desafiador, mas quando se está falando em algo bom, as palavras vêm.

Eu tenho que agradecer, primeiramente, as pessoas que fizeram de tudo para que eu chegasse aqui. A minha mãe, Liamara e ao Paulo, meu pai de coração, sem vocês eu com toda certeza não teria conquistado tudo isso que hoje representa um pouco mais quem eu sou. A vocês toda a gratidão do mundo.

Ao meu pai, Silvio e minha madrasta, Carla, obrigado por todo o carinho.

A minha família, por servir de base em todos os momentos.

A minha irmã de coração e alma, Natally. A tua presença na minha vida traz uma leveza e uma vontade de seguir em frente. Os sorrisos e risadas que tu me proporcionas fazem tudo melhor, e todo teu apoio foi essencial nesses anos. Obrigado por estar do meu lado, por servir de âncora, porto seguro, vento e farol, me permitindo ao mesmo tempo seguir em frente, com os pés no chão, mas sem deixar de sonhar e me sentir em casa e por sempre me mostrar o melhor caminho a seguir. Tu és, sem dúvida, a melhor pessoa que eu já tive o prazer de ter na minha vida, obrigado por fazer parte dela. When I'm with you, I feel at home. You'll always be my guiding light. Te amo.

A Rosana, é difícil achar algo para dizer pois palavras não conseguem definir muito bem a nossa amizade. Desde o primeiro dia de faculdade eu senti uma conexão contigo e essa conexão só foi se aprofundando nos cinco anos que se passaram. Muito obrigado por todo o companheirismo, risadas, choros, surtos e tudo o que a nossa amizade nos trouxe.

A Juliana, minha companheira de laboratório, obrigado por sempre estar comigo nos melhores e piores momentos, dando risada ou apoio.

A Larissa e Letícia, minhas saudades diárias.

Aos meus irmãos, Fernando, Lionel e Luiz, vocês fizeram os meus dias muito mais alegres e as aulas muito mais aturáveis. Às vezes a vida te dá irmãos que não são de sangue, e sei que encontrei em vocês essa irmandade.

Aos meus colegas e amigos do LCQFar, obrigado pelos três anos de risadas, trabalhos e por ter me acolhido como uma família, vocês sempre vão morar no meu coração.

Aos professores que me acompanharam nessa jornada.

As minhas “chefinhas” do coração, Mariana e Caroline, obrigado pelas risadas e conversas, conselhos e cafés divididos ao longo desses anos e que venham muitos mais pela frente. Vocês são um dos motivos que decidi continuar na vida acadêmica e fazer meu doutorado, obrigado pelo apoio e incentivo.

Ao meu orientador, Andreas Mendez, obrigado pelo carinho, paciência e pelos ensinamentos.

Ao meu coorientador, Fabio Barbosa, se não fosse por ti, eu com certeza não teria me apaixonado tanto pelo que eu faço hoje. Muito obrigado por todos esses dias de trabalho e amizade cultivados. Tu és o cara.

Foram cinco anos de muitos desafios e mudanças, de muitos desmoronamentos e muitas reconstruções, e eu tenho que agradecer a cada um que esteve nessa jornada comigo e principalmente aqueles que vão continuar daqui pra frente. Vocês sem dúvidas foram meu alicerce para chegar até aqui.

Como diria Bruce Wayne um dos personagens que eu mais tenho amor no mundo: Things inevitably fall apart, the art of life seems to be in how you put them back together.

Então, obrigado a todos os que seguiram esse caminho de desconstrução e reconstrução comigo, que essa nova fase seja repleta de descobertas.

Amo vocês incondicionalmente.

Leonardo Pezzi.

RESUMO

A nitazoxanida, um pró-fármaco de amplo espectro utilizado em infecções parasitárias, é comercializada em duas formas farmacêuticas: comprimidos revestidos de 500 mg e pó para suspensão oral de 20 mg/mL. Hoje, com a lei dos genéricos, além do medicamento de referência, Annita®, há também disponível no mercado as opções Nitazoxanida e Azox®. Com a presença de outras formulações além da de referência no mercado, é importante um rigoroso controle de qualidade para assegurar a eficácia e segurança dessas formulações. A nitazoxanida já possui monografia na 6ª ed da Farmacopeia Brasileira, o que serve para direcionar os testes a serem feitos para realizar esse controle de qualidade, entretanto, observa-se que para a Nitazoxanida Suspensão oral não há um teste de perfil de dissolução. Sabendo da importância de traçar um perfil de dissolução para fins de comparação entre referência e genéricos, e visto a ausência de um método com este propósito na Farmacopeia, o trabalho teve como objetivo o desenvolvimento de um método de perfil de dissolução de Nitazoxanida suspensão oral. No decorrer do trabalho foram testadas diversas condições e o método com melhores resultados foi em meio tampão fosfato pH 7,4 e 5% de CPC, com agitação de 100 rpm, temperatura de banho de 37 °C, filtros com porosidade de 35 µm, tempo total de dissolução de 120 minutos e quantificação por CLAE.

Palavras-chave: Nitazoxanida, dissolução, controle de qualidade, estabilidade, solubilidade.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estrutura da molécula de Nitazoxanida.....	13
Figura 2. Estrutura do possível produto de degradação formado.....	13
Figura 3. Fotografia dos balões volumétricos contendo formulação de NTZ suspensão oral em ACN.	21
Figura 4. Representação da solubilidade de NTZ em função do pH.	22
Figura 5. Ionização entre as microespécies de NTZ.	22
Figura 6. Estruturas químicas dos tensoativos utilizados para avaliar a solubilidade da molécula de NTZ, onde A) SDS; B) TWEEN 80; C) CPC.....	23
Figura 7. Concentração de NTZ solubilizada em função da porcentagem de tensoativo presente no meio.	24
Figura 8. Concentração de NTZ solubilizada em função da concentração molar dos tensoativos presentes no meio.	25
Figura 9. Cromatogramas referentes aos picos de NTZ e PD1 em diferentes tempos de coleta e espectros de absorção UV da molécula de NTZ e PD1....	27
Figura 10. Aumento gradual da porcentagem residual do PD1, diminuição gradual da porcentagem residual de NTZ e soma das porcentagens residuais de NTZ e PD1, que se mantém regulares, em relação ao tempo, ambos em tampão fosfato de sódio 25 mM e pH 7,4.....	28
Figura 11. Espectro de massas da NTZ, obtida com energia de colisão de 10 eV.	29
Figura 12. Fragmentação da molécula de NTZ, a partir dos sinais m/z obtidos através de espectrometria de massas.....	29
Figura 13. Espectro de massas da TZX, obtida com energia de colisão de 10 eV.	30

Figura 14. Fragmentação da molécula de TZX, a partir dos sinais m/z obtidos através de espectrometria de massas.....	30
Figura 15. Cuba com meio de dissolução com SDS 6% para ensaio de dissolução de NTZ em suspensão oral.	32
Figura 16. Cromatograma de suspensão oral de NTZ em meio de dissolução com SDS 6% para ensaio preliminar de dissolução.....	32
Figura 17. Cuba com meio de dissolução com CPC 3% para ensaio de dissolução de NTZ em suspensão oral.	33
Figura 18. Curva representando porcentagem de massa de NTZ dissolvida em função do tempo nos meios de dissolução com CPC 2% e 3% para ensaio de dissolução de NTZ em suspensão oral.	33
Figura 19. Cuba com meio de dissolução com tensoativo CPC 5% e tampão fosfato 25 mM pH 7,4 para ensaio de dissolução de NTZ em suspensão oral em tempo zero.	34
Figura 20. Cuba com meio de dissolução com tensoativo CPC 5% e tampão fosfato 25 mM pH 7,4 para ensaio de dissolução de NTZ em suspensão oral no tempo de 45 minutos.....	35
Figura 21. Curva representando a porcentagem de massa de NTZ dissolvida em função do tempo no meio de dissolução com CPC 3% e tampão fosfato 25 mM pH 7,4 para ensaio de dissolução de NTZ em suspensão oral, com doseamento por CLAE-DAD.....	36
Figura 22. Curva representando a porcentagem de massa de NTZ dissolvida em função do tempo no meio de dissolução com CPC 5% e tampão fosfato 25 mM pH 7,4 para ensaio de dissolução de NTZ em suspensão oral, com doseamento por CLAE-DAD.....	37

Figura 23. Curva representando a porcentagem de massa de NTZ dissolvida em função do tempo no meio de dissolução com BCP 6% e tampão fosfato 25 mM pH 7,5 para ensaio de dissolução de NTZ em suspensão oral, com doseamento por CLAE-DAD. 38

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Resultado do teor residual de NTZ (%) em suspensão oral, a partir de análise por CLAE-DAD.....	20
Tabela 2. Características físico-químicas dos tensoativos utilizados para avaliar a solubilidade da molécula de NTZ.	23
Tabela 3. Concentração residual de NTZ (%) em função do tempo, relacionando a sua estabilidade nos diferentes pHs testados.	26
Tabela 4. Aumento gradual da porcentagem residual do PD1 e soma das porcentagens residuais de NTZ e PD1, que se mantêm regulares, em relação ao tempo, ambos em tampão fosfato de sódio 25 mM e diferentes pHs.....	28

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACN - Acetonitrila

BCP – Brometo de Cetiltrimetilamonio

CLAE – Cromatografia Liquida de Alta Eficiência

CMC – Concentração Micelar Critica

CPC – Cloreto de Cetilpiridineo

DPR – Desvio Padrão Relativo

eV – Elétron volts

F.M. – Formula Molecular

FB – Farmacopeia Brasileira

FDA – Food and Drug Administration

HLB – Balanço Hidrofílico/ Lipofílico

kV – kilo volts

M.M – Massa Molar

m/z – Razão massa/carga

NTZ – Nitazoxanida

PD1 – Produto de degradação 1

PFOR – Piruvato Ferredoxina Oxireductase

RDC – Resolução da Diretoria Colegiada

SDS – Dodecil Sulfato de Sódio

SQR – Substância Química de Referencia

TP – Tampão

TZX – Tizoxanida

UPLC – Cromatografia Liquida de Ultra Eficiência

USP – United States Pharmacopeia

UV – DAD – Ultravioleta com detecção de arranjo de diodos

UV – Ultravioleta

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	11
2. OBJETIVOS	14
2.1 Objetivo geral	14
2.2 Objetivos específicos	14
3. MATERIAIS E MÉTODOS	15
3.1 Nitazoxanida	15
3.2. Substância química de referência e produto farmacêutico	15
3.2.1. Substância química de referência (SQR):.....	15
3.2.2. Produto farmacêutico:.....	15
3.3. Solventes e Reagentes	16
3.4. Equipamentos	16
3.5. Quantificação das amostras por CLAE-DAD	16
3.6. Doseamento.....	17
3.7. Avaliação da solubilidade da Nitazoxanida	17
3.8. Avaliação da estabilidade da nitazoxanida	18
3.9. Ensaios preliminares de dissolução	19
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	20
4.1. Doseamento.....	20
4.2 Solubilidade	21
4.3 Estabilidade	25
4.4 Estudo de dissolução	31
4.4.1. Testes com SDS	31
4.4.2. Testes com cloreto de cetilpiridíneo.....	32
4.4.3. Método descrito na Farmacopeia Brasileira 6ª edição.....	37
5. CONCLUSÕES	39
6. REFERENCIAS.....	40

1. INTRODUÇÃO

A nitazoxanida, um fármaco de amplo espectro utilizado em infecções parasitárias, descoberta na década de 1980, inicialmente indicada para teníase (Rossignol e Maisonneuve, 1984), logo teve sua eficácia contra diversas doenças causadas por parasitas comprovada. Doenças como ciclosporíase, causada por *Cyclospora cayetanensis*, onde até hoje é o único medicamento eficaz contra esta infecção (Rossignol e Bréchet, 2019), helmintíases, amebíase, giardíase, blastocistose, balantidíase e isosporíase. Também já foram descritos efeitos contra algumas bactérias incluindo *Clostridium* spp. (Musher et al, 2006). Há também artigos que avaliam atividade antiviral de amplo espectro deste fármaco (Rossignol, 2014), e estudos clínicos piloto que avaliam sua atividade contra hepatite B (Rossignol e Bréchet, 2019). Novos estudos mostram um potencial para tratamento da doença de Alzheimer, pois a nitazoxanida foi capaz de diminuir os níveis de A β e formação de placa senil no hipocampo e no córtex cerebral. Houve também melhorias na aprendizagem e na memória de ratos transgênicos APP/PS1 (Fan, L., Qiu, X., Zhu, Z. *et al*, 2019).

Derivada do nitrotiazol, a nitazoxanida (NTZ) é rapidamente hidrolisada à tizoxanida (TZX), seu metabólito, também ativo (Ministério da Saúde, 29/10/13). Diferente de outros fármacos derivados do nitrotiazol, a NTZ (Figura 1) e a TZX (Figura 2) interagem diretamente com a enzima piruvato ferredoxina oxidoreductase (PFOR), inibindo-a, e conseqüentemente inibindo a metabolização de glicose (Hoffman et al., 2007).

Mesmo tendo sido descoberta na década de 80, somente em 2002 a nitazoxanida (NTZ) foi liberada para uso pelo órgão americano de regulação de medicamentos e alimentos (Food and Drug Administration - FDA) (Gilles e Hoffman, 2002; White, 2003; Fox e Saravolatz, 2005; Rossignol, 2010). Atualmente, no Brasil, ela é comercializada em duas formas: comprimidos revestidos de 500 mg e pó para suspensão oral de 20 mg/mL. Hoje, com a lei dos genéricos, além do medicamento de referência (Annita®, do laboratório Farmaquímica, comercializada desde 2006), há também disponível no mercado as opções Nitazoxanida e Azox®, pelo laboratório Eurofarma. Com isso, é importante destacar a relevância do controle de qualidade dessas formulações através de diversos testes.

A NTZ possui monografia oficial na Farmacopeia Brasileira (6^a ed.), onde são apresentados os testes de controle de qualidade necessários e como realizá-los. Um destes, o teste de dissolução, é definido como a liberação de um fármaco de sua forma farmacêutica e a sua disponibilidade para absorção pelo organismo (Chowdary & Rajyalakshmi, 1987; Marcolongo, 2003, Pita et al., 2004). É um teste importante em diversas fases do ciclo de um medicamento, desde o seu desenvolvimento até o controle de qualidade final (Marcolongo, 2003). O teste de dissolução presente na Farmacopeia Brasileira 6^a ed. (FB) (Brasil, 2019), é de um único ponto, ou seja, a amostra é coletada após um determinado tempo e analisada por CLAE e assim se assegura o quanto desta substância foi dissolvida e se está dentro dos padrões determinados ou não.

Além do método de ponto único descrito na FB, o ensaio de dissolução pode ser realizado por perfil de dissolução, com o objetivo de determinar a porcentagem de fármaco dissolvida em função do tempo utilizando diferentes tempos de amostragem, comparando perfis do medicamento de referência com medicamentos genéricos e similares, para fins de registro dos mesmos na ANVISA. Segundo a RDC de número 31, de 11 de agosto de 2010, uma característica importante dos métodos de perfil de dissolução é a capacidade dos mesmos de evidenciar as diferenças entre as formulações, conhecidos como métodos discriminativos, que são aqueles capazes de mostrar mudanças significativas nas formulações e nos processos de fabricação, as quais podem afetar o desempenho da formulação (Brasil, 2010).

A comparação dos perfis de dissolução, no caso de um ensaio de perfil, se vê útil para conhecer o comportamento dos diferentes medicamentos, referência, similares e genéricos, antes de submetê-los a estudos de biodisponibilidade relativa e bioequivalência, e registrá-los no órgão responsável, que no Brasil é a ANVISA (Gibaldi, 1991; Manadas et al., 2002). Essas comparações, de acordo com a RDC 31, devem ser avaliadas através de uma curva como um todo, usando o método modelo independente simples, que quando em teste combinado, emprega um fator de diferença (F1) e um fator de semelhança (F2) (Brasil, 2010).

Visto que são estudos de grande importância, deve-se sempre prezar por resultados adequados e confiáveis, portanto o desenvolvimento e escolha do melhor método são essenciais para tal. Para isso, segundo o guia de dissolução

aplicável a medicamentos genéricos, novos e similares, é importante testar vários meios de dissolução, com diferentes excipientes, variadas faixas de pH, velocidades de rotação e temperatura, até chegar ao meio ideal para as análises a serem realizadas, e realizar a validação do mesmo para garantir que o método analítico proposto é adequado para aquilo a que foi proposto (Dressman e Krämer, 2009; Brasil, 2018).

Com essa ideia em mente, e sabendo da importância de traçar um perfil de dissolução para fins de comparação entre referência e genéricos, e visto a ausência de um método com este propósito nas Farmacopeias, o presente trabalho tem como objetivo desenvolver e estudar preliminarmente um método de perfil de dissolução para suspensão de Nitazoxanida, assim como estudar sua solubilidade em alguns meios, para determinar qual o meio e o método mais adequado para estes fins.

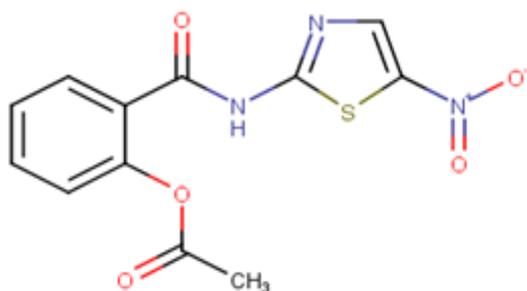


Figura 1. Estrutura da molécula de Nitazoxanida.



Figura 2. Estrutura do possível produto de degradação formado.

2. OJETIVOS

2.1 Objetivo geral

- Estudar preliminarmente um método de dissolução para NTZ na forma de suspensão.

2.2 Objetivos específicos

- Avaliar a solubilidade do fármaco em diferentes meios de dissolução, determinar o melhor e comparar o meio proposto ao meio da FB 6º ed;
- Avaliar a estabilidade do fármaco em diferentes condições e pHs;
- Determinação do teor das suspensões em estudo;
- Desenvolvimento preliminar de um método de dissolução simples e exequível;

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Nitazoxanida

NTZ (Figura 1) é uma nitrotiazolil-salicilamida e apresenta as seguintes características (FB 6ª ed):

- Aspecto: pó cristalino levemente amarelado;
- Nome químico: 2-acetiloxi-N-(5-nitro-2-tiazolil) benzamida
- Fórmula molecular: C₁₂H₉N₃O₅S;
- Massa molecular: 307,28;
- 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;

3.2. Substância química de referência e produto farmacêutico

3.2.1. Substância química de referência (SQR):

A solução estoque de nitazoxanida SQR foi preparada transferindo 10 mg de fármaco para um balão volumétrico de 100 mL. Neste balão foram adicionados 70 mL de acetonitrila e o mesmo foi levado à banho com ultrassom por 10 minutos. Após este tempo o volume do balão foi completado com acetonitrila para obter-se uma concentração de 100,0 µg/mL. As diluições para as concentrações de análise foram realizadas com os meios testados para as amostras.

3.2.2. Produto farmacêutico:

Para o estudo foram utilizadas amostras comerciais de nitazoxanida pó para suspensão oral, adquiridas no comércio local. Medicamento referência ANNITA® (Farmoquímica S/A), e medicamento genérico NITAZOXANIDA (Eurofarma Laboratórios S.A), ambos na concentração de 20,0 mg/mL.

3.3. Solventes e Reagentes

- Acetonitrila grau CLAE - Merk®
- Ácido clorídrico – Sigma-Aldrich®
- Ácido Fórmico – Synth®
- Água ultra-pura
- Brometo de cetiltrimetilanômio
- Cloreto de cetilpiridina
- Dodecil sulfato de sódio - Synth®
- Fostato de sódio monobásico - Vetec®
- Tween® 80

3.4. Equipamentos

- pHmetro digital – Digimed
- Cromatógrafo a líquido – Shimadzu Prominence®
- Dissolutor – Varian VK 7000®

3.5. Quantificação das amostras por CLAE-DAD

As análises quantitativas foram realizadas por cromatografia líquida de alta eficiência com detector de arranjo de diodos, seguindo metodologia descrita na farmacopeia brasileira (FB 6ª ed) e por Malesuik et al. (2010), que utiliza um sistema de fase reversa com as seguintes condições:

- Fase estacionária: Coluna C-18 (250 x 4,6 mm, 5 µm)
- Fase móvel: Ácido Fórmico 0,1% (pH 3,8): Acetonitrila (45:55, v/v)
- Modo de eluição: Isocrático;
- Vazão: 1 mL/min;
- Detecção UV-DAD: 240 nm;
- Volume de injeção: 20 µL.

As análises foram realizadas em cromatógrafo a líquido Shimadzu Prominence®, equipado com desgaseificador DGU-20A5, bomba LC-20 AC, injetor automático SIL-20 AC, forno de coluna CTO-20 AC, detector SPD-M20A e módulo controlador CBM-20A (Shimadzu, Kyoto, Japan). O software utilizado

para controlar o equipamento e analisar as respostas obtidas do sistema cromatográfico foi o LC Solution V. 1.24 SP1.

3.6. Doseamento

O doseamento foi avaliado através do método de Malesuik et al. (2010), comparando a amostra e o padrão. Para o preparo da amostra, foi calculado o peso médio de Nitazoxanida, pesado uma quantidade de pó equivalente à 10,0 mg do princípio ativo, diluído com ACN em balão de 100 mL, colocado em ultrassom por 10 minutos e diluído novamente com ACN para obter uma solução de concentração final de 30,0 µg/mL. O mesmo procedimento de preparo foi utilizado com o padrão. Após o preparo, as amostras e o padrão foram filtrados em filtro de 0,45 µm para posterior análise por CLAE.

Também foi realizado o doseamento pelo método descrito na FB 6 ed. , que consiste em reconstituir três frascos da solução, conforme indicado no rótulo, homogeneizar, transferir o volume equivalente a 50,0 mg de NTZ para um balão volumétrico de 250 mL, adicionar, em média, 150 mL de ACN e levar ao ultrassom por 10 minutos. Completar o volume e ajustar o volume com ACN, homogeneizar e filtrar a solução. Preparar uma solução final de 30,0 µg/mL. O padrão é preparado da mesma maneira que o padrão descrito anteriormente; pesar aproximadamente 10,0 mg de NTZ SQR, passar para balão volumétrico de 100 mL, adicionar cerca de 75 mL de ACN, levar a ultrassom por 10 minutos, completar o volume do balão com ACN, e preparar uma solução final de 30,0 µg/mL.

3.7. Avaliação da solubilidade da Nitazoxanida

A solubilidade intrínseca da nitazoxanida foi avaliada em uma ampla faixa de pH e em soluções contendo tensoativos em diferentes concentrações. Para os testes, em tubos de ensaio com rosca, foram adicionados 5 mL do meio a ser testado, e uma quantidade suficiente de nitazoxanida (matéria-prima) para formação de precipitado, a fim de se obter uma suspensão. As amostras foram mantidas em banho termostaticado na temperatura de 37 °C durante 24 horas, com agitação magnética. Após as 24 horas, uma alíquota de cada amostra foi

coletada e filtrada em filtro de 0,22 μm para posterior análise por CLAE. Os meios testados estão listados abaixo:

- HCl 0,1 N
- Tampão fosfato de potássio 10 mM nos pHs de 4; 5; 6; 7; 8.
- Tween[®] 80 nas concentrações de 0,5; 1,5 e 2,5%
- Dodecil Sulfato de Sódio na faixa de concentração de 0,1 a 7 %
- Cloreto de cetilpiridínio na faixa de concentração de 0,25 a 3 %.

3.8. Avaliação da estabilidade da nitazoxanida

Sabendo que a nitazoxanida quando administrada é rapidamente convertida em tizoxanida através da hidrólise do éster presente na molécula, e baseando-se em artigos que relatam sua hidrólise (Ali et al., 2011 e Malesuik et al., 2012). , principalmente em pH alcalino, avaliou-se a estabilidade do fármaco em valores de pH relevantes fisiologicamente e mais utilizados em ensaios de dissolução. Para o teste, a estabilidade da nitazoxanida foi avaliada em HCl 0,1 N, e tampão fosfato em pH de 6,8 e 7,4. O ensaio foi realizado utilizando matéria prima de nitazoxanida, que foi primeiramente diluída em acetonitrila na concentração de 400,0 $\mu\text{g/mL}$, e posteriormente diluída no meio de interesse para 100 $\mu\text{g/mL}$. As amostras foram armazenadas a 37 °C, e alíquotas foram coletadas em diferentes intervalos de tempo. Para a análise, as amostras coletadas foram diluídas 1:1 em fase móvel, filtradas em filtro de 0,45 μm e analisadas.

O produto de degradação formado foi analisado em um UPLC Waters Acquity (Waters Corp, Milford, EUA), acoplado a um espectrômetro de massas Micromass Q-ToF micro (Waters Corp, Milford, EUA), equipado com uma interface ESI operando em modo de ion positivo utilizando voltagem do capilar de 3.0 kV. Outros parâmetros utilizados foram: temperatura da fonte a 100 °C, temperatura de dessolvatação de 300 °C, fluxo do gás de dessolvatação (N₂) a 600 L/h. A detecção foi realizada considerando uma faixa de massas de 100 – 800 m/z . A fase móvel consistia em água contendo 0,1 % de ácido fórmico e acetonitrila contendo ácido fórmico 0,1 % (45:55 v/v) com um fluxo de 0,2

mL/min. Uma coluna Zorbax Eclipse Plus C-18 (2,5 x 50 mm, i.d., tamanho de partícula de 1,8 µm) (Agilente Technologies, CA, EUA) foi utilizada.

3.9. Ensaio preliminares de dissolução

A fim de definir o melhor meio para o perfil de dissolução de NTZ suspensão, foram feitos diversos testes com alguns meios contendo diferentes tensoativos e em diferentes valores de pH, diferentes velocidades de rotação das pás, de temperatura do banho e volume de coleta. Usou-se o meio disponível na FB 6 ed para fins de comparação, lembrando que o meio da farmacopeia é de dosagem, com apenas um ponto de coleta, e não um meio de perfil. Os meios testados foram:

- Cloreto de cetilpiridínio nas concentrações de 2 e 3 %.
- SDS nas concentrações de 1; 2 e 3%
- Meio USP/ FB 6 ed - tampão fosfato pH 7,5 contendo 6% de brometo de cetiltrimetilamônio.

Esses testes foram realizados com associação de água e tensoativos, e também de tampão nos pHs de 6,8 e 7,4 e tensoativos. Foram testadas também as velocidades de 75 e 100 rpm das pás, e as temperaturas de 25 e 37 °C.

As análises foram realizadas em Dissolutor Varian VK 7000®, equipado com amostrador Vk 750D, bomba peristáltica Vk 810, controlador Vk 8000, aquecedor Vk 750D.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Doseamento

O peso médio dos pós para suspensão oral foi de 15,90 g, sendo que 0,0176 g de amostra equivalem a 1 mg de NTZ. O doseamento foi realizado com o objetivo de determinar o teor de fármaco contido nas amostras. Obteve-se um teor de 96,45% com DPR de 1,26% (Tabela 1) pelo método Malesuik et al. (2010), sendo considerado adequado, visto que esse fármaco possui monografia na 6 edição da FB, e que o valor obtido se encontra dentro do intervalo estipulado por essa monografia (90 a 110%). O doseamento também foi realizado pelo método da FB, obteve-se um teor de 48,52% com um DPR de 11,14% (Tabela 1) e isso se deve ao fato de que, a partir do momento que a suspensão entra em contato com a ACN, aglomerados (Figura 3) se formam e o fármaco fica retido dentro deles, não havendo liberação do mesmo para o meio e assim diminuindo a concentração para análise.

Tabela 1. Resultado do teor residual de NTZ (%) em suspensão oral, a partir de análise por CLAE-DAD.

	Teor (%)	
	Método FB	Método Malesuik
Amostra 1	46,37	95,78
Amostra 2	46,38	95,90
Amostra 3	43,76	98,18
Amostra 4	44,01	97,83
Amostra 5	56,22	95,58
Amostra 6	54,40	95,45
Média	48,52	96,45
DPR	11,14	1,26



Figura 3. Fotografia dos balões volumétricos contendo formulação de NTZ suspensão oral em ACN.

4.2 Solubilidade

A NTZ é classificada como uma molécula de classe IV no sistema de classificação biofarmacêutica, o que significa baixa solubilidade e baixa permeabilidade, algo que foi observado neste estudo primeiramente devido ao fato de ela ter realmente se mostrado pouco solúvel em água e em HCl, e também devido ao fato de se ter usado altas concentrações de tensoativos para melhorar sua solubilidade nos meios utilizados. De acordo com a Farmacopeia Brasileira 6ª Ed. (Basill, 2019), a NTZ é considerada como uma substância praticamente insolúvel.

O estudo de solubilidade teve como objetivo determinar a concentração de saturação do fármaco em diferentes meios para determinar a solubilidade intrínseca da molécula. Para a água, o fármaco apresentou uma solubilidade de 7,99 $\mu\text{g/mL}$, o que condiz com o encontrado na literatura, que é de aproximadamente 7,6 $\mu\text{g/mL}$ (Drugbank e HMDB). Quanto à solubilidade em HCl 0,1M, o valor encontrado foi de 6,65 $\mu\text{g/mL}$. Em tampão fosfato de potássio 25 mM pH 6,8 apresentou solubilidade de 14,70 $\mu\text{g/mL}$. Já em tampão fosfato de potássio 25 mM pH 7,4 apresentou uma solubilidade de 60,59 $\mu\text{g/mL}$.

A solubilidade em função do pH foi avaliada na faixa de 1 a 8 (Figura 4), sendo observada uma maior solubilidade do fármaco em pH levemente alcalino. Em pH 5 observou-se uma solubilidade de 7,32 $\mu\text{g/mL}$; e nos pHs 7 e 8 observou-se, respectivamente 134,58 $\mu\text{g/mL}$ e 250,16 $\mu\text{g/mL}$. A maior solubilidade em

meio alcalino se deve à ionização do fármaco, devido ao seu pKa de 10,62. Um gráfico representativo da ionização entre as micro-espécies e NTZ, realizado no software Chemicalize®, está representado na Figura 5.

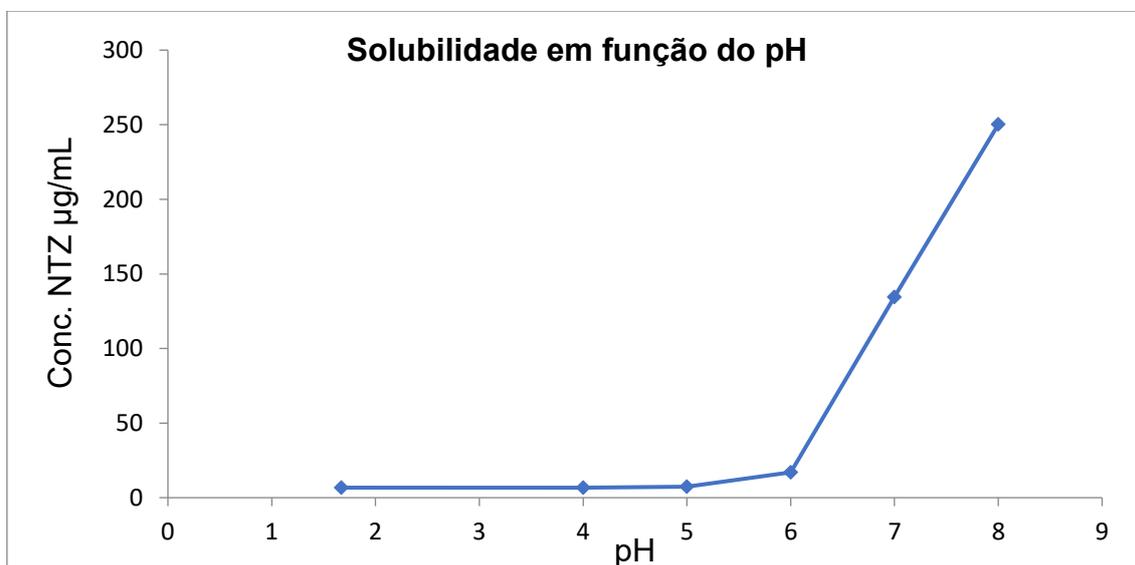


Figura 4. Representação da solubilidade de NTZ em função do pH.

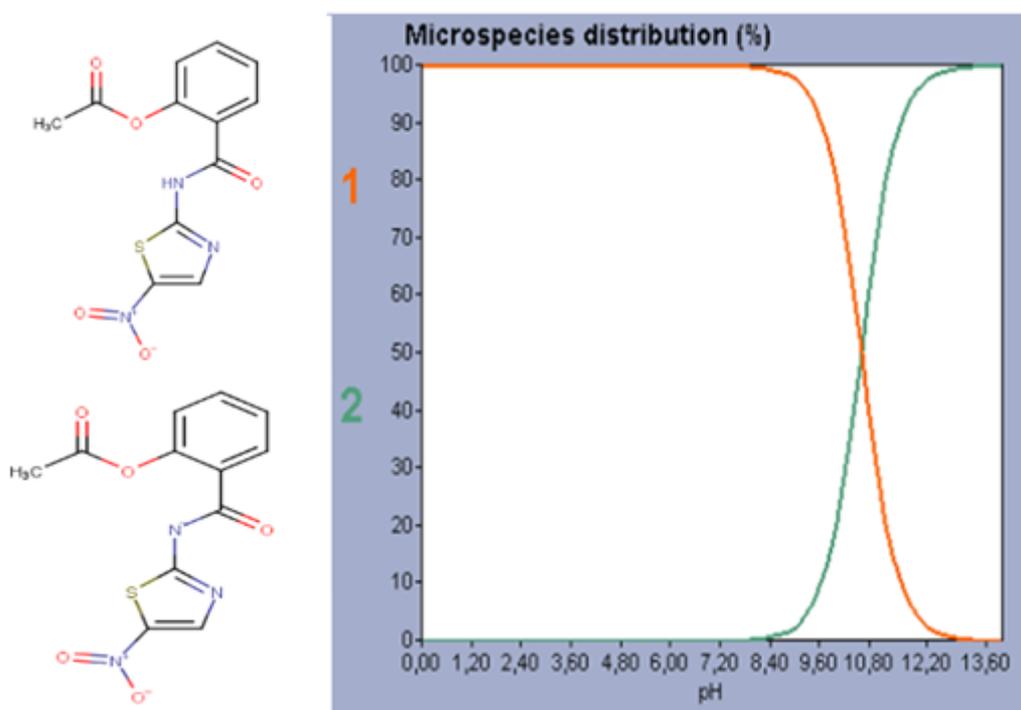


Figura 5. Ionização entre as microespécies de NTZ.

A solubilidade em função dos tensoativos também foi avaliada usando diferentes classes de tensoativos, como SDS (tensoativo aniônico), CPC (tensoativo catiônico) e Tween 80 (tensoativo neutro). As características físico-químicas e as estruturas dos tensoativos estão apresentadas na Tabela 2 e na Figura 6.

Tabela 2. Características físico-químicas dos tensoativos utilizados para avaliar a solubilidade da molécula de NTZ.

Tensoativo	Tensoativos			
	F.M	M.M	HLB	CMC
SDS	$\text{NaC}_{12}\text{H}_{25}\text{SO}_4$	288.37	40	8,2 mmol/L
CPC	$\text{C}_{21}\text{H}_{38}\text{ClN}$	339.99		1,00 mmol/L
TWEEN 80	$\text{C}_{64}\text{H}_{124}\text{O}_{26}$	1310.00	15	0,011 mmol/L

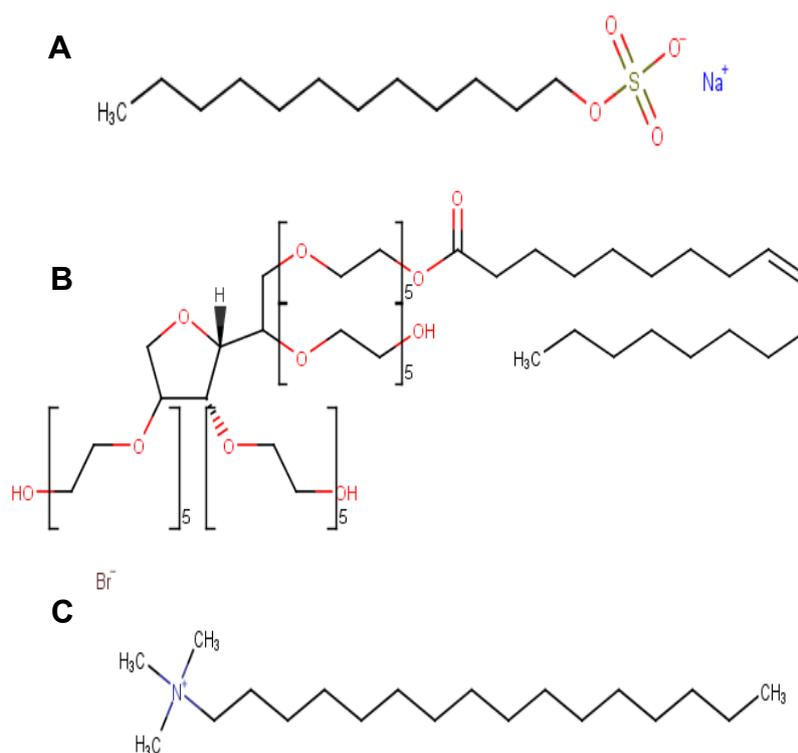


Figura 6. Estruturas químicas dos tensoativos utilizados para avaliar a solubilidade da molécula de NTZ, onde A) SDS; B) TWEEN 80; C) CPC.

Pode-se observar na figura 7 uma maior solubilidade quando se utiliza um tensoativo catiônico. Na concentração de 2% de CPC obteve-se uma concentração de saturação de 615,10 $\mu\text{g/mL}$ e na de 3% obteve-se 783, 28

$\mu\text{g/mL}$. Para ser definido qual seria melhor resultado com SDS, foi feita uma faixa de concentrações que variava entre 1 e 7%. Quando se comparou os resultados do CPC com os resultados do SDS, um tensoativo aniônico, observou-se que nas mesmas concentrações, 2 e 3%, obteve-se uma resposta bem inferior: 129,32 $\mu\text{g/mL}$ e 179,53 $\mu\text{g/mL}$ respectivamente. Mesmo na concentração de tensoativo mais alta, 7%, obteve-se uma concentração de 462,69 $\mu\text{g/mL}$. Com o Tween 80, um tensoativo neutro, foram testadas três concentrações, de 0,5%; 1,5% e 2,5%. Não se obteve uma resposta tão satisfatória pois com uma concentração de 2,5% o meio já ficava viscoso, o que dificultava o seu doseamento por CLAE posteriormente. Os resultados obtidos para 0,5; 1,5 e 2,5 % foram, respectivamente, 43,20 $\mu\text{g/mL}$, 71,86 $\mu\text{g/mL}$ e 92,84 $\mu\text{g/mL}$ (Figura 7).

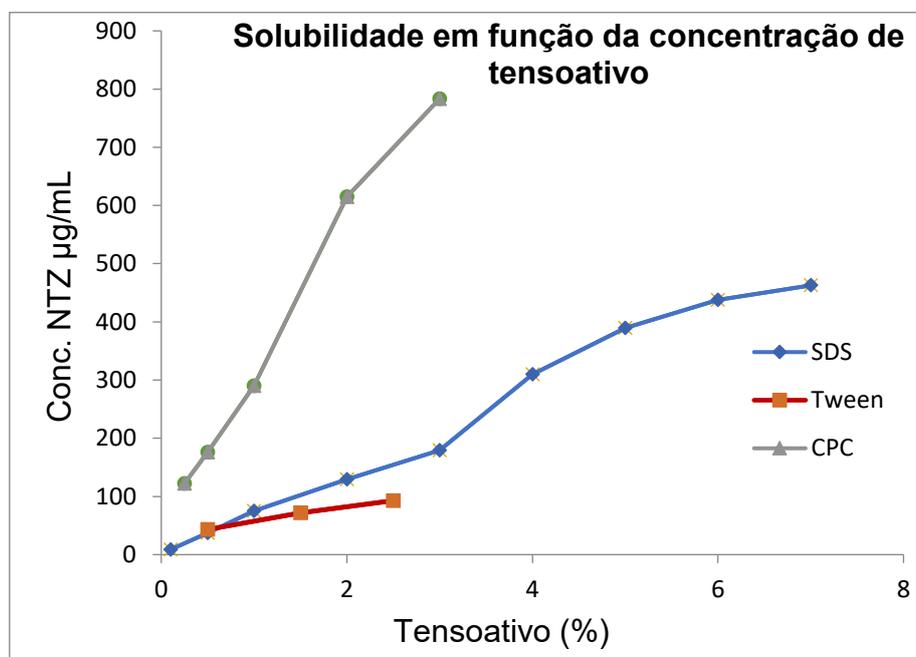


Figura 7. Concentração de NTZ solubilizada em função da porcentagem de tensoativo presente no meio.

A solubilidade também está representada, na figura 8, pela concentração molar dos tensoativos, onde é possível observar que quando calculada desta maneira, o Tween apresenta uma melhor solubilidade se comparado com o SDS (Figura 8).

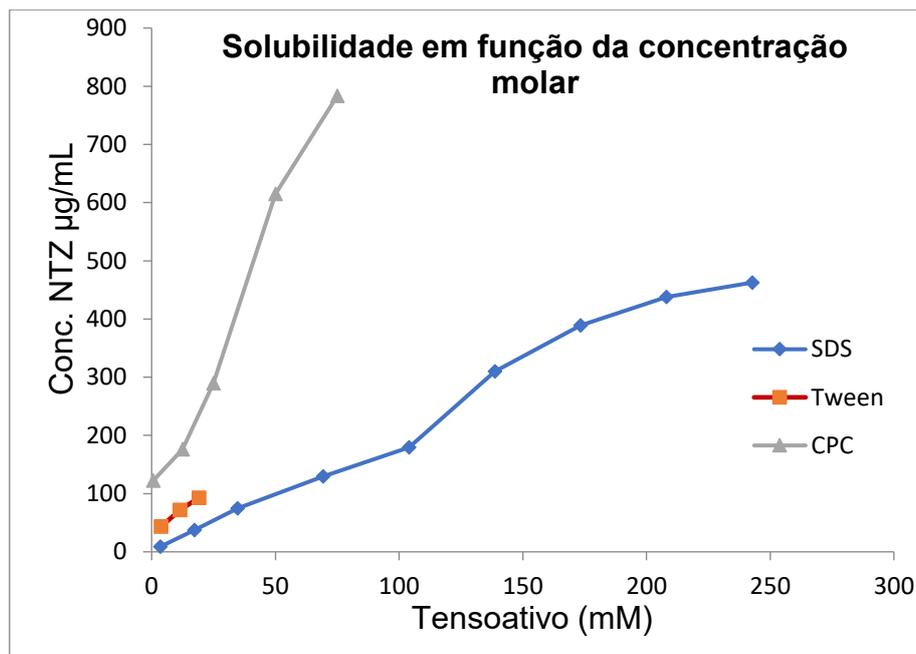


Figura 8. Concentração de NTZ solubilizada em função da concentração molar dos tensoativos presentes no meio.

4.3 Estabilidade

A NTZ tem conhecida instabilidade em meio alcalino, já relatada em literatura por Ali et al. (2011) e Malesuik et al. (2012). No trabalho de Ali et al. (2011), a molécula de nitazoxanida foi colocada em NaOH 0,1 M e temperatura ambiente, sofrendo desacetilação e formando seu principal produto de degradação, a tizoxanida. Essa amostra foi então colocada sob refluxo, também com NaOH 0,1 M por 30 minutos, formando dois novos produtos de degradação, ácido salicílico e aminonitrotiazol. O trabalho feito por Malesuik et al. (2012), aprofunda o estudo da estabilidade da NTZ, testando, além do meio alcalino, o meio ácido, a degradação térmica em estufa a 60 °C por cinco meses, além do estresse oxidativo por peróxido de hidrogênio e fotólise. As amostras foram analisadas em CLAE, UV e MS/MS, sendo possível observar uma acentuada instabilidade das amostras em meio alcalino e em peróxido de hidrogênio, e uma degradação menos acentuada em meio ácido. O produto de degradação alcalina foi o mesmo encontrado por Ali et al. (2011), a tizoxanida. Em outro trabalho, Malesuik et al. (2009), avaliou o efeito da radiação UVC sobre a estabilidade da NTZ. Foram observados os produtos de fotodegradação aminonitrotiazol e ácido salicílico além de nitrocompostos variados.

Nos estudos de solubilidade citados acima, a degradação do fármaco também foi observada, e isso motivou a realização de uma avaliação preliminar de estabilidade em condições de temperatura e pH comumente utilizados em ensaios de dissolução. Com isso foram feitos testes em tampão com pH 6,8 e 7,4, e também em HCl, representados na tabela abaixo (Tabela 3).

Tabela 3. Concentração residual de NTZ (%) em função do tempo, relacionando a sua estabilidade nos diferentes pHs testados.

Tempo	Estabilidade		
	TP pH 6,8	TP pH 7,4	HCl 0,1 M
	Conc. residual de NTZ (%)	Conc. residual de NTZ (%)	Conc. residual de NTZ (%)
0	100	100	100
30	98,21	96,72	102,15
60	93,45	93,50	101,58
90	89,86	90,16	100,95
120	87,43	86,76	101,77

Como pode ser observado na tabela acima (Tabela 3) os resultados oriundos de amostras de tampão pH 6,8 e 7,4 são muito próximos, e no tempo de 120 minutos é constatada uma degradação de aproximadamente 13% enquanto em meio ácido não houve degradação aparente. Nos valores de pH alcalinos houve a formação de um produto de degradação, nomeado de PD1, no tempo de 7,5 minutos, abaixo representado nos cromatogramas (Figura 9).

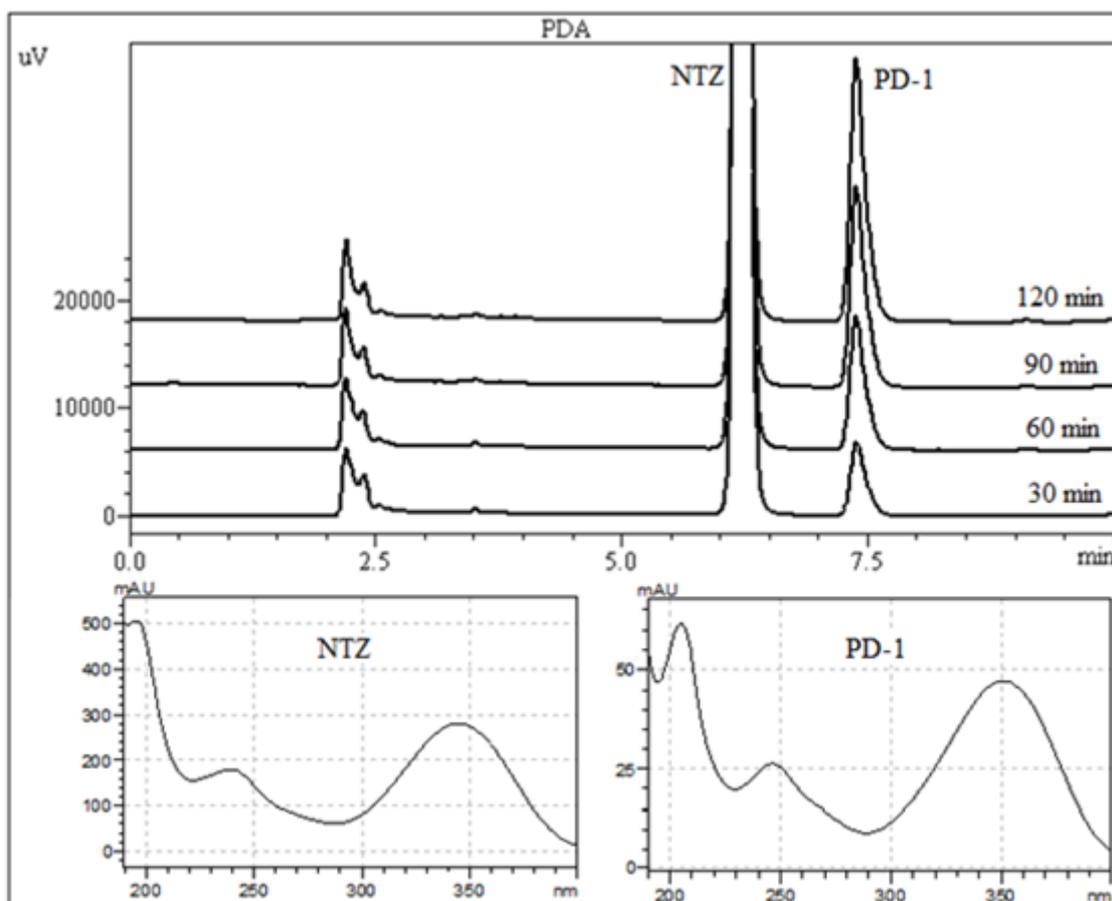


Figura 9. Cromatogramas referentes aos picos de NTZ e PD1 em diferentes tempos de coleta e espectros de absorção UV da molécula de NTZ e PD1.

Na figura 9 também estão representados os espectros de absorção UV referentes aos picos de NTZ e PD1. Observa-se uma similaridade dos espectros de absorbância. A concentração do produto de degradação foi calculada através da normalização das áreas. A concentração de PD1 e a soma das concentrações de NTZ e PD1 estão representadas na Tabela 4, na qual é descrito um aumento gradual da concentração de PD1, com a soma das concentrações de NTZ e PD1 mantendo-se em torno de 100%. Através de gráfico representativo dos resultados em condição de pH 7,4 (Figura 10), observa-se o decaimento da concentração de NTZ, o aumento da concentração de PD1 e a soma das concentrações de NTZ e PD1 que se mantém próxima a 100%.

Tabela 4. Aumento gradual da porcentagem residual do PD1 e soma das porcentagens residuais de NTZ e PD1, que se mantêm regulares, em relação ao tempo, ambos em tampão fosfato de sódio 25 mM e diferentes pHs.

Estabilidade NTZ e PD1 (%)				
	TP pH 6,8		TP pH 7,4	
Tempo	Conc. PD1	Conc. NTZ + PD1	Conc. PD1	Conc. NTZ + PD1
0		100		100
30	4,10	102,31	4,28	101,00
60	7,51	100,96	7,71	101,21
90	11,42	101,28	11,49	101,65
120	14,57	102,00	15,03	101,79

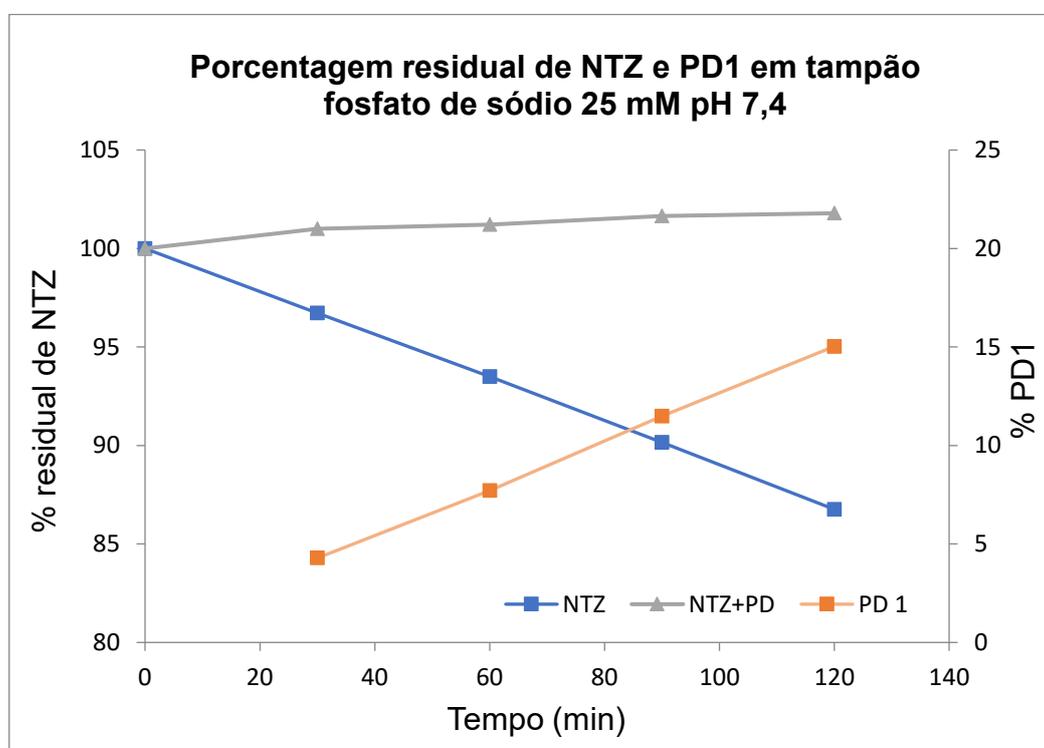


Figura 10. Aumento gradual da porcentagem residual do PD1, diminuição gradual da porcentagem residual de NTZ e soma das porcentagens residuais de NTZ e PD1, que se mantêm regulares, em relação ao tempo, ambos em tampão fosfato de sódio 25 mM e pH 7,4.

Para a identificação do produto de degradação PD1 foi utilizado espectrometria de massas, sendo identificado um único produto, majoritário, a tizoxanida, e que é o produto mais comum para este fármaco. O espectro de massas referente a análise da NTZ está representado na figura 11, o qual foi obtido com uma energia de colisão de 10 eV. Nele é possível observar um íon

$[M+H]^+$ de m/z 308 referente à molécula protonada NTZ e também os fragmentos de m/z 266, 163 e 121. A proposta de fragmentação da molécula está representada na figura 12.

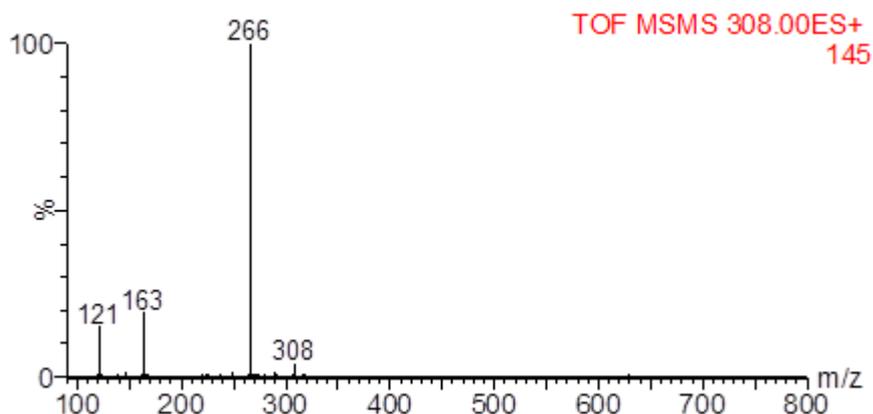


Figura 11. Espectro de massas da NTZ, obtida com energia de colisão de 10 eV.

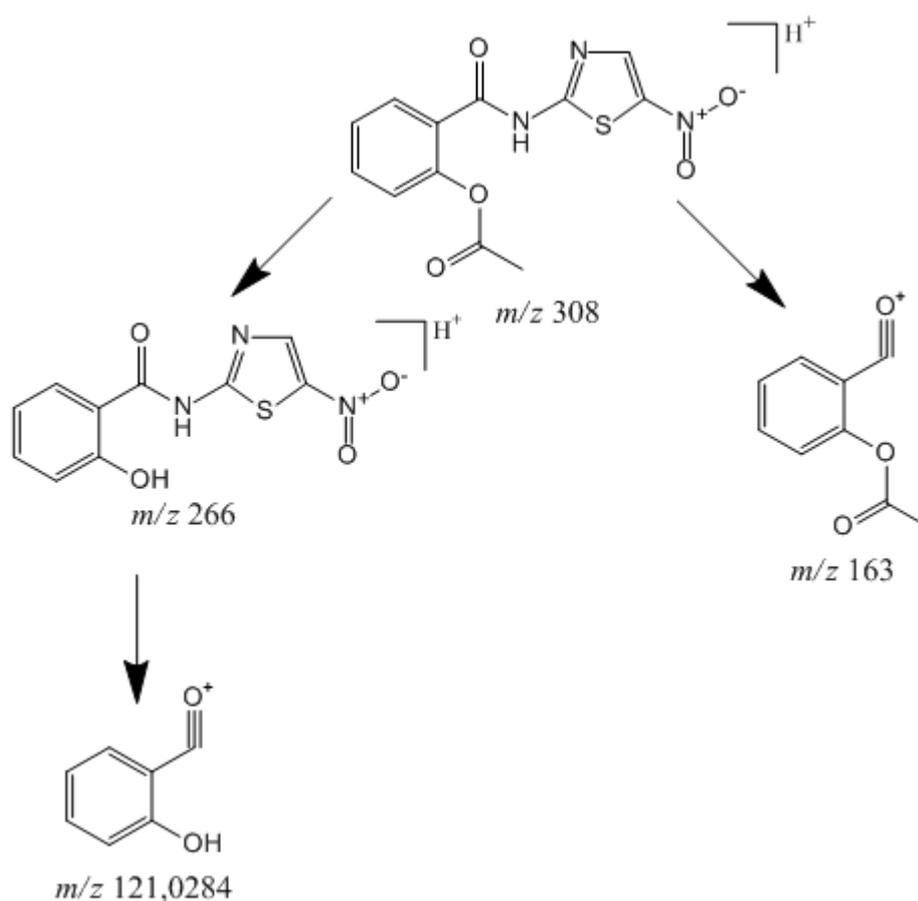


Figura 12. Fragmentação da molécula de NTZ, a partir dos sinais m/z obtidos através de espectrometria de massas.

O espectro de massas referente à TZX está representado na figura 13, o qual foi obtido com uma energia de colisão de 10 eV. Nele é possível observar um íon $[M+H]^+$ de m/z 266 referente à molécula de TZX e também o fragmento de m/z 121. A proposta de fragmentação da molécula está representada na figura 14.

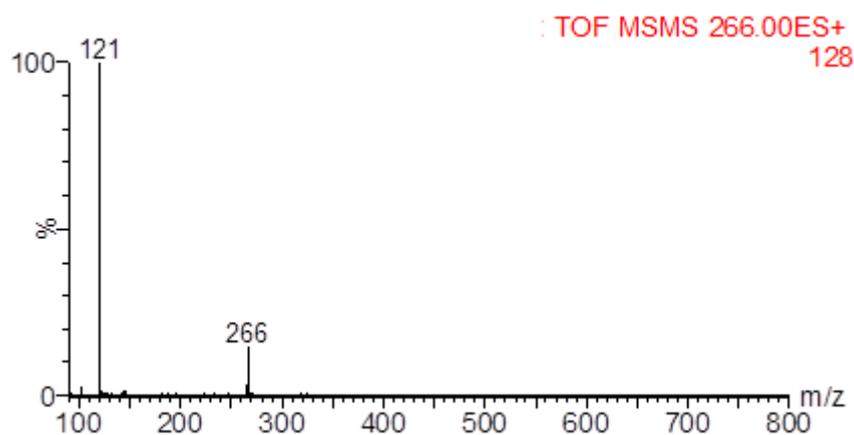


Figura 13. Espectro de massas da TZX, obtida com energia de colisão de 10 eV.

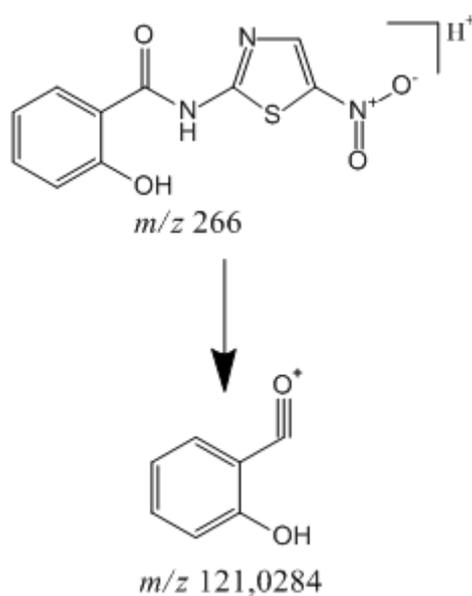


Figura 14. Fragmentação da molécula de TZX, a partir dos sinais m/z obtidos através de espectrometria de massas.

4.4 Estudo de dissolução

Inicialmente, foram avaliados os meios de dissolução propostos a partir dos ensaios de solubilidade e com isso definiu-se qual o mais adequado para seguir com o estudo de dissolução. Para todos os meios testados foram usadas as mesmas condições no equipamento, que eram: aparato 2 (pás) a 100 rpm, e temperatura do banho à 37 °C. Inicialmente o volume de coleta foi de 2 mL, mas após alguns testes foi modificado para 5 mL.

Para o meio da FB, as condições utilizadas foram as mesmas apresentadas na monografia: aparato 2 (pás) com velocidade de rotação de 100 rpm, temperatura do banho à 25 °C e volume de coleta de 5 mL.

O intuito da adição de tensoativos aos meios de dissolução foi aumentar a solubilidade do fármaco, visto que o mesmo tem baixa solubilidade.

Na dissolução também observou-se que há a formação da tizoxanida, principal produto de degradação da nitazoxanida, e por isso, assim como na estabilidade, os cálculos de porcentagem de massa dissolvida no meio foram calculados a partir da normalização dos picos (soma dos picos de NTZ e TZX), onde tem-se um decaimento gradual da área do pico de NTZ e um aumento gradual da área do pico de TZX.

4.4.1. Testes com SDS

Nos testes preliminares de dissolução com SDS foram avaliadas faixas de concentração de 4 a 7 %. Nestes testes, a suspensão solubilizou sem formação de aglomerados (Figura 15), provavelmente devido a não interação dos excipientes da suspensão com o meio. Porém, o problema se apresentou no momento das análises cromatográficas, pois o SDS nessas concentrações prejudicou a interação fármaco-coluna, com formação de picos irregulares (Figura 16).



Figura 15. Cuba com meio de dissolução com SDS 6% para ensaio de dissolução de NTZ em suspensão oral.

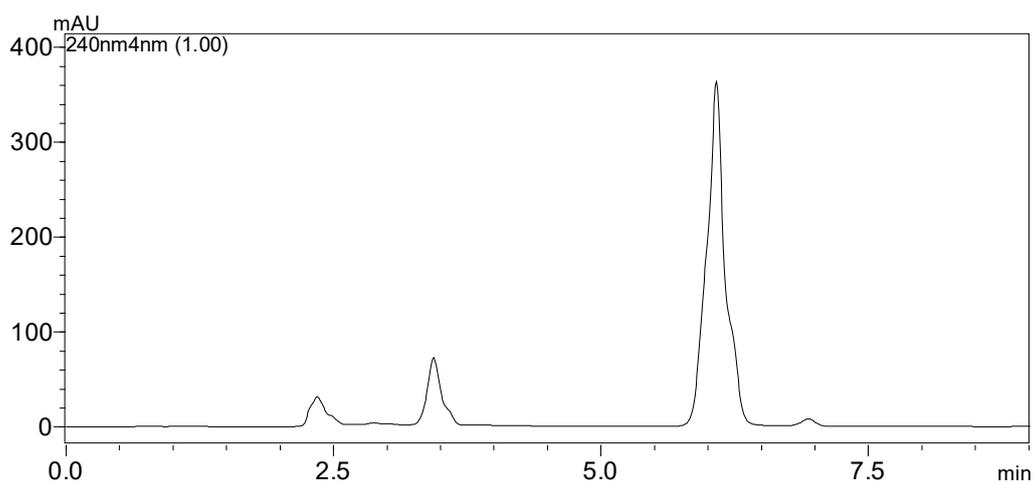


Figura 16. Cromatograma de suspensão oral de NTZ em meio de dissolução com SDS 6% para ensaio preliminar de dissolução.

4.4.2. Testes com cloreto de cetilpiridíneo

Foram testadas as concentrações de 2, 3 e 5% do tensoativo cloreto de cetilpiridíneo (CPC). A amostra de suspensão de NTZ, quando em contato com o meio de dissolução, se comporta de maneira semelhante à da suspensão quando entra em contato com ACN, como visto nos testes de doseamento, e forma um aglomerado que fica no fundo da cuba (Figura 17). Nas concentrações de 2 e 3% esse aglomerado não se desfaz, o que acaba prejudicando a liberação do fármaco no meio e por consequência, diminuindo a sua liberação a partir da

sua forma farmacêutica para realizar a análise de teor. Pode-se ver que o comportamento do fármaco na dissolução se mantém gradual (Figura 18), mas com a dificuldade de solubilizar devido ao aglomerado. A melhor porcentagem de massa dissolvida nestes meios de dissolução com CPC 2 e 3% foram, respectivamente, 30,64 e 51,96%.



Figura 17. Cuba com meio de dissolução com CPC 3% para ensaio de dissolução de NTZ em suspensão oral.

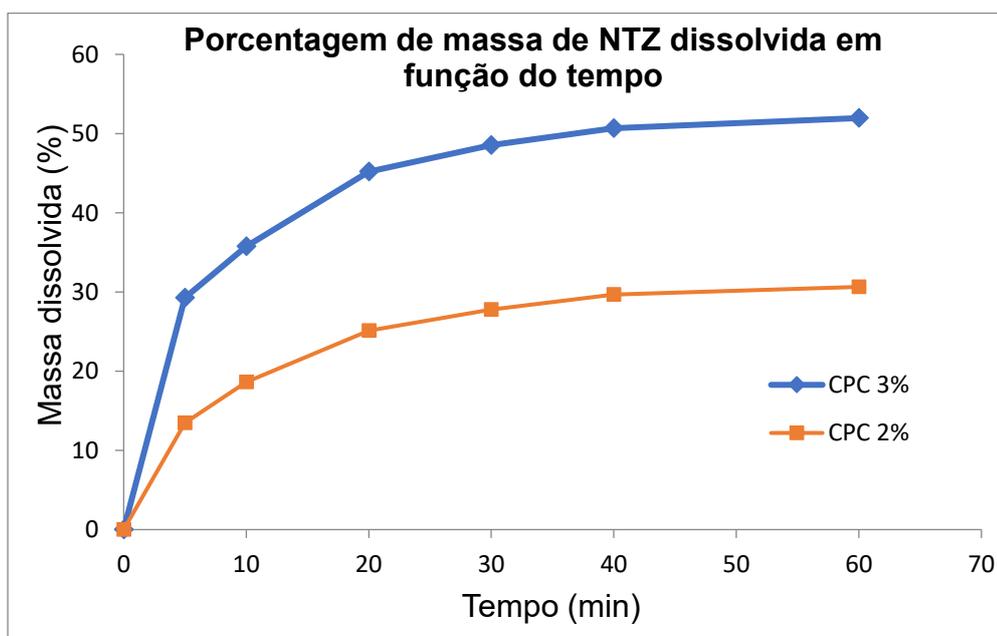


Figura 18. Curva representando porcentagem de massa de NTZ dissolvida em função do tempo nos meios de dissolução com CPC 2% e 3% para ensaio de dissolução de NTZ em suspensão oral.

Para tentar melhorar os resultados da dissolução foram feitas algumas alterações no meio, utilizando tampão fosfato 25 mM pH 7,4, e 3 e 5% de concentração do tensoativo CPC. Inicialmente não se percebe diferença pois a amostra, ao entrar em contato com o meio de dissolução, tanto com 3 e 5% de CPC, também forma os aglomerados que ficam no fundo da cuba, como pode ser visto na figura 19. Porém com o passar do tempo, em torno de 45 minutos, esse aglomerado começa a ficar mais leve no meio com 5% de CPC, e logo ele se desloca para a parte superior da cuba e se desfaz, o que indica uma liberação do conteúdo que estava retido nele, como podemos ver na figura 20.



Figura 19. Cuba com meio de dissolução com tensoativo CPC 5% e tampão fosfato 25 mM pH 7,4 para ensaio de dissolução de NTZ em suspensão oral em tempo zero.



Figura 20. Cuba com meio de dissolução com tensoativo CPC 5% e tampão fosfato 25 mM pH 7,4 para ensaio de dissolução de NTZ em suspensão oral no tempo de 45 minutos.

O uso do tampão fosfato ajudou na solubilização das amostras, aumentando as concentrações de massa dissolvidas nos meios 3% e 5% (Figura 21 e 22). Como podemos ver pelas curvas apresentadas, a amostra tem um comportamento gradual na solubilização no meio de dissolução.

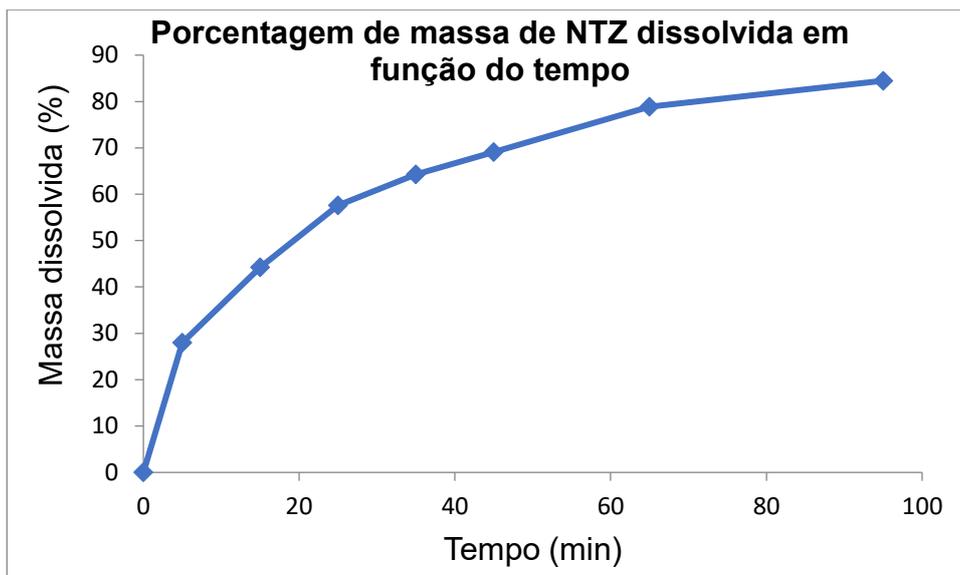


Figura 21. Curva representando a porcentagem de massa de NTZ dissolvida em função do tempo no meio de dissolução com CPC 3% e tampão fosfato 25 mM pH 7,4 para ensaio de dissolução de NTZ em suspensão oral, com doseamento por CLAE-DAD.

Quando analisamos os resultados do meio de dissolução com tampão fosfato pH 7,4 e concentração de CPC de 5% vemos que há uma melhora considerável na solubilização da amostra, e que o teor, em 45 minutos, já se encontra acima de 80%. Em 120 minutos temos um platô e mais de 90% do fármaco dissolvido no meio (Figura 22).

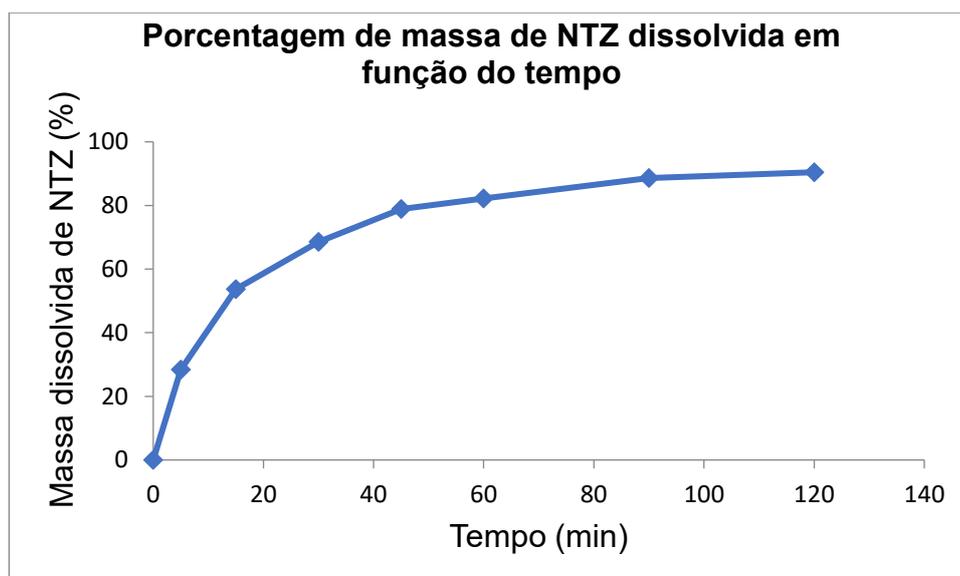


Figura 22. Curva representando a porcentagem de massa de NTZ dissolvida em função do tempo no meio de dissolução com CPC 5% e tampão fosfato 25 mM pH 7,4 para ensaio de dissolução de NTZ em suspensão oral, com doseamento por CLAE-DAD.

4.4.3. Método descrito na Farmacopeia Brasileira 6ª edição

O teste de dissolução da Farmacopeia Brasileira 6ª edição é um teste com um ponto único de amostragem, pelo qual em 45 minutos deve-se ter uma porcentagem de massa dissolvida igual ou superior a 80%. Como o propósito do trabalho é o desenvolvimento de um método de perfil de dissolução de suspensão de NTZ, os testes foram conduzidos com o meio da FB (tampão fosfato pH 7,5 contendo 6% de brometo de cetiltrimetilamônio) da mesma maneira que os outros testes, mas seguindo as condições preconizadas na monografia. Como nos métodos testados anteriormente para desenvolver o perfil de dissolução, este também apresentou a formação do aglomerado quando a amostra entra em contato com o meio. Além disso, ocorreu a saturação dos filtros do dissolutor, o que dificultou a coleta das amostras e também a uniformidade das mesmas, pois algumas foram coletadas por seringa, manualmente. Por conta disso, mesmo que o perfil de dissolução tenha sido gradual, os teores de massa dissolvida ficaram baixos, como podemos observar na figura abaixo (Figura 23), onde tem-se, em 60 minutos, menos de 80% do fármaco dissolvido.

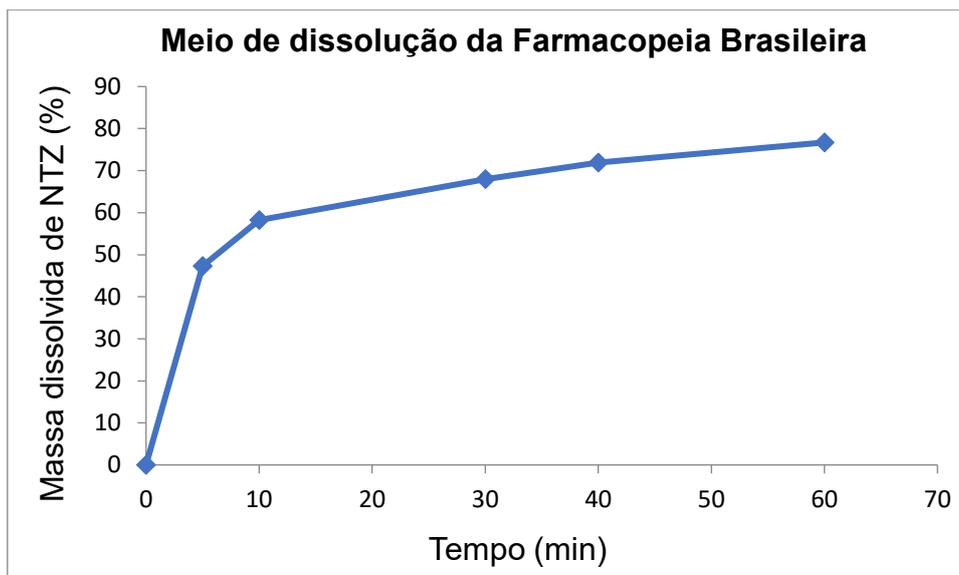


Figura 23. Curva representando a porcentagem de massa de NTZ dissolvida em função do tempo no meio de dissolução com BCP 6% e tampão fosfato 25 mM pH 7,5 para ensaio de dissolução de NTZ em suspensão oral, com doseamento por CLAE-DAD.

5. CONCLUSÕES

O presente trabalho teve como objetivo o desenvolvimento de um método de perfil de dissolução de Nitazoxanida suspensão oral. No decorrer do trabalho foram testadas, comparadas e avaliadas algumas condições até definir uma que melhor se encaixasse na finalidade almejada.

Visto que é um ensaio preliminar, ainda existem ajustes a serem feitos, mas já se tem uma noção de qual o melhor método para validar como perfil de dissolução da NTZ suspensão. O método com melhores resultados foi em meio tampão fosfato pH 7,4 e 5% de CPC, com agitação de 100 rpm, temperatura de banho à 37 °C, filtros com porosidade de 35 µm, tempo total de dissolução de 120 minutos e quantificação por CLAE através de um método previamente desenvolvido e validado por Malesuik et al. (2010).

Com isso definido, o próximo passo a ser dado é a validação deste método quantitativo por CLAE para aplicação ao doseamento de amostras oriundas do ensaio de dissolução, testando os parâmetros de especificidade, linearidade, precisão, exatidão e robustez, de acordo com as guias oficiais.

Pode-se concluir que os objetivos apresentados foram alcançados parcialmente pois o método proposto ainda deve ser aplicado às amostras comerciais do medicamento referência e genérico, num ensaio definitivo (6 cubas para cada amostra). Porém ele se mostrou, dentro dos parâmetros analisados, ser adequado, apresentando um perfil de dissolução gradual do fármaco, alcançando uma porcentagem de massa dissolvida superior a 90%.

6. REFERENCIAS

AC WHITE JR. Nitazoxanide: an important advance in anti-parasitic therapy. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, v. 68 n. 4 p. 382-383. 2003.

BICART-SÉE, ALAIN et al. Successful treatment with nitazoxanide of Enterocytozoon bienewisi microsporidiosis in a patient with AIDS. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 44, n. 1, p. 167–168, 2000.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Guia de dissolução aplicável a medicamentos genéricos, novos e similares (2018). Disponível em: <<http://portal.anvisa.gov.br/documents/10181/3364628/Proposta+de+Guia+de+Dissolu%C3%A7%C3%A3o+-+06.04.2018.pdf/c15476e5-82aa-402f-aa95-24bf246dccc0?version=1.0>>. Acessado em: 25 de nov. de 2019.

BRASIL. FARMACOPEIA BRASILEIRA, parte 1, 6° ed, São Paulo, **Atheneu**, 2019, p. 1170-1172.

DANIEL M. MUSER, NANCY LOGAN, RICHARD J. HAMILL, HERBERT L. DUPONT, ARNOLD LENTNEK, ARVIND GUPTA, JEAN-FRANCOIS ROSSIGNOL, Nitazoxanide for the Treatment of *Clostridium difficile* Colitis, **Clinical Infectious Diseases**, v. 43, i. 4, p. 421–427, 2006.

DRESSMAN, J.; KRÄMER, J. Pharmaceutical Dissolution Testing. New York: **Taylor & Francis Group**, chapter 11, p. 315-347, 2005.

FAN, LEI et al. Nitazoxanide, an anti-parasitic drug, efficiently ameliorates learning and memory impairments in AD model mice. **Acta Pharmacologica Sinica**, v. 40, n. 10, p. 1279–1291, 2019.

FAVENNEC, L. et al. Double-blind, randomized, placebo-controlled study of nitazoxanide in the treatment of fascioliasis in adults and children from northern Peru. **Alimentary Pharmacology and Therapeutics**, v. 17, n. 2, p. 265–270, 2003.

FOX, LEANNE M.; SARAVOLATZ, LOUIS D. Nitazoxanide: A New Thiazolide Antiparasitic Agent. **Clinical Infectious Diseases**, [s. l.], v. 40, n. 8, p. 1173–1180, 2005.

GARGALA, G. Efficacy of nitazoxanide, tizoxanide and tizoxanide glucuronide against *Cryptosporidium parvum* development in sporozoite-infected HCT-8 enterocytic cells. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 46, n. 1, p. 57–60, 2000.

GIACOMETTI, ANDREA et al. Activity of nitazoxanide alone and in combination with azithromycin and rifabutin against *Cryptosporidium parvum* in cell culture. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 45, n. 4, p. 453–456, 2000.

HAFFIZULLA, JASON et al. Effect of nitazoxanide in adults and adolescents with acute uncomplicated influenza: A double-blind, randomised, placebo-controlled, phase 2b/3 trial. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 14, n. 7, p. 609–618, 2014.

HICKSON, SARAH E. et al. Inhibition of vaccinia virus replication by nitazoxanide. **Virology**, v. 518, p. 398–405, 2018.

HOFFMAN, PAUL S. et al. Antiparasitic drug nitazoxanide inhibits the pyruvate oxidoreductases of *Helicobacter pylori*, selected anaerobic bacteria and parasites, and *Campylobacter jejuni*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 51, n. 3, p. 868–876, 2007.

HOFFMAN, PAUL S.; GILLES, H, M. Treatment of intestinal parasitic infections: a review of nitazoxanide. **Trends in Parasitology**. v. 18, n. 3, p 95-97, 2002.

HUANG, XIANHUI et al. Metabolism of nitazoxanide in rats, pigs, and chickens: Application of liquid chromatography coupled to hybrid linear ion trap/Orbitrap mass spectrometer. **Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences**, v. 1000, p. 147–154, 2015.

JADHAV, VIJAY Y. et al. RP-HPLC Determination of Nitazoxanide in Bulk and Different Tablet Formulations. **Eurasian Journal of Analytical Chemistry**, v. 3, n. 3, 2008.

JOHNSON, S.; SANCHEZ, J. L.; GERDING, D. N. Metronidazole Resistance in *Clostridium difficile*. **Clinical Infectious Diseases**, v. 31, n. 2, p. 625–626, 2000.
KABIL, SAMIR M.; ASHRY, ESMAT EL; ASHRAF, NASSAR K. An open-label clinical study of nitazoxanide in the treatment of human fascioliasis. **Current Therapeutic Research - Clinical and Experimental**, v. 61, n. 6, p. 339–345, 2000.

KORBA, BRENT E. et al. Nitazoxanide, tizoxanide and other thiazolides are potent inhibitors of hepatitis B virus and hepatitis C virus replication. **Antiviral Research**, v. 77, n. 1, p. 56–63, 2008.

LAM, KAREN K. Y. et al. Nitazoxanide stimulates autophagy and inhibits mTORC1 signaling and intracellular proliferation of *Mycobacterium tuberculosis*. **PLoS Pathogens**, v. 8, n. 5, 2012.

LENGRUBER, R. S.; VOLPATO, N. M. Meios para dissolução de comprimidos de nimesulida: ação dos tensoativos. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**. vol.38, n.2, p.163-172, 2002.

LI, XIAOKANG et al. Discovery of nitazoxanide-based derivatives as autophagy activators for the treatment of Alzheimer's disease. **Acta Pharmaceutica Sinica B**, 2019.

MALESUIK, M. D. et al. Development of a simple, rapid and validated spectrophotometric method for nitazoxanide in pharmaceutical formulations and comparison with hplc. **Quim. Nova**. v. 33, n. 3, p. 739-742, 2010.

MALESUIK, M. D. Nitazoxanida: desenvolvimento e validação de métodos analíticos e estudo da estabilidade. 2010.

MALESUIK, M. D., GONÇALVES, H. M. L., GARCIA, C. V., TREIN, M.R, NARDI, N. B., SCHAPOVAL, E.E.S, STEPPE, M. Identification, characterization and cytotoxicity in vitro assay of nitazoxanide major degradation product, **Talanta**, v. 93, p. 206-211, 2012.

Ministério da Saúde. 2012. Nota técnica N° 167/2012 – Nitazoxanida. Disponível em

<<http://portalarquivos2.saude.gov.br/images/pdf/2014/setembro/11/Nitazoxanida---atualizada-em-29-10-2013-.pdf>> Acesso em 14 de nov. 2019.

MUSHER, D. M. et al. Nitazoxanide for the Treatment of Clostridium difficile Colitis. **Clinical Infectious Diseases**, v. 43, n. 4, p. 421–427, 2006.

Nitazoxanide. Disponível em < <http://www.hmdb.ca/metabolites/HMDB0014649> > e < <https://www.drugbank.ca/drugs/DB00507> >. Acesso em 05 nov. 2019.

NOURUDDIN W. ALI, SAMAH SAYED ABBAS, HALA EL-SAYED ZAAZAA, MAHA MOHAMED ABDELRAHMAN, MOHAMED ABDELKAWY. Validated stability indicating methods for determination of nitazoxanide in presence of its degradation products, **Journal of Pharmaceutical Analysis**, v. 2, i. 2, p.105-116, 2012.

ORTIZ, J. J. et al. Randomized clinical study of nitazoxanide compared to metronidazole in the treatment of symptomatic giardiasis in children from Northern Peru. **Alimentary Pharmacology and Therapeutics**, v. 15, n. 9, p. 1409–1415, 2001.

RAHIGUDE, ANAND; VANSHIV, SWAPNILA. Mixed Hydrotrophy in Spectrophotometric analysis of Nitazoxanide. **International Journal of ChemTech Research**. v. 2, n. 4, p. 1966–1989, 2010.

RDC 31, 11 de ago. 2010, disponível em < http://portal.anvisa.gov.br/documents/33880/2568070/res0031_11_08_2010.pdf/5e157d15-d3d5-4bb9-98db-5667e4d9e0c8 > Acesso em 03 dez. 2019.

ROSSIGNOL, J. F.; EL-GOHARY, Y. M. Nitazoxanide in the treatment of viral gastroenteritis: A randomized double-blind placebo-controlled clinical trial. **Alimentary Pharmacology and Therapeutics**, v. 24, n. 10, p. 1423–1430, 2006.

ROSSIGNOL, J. F.; KEEFFE, EMMET B. Thiazolides: A new class of drugs for the treatment of chronic hepatitis B and C. **Future Microbiology**, 2008.

ROSSIGNOL, JEAN FRANÇOIS AND LA FRAZIA, SIMONE AND CHIAPPA, LUCIA AND CIUCCI, ALESSANDRA AND SANTORO, M. GABRIELLA. Thiazolides, a new class of anti-influenza molecules targeting viral hemagglutinin at the post-translational level. **Journal of Biological Chemistry**, v. 284, n. 43, p. 29798–29808, 2009.

ROSSIGNOL, JEAN FRANÇOIS. Nitazoxanide: A first-in-class broad-spectrum antiviral agente. **Antiviral Research**. Elsevier, 2014.

ROSSIGNOL, JEAN FRANÇOIS; ABAZA, HIMLY; FRIEDMAN, HERMAN. Successful treatment of human fascioliasis with nitazoxanide. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 92, n. 1, p. 103–104, 1998.

ROSSIGNOL, JEAN FRANÇOIS; BRÉCHOT, CHRISTIAN. A Pilot Clinical Trial of Nitazoxanide in the Treatment of Chronic Hepatitis B. **Hepatology Communications**, v. 3, n. 6, p. 744–747, 2019.

SANTOS DA SILVA, ALINE. Desenvolvimento e validação de método de dissolução de suspensões de benzoilmetronidazol e perfil de dissolução. 2014.
SHOHIN, I.E.; GREBENKIN, D.; MALASHENKO, E, A.; STANISHEVSKII, Y, A.; RAMENSKAYA, G, V. A Brief Review of the FDA Dissolution Methods Database. **Dissolution Technologies**. v. 23, p. 6-10, 2016.

SULTANA S, AHAMMAD T, ISLAM, M, A; ROUF, A, S, S. RP-HPLC Method Development and Validation for Nitazoxanide in Powder for Suspension Dosage Form. **Int J Pharm Sci Res.**; v. 4, n. 1, p. 301-305, 2013.

TERAN, CARLOS G.; TERAN-ESCALERA, CARLOS N.; VILLARROEL, PATRICIA. Nitazoxanide vs. probiotics for the treatment of acute rotavirus diarrhea in children: a randomized, single-blind, controlled trial in Bolivian children. **International Journal of Infectious Diseases**, v. 13, n. 4, p. 518–523, 2009.

YAMAMOTO Y, HAKKI A, FRIEDMAN H, OKUBO S, SHIMAMURA T, HOFFMAN P, S, ROSSIGNOL J, F. Nitazoxanide, a Nitrothiazolide Antiparasitic Drug, Is an Anti-Helicobacter pylori Agent with Anti-Vacuolating Toxin Activity. **Chemotherapy**. v. 45, n. 4, p. 303-312, 1999.

ZHONGHUA LI, LINA DING, ZHONGRUI LI, ZHIZHENG WANG, FENGZHI SU O, DANDAN SHEN, TAOQIAN ZHAO, XUDONG SUN, JUNWEI WANG, YING LIU, LIYING MA, BING ZHAO, PENGFEI GENG, BIN YU, YICHAO ZHENG, HONGMIN LIU. Development of the triazole-fused pyrimidine derivatives as highly potent and reversible inhibitors of histone lysine specific demethylase 1 (LSD1/KDM1A). **Acta Pharmaceutica Sinica B**, v. 9, i. 4, p. 794-808, 2019.