



**“Estudio de estabilidad de Nitazoxanida
en condiciones experimentales de
análisis químico-farmacéutico”**

T E S I S

Que para obtener el título de:

LICENCIADA EN FARMACIA

Presenta:

ROSAURA JIMENEZ VASQUEZ

Director de tesis:

Dr. JULIO CÉSAR RIVERA LEYVA

Cuernavaca, Morelos

2023

DEDICATORIA Y AGRADECIMIENTOS

Dedicatoria: Con dedicatoria a mis padres Isauro e Hilaria, por todo el esfuerzo, amor, valores y confianza que me han brindado. Por el arduo trabajo que se han tomado al guiarme por el camino correcto e impulsarme a cumplir cada una de las metas que me eh propuesto.

Agradecimientos:

Principalmente a Dios me ha permitido llegar a esta parte importante de mi formación profesional.

A mis padres por siempre confiar en todos mis proyectos, por nunca dejarme sola y tomar siempre mi mano para lograr este sueño tan importante.

A mis hermanos Yaneth, Laura, Viridiana y David por apoyarme en todos los aspectos, por darme la confianza de seguir adelante y hacerme creer que todo es posible.

A mi familia en general, cuñados y sobrinos por que sin duda nada de esto hubiera sido posible sin su apoyo.

A mis amigas Olinka, Yoselin, Ximena y Vanessa por todos los conocimientos compartidos, las aventuras vividas y por siempre apoyarnos en todo durante la carrera.

Así mismo, quiero expresar mi reconocimiento y gratitud al “Laboratorio 4 de Tecnología Farmacéutica”, de la Facultad de Farmacia y al Dr. Julio Cesar Rivera por todas las atenciones recibidas e información brindada a lo largo de esta investigación.

A mis compañeros del laboratorio 4, Samaria, Erick y Luna por todo el apoyo brindado durante el desarrollo de este proyecto.

Al Dr. Jesús Rivera Islas y la Dra. Adriana Valladares por el apoyo y conocimientos brindado durante la investigación realizada, a los profesores que forman parte de mi jurado, por darse el tiempo necesario de revisar y retroalimentar el trabajo de investigación.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por el apoyo económico brindado con la beca proyecto Fronteras de la Ciencia 2019 No. 1046617

A la Universidad Autónoma del Estado de Morelos por la sede de todo el conocimiento adquirido y por todas las buenas vivencias en estos años.

ÍNDICE GENERAL

1.0.	RESUMEN.....	9
2.0.	INTRODUCCIÓN.....	11
3.0.	ANTECEDENTES	12
3.1.	GENERALIDADES DE NITAZOXANIDA.	12
3.2.	FARMACOCINÉTICA DE NTZ	13
3.3.	MECANISMOS DE DEGRADACIÓN	14
3.4.	CINÉTICA QUÍMICA.....	17
3.5.	ESTUDIOS DE ESTABILIDAD DE NTZ.....	18
3.6.	IMPORTANCIA DEL ANÁLISIS DE NITAZOXANIDA EN LOS ESTUDIOS DE CALIDAD	18
3.7.	CROMATOGRAFÍA	20
3.7.1.	CROMATOGRAFÍA LIQUIDA DE ALTA RESOLUCIÓN	20
3.8.	MÉTODOS DE CUANTIFICACIÓN DE NITAZOXANIDA	21
4.0.	JUSTIFICACIÓN	23
5.0.	HIPÓTESIS	23
6.0.	OBJETIVOS	24
6.1.	OBJETIVO GENERAL.....	24
6.2.	OBJETIVOS ESPECIFICOS.....	24
7.0.	METODOLOGÍA.....	24
7.1.	Instrumentación y condiciones cromatográficas	24
7.2.	Preparación de solución STOCK.	25
7.3.	Preparación de las soluciones de trabajo.	25
7.4.	Preparación de soluciones	26
7.5.	Estudio de estabilidad de NTZ.....	26
7.6.	Estudio de estabilidad de NTZ a 37 °C.....	27
7.7.	Estudio de estabilidad de NTZ a temperatura ambiente	27

7.8.	Estudio de estabilidad de NTZ a temperatura de refrigeración.....	27
7.9.	Estudio de estabilidad de NTZ a temperatura de congelación	28
7.0.	ANEXOS.....	45

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Estructura molecular de NTZ.....	12
Figura 2. Hidrólisis ácida de NTZ	14
Figura 3. Mecanismo de reacción de hidrólisis ácida.....	15
Figura 4. Mecanismo de reacción de hidrólisis básica.	16
Figura 5. Estructura de columna C 18	21
Figura 6. Cromatograma de NTZ	29
Figura 7. Perfil de degradación de NTZ en agua.....	30
Figura 8. Perfil de degradación de NTZ en buffer de fosfatos 0.05 M pH 6.8.....	31
Figura 9. Perfil de degradación de NTZ en MetOH:Agua 1:1.	32
Figura 10. Perfil de degradación de NTZ en EtOH:Agua 1:1.....	33
Figura 11. Perfil de degradación de NTZ en Metanol.....	34
Figura 12. Perfil de degradación de NTZ en Etanol.	35
Figura 13. Perfil de NTZ en Acetonitrilo.	36
Figura 14. Perfil de degradación de NTZ en Acetato de etilo.....	37

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Propiedades Fisicoquímicas de NTZ.	12
Tabla 2. Condiciones de almacenamiento para estabilidad. (NOM-073-SSA1-2015).....	19
Tabla 3. Preparación de soluciones de trabajo	25
Tabla 4. Preparación de muestras de NTZ.	25
Tabla 5. Condiciones Experimentales.....	26
Tabla 6. Constantes de degradación de NTZ a temperatura ambiente.....	38
Tabla 8. Constantes de degradación de NTZ a temperatura de congelación.	39
Tabla 9. Constantes de degradación de NTZ a 37 °C	40
Tabla 10. Clasificación de los disolventes en ácido o base	41

Abreviatura	Significado
NTZ	Nitazoxanida
TZX	Tizoxanida
°C	Grados centígrados
mL	Mililitros
min	Minutos
µL	Microlitros
%	Por ciento
h	Horas
ICH	International Conference on Harmonisation
UV	Ultravioleta
HPLC	Cromatografía de líquidos de alta resolución
FEUM	Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos
nm	Nanómetros
mm	Milímetros
µg	Microgramos
ACN	Acetonitrilo
MetOH	Metanol
EtOH	Etanol

1.0. RESUMEN

Introducción: La nitazoxanida (NTZ) es un fármaco utilizado como antiparasitario, antiviral y antimicrobiano de amplio espectro, pertenece a la clase de las tiazolidas y es un derivado de nitrotiazolil-salicilamida. La degradación en fármacos y medicamentos se da por condiciones químicas, físicas y biológicas. Las reacciones químicas pueden ser la causa de una inestabilidad y son provocadas por hidrólisis, oxidación-reducción, esterificación, polimerización etc., como consecuencia se puede tener problemas de degradación del principio activo y generar productos tóxicos, lo que provocaría una pérdida de la eficacia. (Lozano C., Córdoba D., & Córdoba M., 2012). La hidrólisis es una de las causas más comunes en las descomposiciones de fármacos; esta reacción da entre el fármaco y el agua. La NTZ presenta una degradación en condiciones alcalinas y ácidas dando lugar a dos productos de degradación siendo el principal la Tizoxanida (TZX), metabolito activo que tiene actividad farmacológica. Esta reacción se da por una desacetilación en donde se pierde un grupo acetilo. (Malesuik et al., 2012). Objetivo: Evaluar la degradación de NTZ en diferentes disolventes y a distintas temperaturas para desarrollar mejores condiciones de trabajo durante el análisis químico farmacéutico de muestras. Materiales y Métodos: El estudio de estabilidad de NTZ se llevó a cabo en diferentes condiciones de disolventes (agua,buffer de fosfatos, metanol:agua 1:1, etanol:agua 1:1, metanol, etanol, acetonitrilo, acetato de etilo) y temperaturas (refrigeración a 3 °C, congelación a -18 °C, temperatura ambiente, y 37 °C), durante 56 horas, analizando las muestras a las 8, 24, 32, 48 y 56 h. después de su preparación y para la cuantificación se utilizó un equipo de cromatografía de líquidos de alta resolución HITACHI modelo L-7000 con detector UV con las siguientes condiciones: longitud de onda de 347 nm, volumen de inyección de 25 µL, un flujo de 0.8 mL/min y con un tiempo de corrida de 5 minutos. Se utilizó una columna Waters Xbridge C18 con dimensiones de 4.6 x 75 mm con un tamaño de partícula de 2.5 µm. Resultados: Durante el estudio de estabilidad se lograron obtener los perfiles de degradación de NTZ durante 56 h. en las diferentes condiciones de análisis; generalmente se observa una mayor degradación de NTZ en disolventes como agua (60-80 %), metanol:agua (95 % a temperatura ambiente), etanol:agua (78-98 % en temperatura ambiente), en metanol (50 %) y en etanol (100 % temperatura ambiente), los disolventes en donde NTZ presenta mayor estabilidad son en acetonitrilo (2-7 % de degradación) y acetato de etilo (3-20 % de degradación). A partir de esto se realizaron los cálculos correspondientes para obtener el orden de reacción, se puede observar que, en la mayoría de los ajustes, se encuentra que las reacciones son de primer

orden, lo que indica que la velocidad de degradación en general puede depender de la concentración del analito NTZ, aunque también puede depender del tipo de disolvente, ya que se observa de forma común que los disolventes polares con carácter ácido promueven la degradación. Conclusión: NTZ presenta una inestabilidad en disolventes que son ácidos ya que se presenta una degradación mayor al 50 % del producto inicial.

2.0. INTRODUCCIÓN

El estudio de estabilidad proporciona evidencia de la calidad de una sustancia o producto y su variación con el tiempo tomando en cuenta la influencia de cambios de temperatura, pH, humedad relativa y luz. La International Conference on Harmonisation (ICH) establece ciertas pruebas de estabilidad a las que deben ser sometidos los medicamentos, dichas pruebas deben ser realizadas bajo condiciones que permitan proporcionar información sobre la estabilidad del fármaco en el menor tiempo posible de almacenamiento con la finalidad de identificar los posibles productos de degradación.

La nitazoxanida es un fármaco utilizado para el tratamiento de enfermedades causadas por protozoarios, bacterias y algunos virus, el mecanismo de acción más conocido es la inhibición de la enzima ferredoxina oxidorreductasa. Después de la administración oral, el fármaco es absorbido en el tracto gastrointestinal el cual es hidrolizado a tizoxanida (TZX) por las esterases y se conjuga por glucuronidación a glucurónido de TZX.

Los fármacos pueden presentar degradación por la exposición de cambios físicos, químicos y biológicos, a través de reacciones por hidrólisis, oxidación-reducción, esterificación, polimerización etc., estudios han demostrado que NTZ puede presentar degradación por exposición a luz UV, cambios de temperatura y pH, dando lugar a dos productos de degradación siendo el principal TZX, por lo tanto en este trabajo se evaluará la degradación de NTZ en diferentes disolventes y a distintas temperaturas para desarrollar mejores condiciones de trabajo durante el análisis químico farmacéutico de muestras y de esta manera poder determinar la cinética de degradación con el fin de analizar la velocidad de reacción, pero al mismo tiempo factores físicos y químicos de los que depende.

3.0. ANTECEDENTES

3.1. GENERALIDADES DE NITAZOXANIDA.

La nitazoxanida es un fármaco utilizado como antiparasitario, antiviral y antimicrobiano de amplio espectro, pertenece a la clase de las tiazolidas y es un derivado de nitrotiazolil-salicilamida. Su estructura molecular se muestra en la figura 1 y en la tabla 1 se describen algunas de sus propiedades fisicoquímicas.

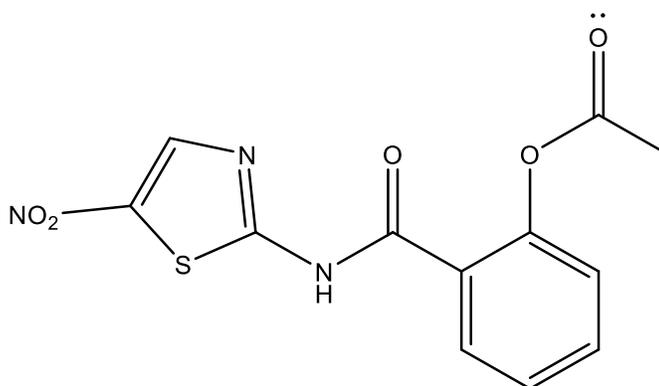


Figura 1. Estructura molecular de NTZ.

Tabla 1. Propiedades Fisicoquímicas de NTZ.

Formula condensada	C ₁₂ H ₉ N ₃ O ₅ S
Peso molecular	307,28 g / mol.
pKa	8.3
Log P	1.63
Solubilidad	Acuosa= 7.55 × 10 ⁻³ mg/mL Otros Disolventes: Acetonitrilo, Metanol, Etanol, Butanol, N,N-Dimetilformamida.
Apariencia	Polvo amarillo

La NTZ fue desarrollada y comercializada como fármaco antiprotozoario, y ha sido estudiada como antiparasitario de amplio espectro ya que junto con su metabolito tizoxanida (TZX) han demostrado tener mayor actividad farmacológica que el albendazol y/o metronidazol por lo que es útil en el tratamiento de infecciones causadas por protozoarios y helmintos y se prescribe para el tratamiento de enfermedades causadas por *Giardia intestinalis* y *Cryptosporidium*. (Liu et al., 2016; Romero et al, 2017).

Además, en otros estudios se ha demostrado tener actividad antibacteriana en anaerobios facultativos Gram negativos y Gram positivos, así como en cepas replicantes y no replicantes de *Mycobacterium tuberculosis* y es útil para el tratamiento contra *Clostridioides difficile*. (Rossignol, 2014)

NTZ se empezó a utilizar como fármaco antiviral en enfermedades causadas por el virus de la influenza. Recientemente se han hecho estudios para el posible tratamiento contra el coronavirus.

La NTZ es un fármaco potencialmente inhibidor de la replicación del Virus de la Hepatitis C y B (que en combinación con otros fármacos de primera elección interferón alfa-2A) potencian el tratamiento y existe una mayor respuesta de este. (Rossignol & Keeffe, 2008).

3.2. FARMACOCINÉTICA DE NTZ

Este fármaco tiene un amplio mecanismo de acción debido a que en microbios anaerobios actúa interrumpiendo el metabolismo energético por la inhibición de la enzima piruvato ferridoxina oxidorreductasa (PFOR), inhibe las enzimas quinona oxidorreductasa NQO1, nitroreductasa-1 y proteína disulfuro isomerasa causando lesiones en las membranas celulares de los protozoarios y en nematodos inhibe la glutatión-S-transferasa y modula el gen Avr-14, que codifica la subunidad de tipo alfa del canal iónico de cloruro regulado por glutamato.

Recientemente se ha asociado su mecanismo de acción como un antiviral ya que NTZ suprime la replicación viral inhibiendo la maduración de la hemaglutinina viral y el factor de transcripción viral inmediato temprano 2 (IE2), así como activando el factor de iniciación de la traducción eucariota 2 α , una proteína intracelular antiviral.(Shakya, et al., 2018)

Después de la administración oral, el fármaco es absorbido en el tracto gastrointestinal el cual es hidrolizado a TZX por las esterasas y se conjuga por glucuronidación a glucurónido de TZX. El fármaco tiene una unión a proteínas plasmáticas en un 99%, este es eliminado

por orina, bilis y heces, y presenta una vida media de 1.3 horas.(Rossignol, 2014). Cuando se administra con alimentos la biodisponibilidad de la TZX se ve afectada ya que puede presentar interacciones con algunas isoenzimas del citocromo-P450 implicadas en el metabolismo de fármacos.

Actualmente este medicamento es comercializado en presentaciones de tabletas 500 mg, tabletas recubiertas 500 mg y polvo para suspensión 100 mg/5 mL.

3.3. MECANISMOS DE DEGRADACIÓN

La degradación en fármacos y medicamentos se da por condiciones químicas, físicas y biológicas. Las reacciones químicas que causan inestabilidad son provocadas por hidrólisis, oxidación-reducción, esterificación, polimerización etc., como consecuencia se puede tener problemas de degradación del principio activo y generar productos tóxicos, lo que provocaría una pérdida de la eficacia. (Lozano C., Córdoba D., & Córdoba M., 2012)

La hidrólisis es una de las causas más comunes en las descomposiciones de fármacos, esta reacción se da entre el fármaco y el agua, en grupos funcionales como ésteres, amidas, imidas, lactonas, por mencionar algunos.

La NTZ presenta una degradación en condiciones alcalina y ácidas dando lugar a dos productos de degradación siendo el principal TZX, metabolito activo que tiene actividad farmacológica, esta reacción se da por una desacetilación en donde se pierde un grupo acetilo. (Malesuik et al., 2012).

El mecanismo de reacción de hidrólisis ácida y básica se muestran en las figuras 3 y 4 respectivamente.

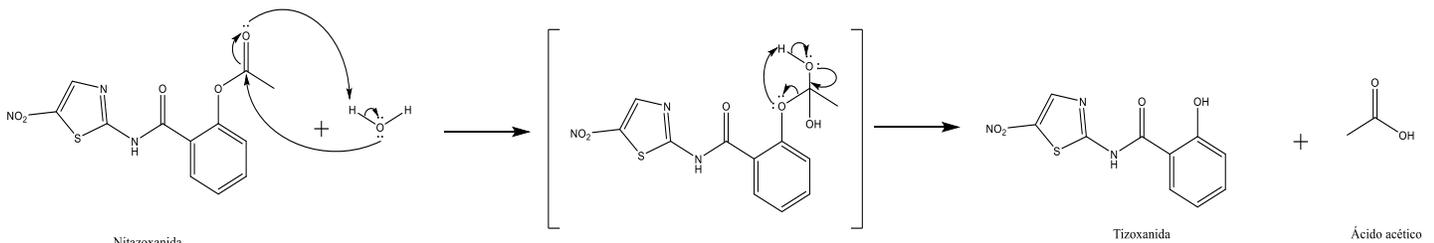


Figura 2. Hidrólisis ácida de NTZ

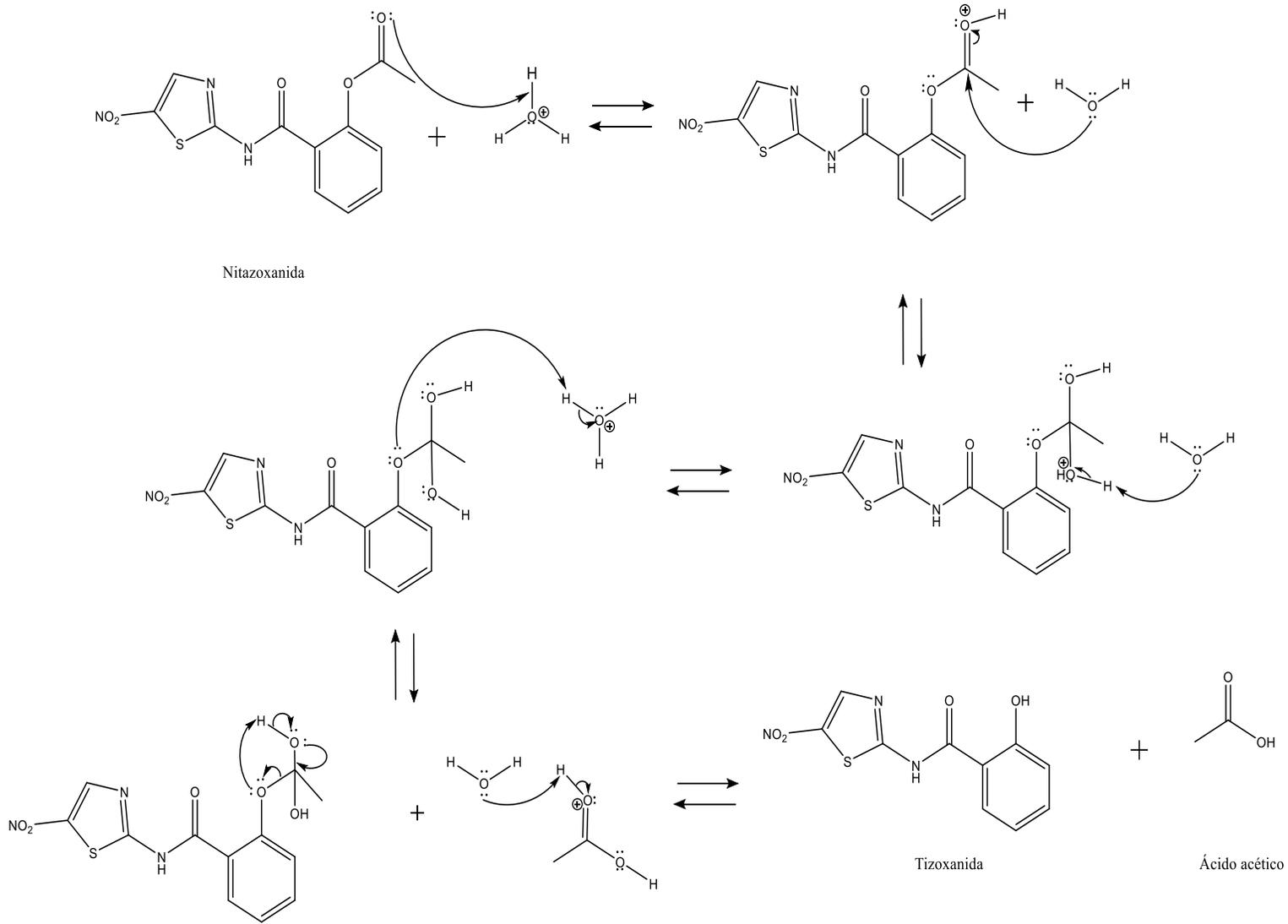


Figura 3. Mecanismo de reacción de hidrólisis ácida.

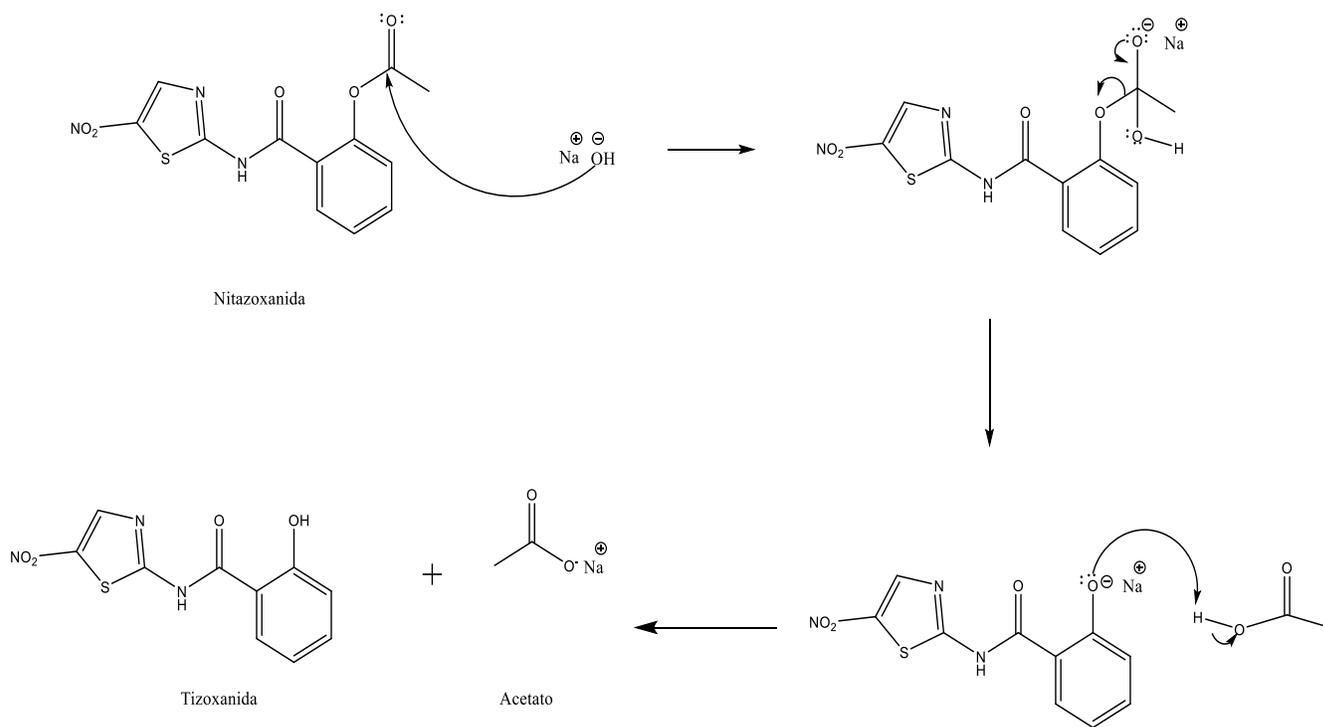


Figura 4. Mecanismo de reacción de hidrólisis básica.

3.4. CINÉTICA QUÍMICA

Hay distintos procesos por los cuales se dan las reacciones químicas, uno de los aspectos importantes es la velocidad con la que se producen, algunas pueden ser rápidas o lentas. La ley de velocidad para una reacción química es una ecuación que relaciona la velocidad de reacción con las concentraciones de los reactantes y algunos parámetros constantes. (Zhou, Porter, & Zhang, 2017)

Para una reacción genérica $aA + bB \rightarrow C$, la ecuación está dada por:

$$v = k[A]^a[B]^b$$

Donde [A] y [B] se refiere a la concentración de las especies A y B respectivamente, a y b son los coeficientes estequiométricos de la etapa más lenta del mecanismo de reacción; k es el coeficiente de tasa o constante de la velocidad de reacción y v es la velocidad de reacción. El valor de este coeficiente k depende de condiciones como la temperatura, pH.

La cinética de degradación es aquella en la que se analiza la velocidad de reacción, pero al mismo tiempo factores físicos y químicos de los que depende. La identificación y determinación de los productos de degradación permiten, conocer las condiciones para mejorar su estabilidad.

La cinética de degradación que pueden clasificarse en:

- **Reacciones de orden cero.** Donde la velocidad no depende de la concentración de los reactivos. Las concentraciones de los reactivos no aceleran la velocidad de la reacción. Por lo tanto, la velocidad de reacción es igual al coeficiente de la velocidad de reacción y se representa;

$$v = -\frac{d[A]}{d[t]} = k$$

Donde k es la constante de velocidad de orden cero, que tiene como unidad []/t (concentración del analito por el tiempo es decir, mol/L*s) (Zhou, Porter, & Zhang, 2017)

- **Reacciones de primer orden.** Son las reacciones donde la velocidad depende la concentración, estas reacciones están involucradas en los procesos de descomposición de fármacos y el paso de los fármacos de un compartimiento del organismo a otro. La ecuación de velocidad de reacción de primer orden con respecto a reactivo A se representa:

$$v = -\frac{d[A]}{d[t]} = k[A]$$

Donde k es la constante de velocidad de primer orden, que tiene como unidad 1/s. (Zhou, Porter, & Zhang, 2017)

3.5. ESTUDIOS DE ESTABILIDAD DE NTZ

Se han reportado varios métodos para realizar diferentes estudios de estabilidad de NTZ en productos terminados como tabletas y en solución.

CL Gopu y colaboradores demostraron (2007) que NTZ presenta una degradación por hidrólisis en condiciones, neutra (agua, 70 °C, 2 h), ácida (HCl 0,1 M, 50 °C, 30 min), alcalina (0,1 M NaOH, temperatura ambiente, 30 min), degradación oxidativa (H₂O₂, 3 %, temperatura ambiente, 3 h) y térmica (80 °C, 2 h), sin embargo, en condición fotolítica (luz solar, 2 días) no existe riesgos mayores de degradación.

Para cuantificación utilizaron acetonitrilo como disolvente en cromatografía por capa fina de alto rendimiento. De acuerdo con la publicación de resultados este método presentó características adecuadas para la determinación de NTZ en presencia de sus productos de degradación. (Gopu et al., 2007)

Si bien NTZ parece ser estable siendo expuesta a la luz solar, se han realizado cinéticas de fotodegradación en formas farmacéuticas (tabletas y polvo para solución) donde, Malesuik y otros reportaron que NTZ presenta una cinética de orden cero la cual determinaron con muestras que fueron expuestas a una lámpara de ultravioleta en intervalos de tiempo 0, 60, 120, 150, 180, 210, 240 y 270 minutos, éstas presentaron un porcentaje de degradación de 67 % para tabletas y un 72 % para suspensión oral de degradación del fármaco en soluciones de acetonitrilo. (Malesuik et al., 2009)

3.6. IMPORTANCIA DEL ANÁLISIS DE NITAZOXANIDA EN LOS ESTUDIOS DE CALIDAD

Para proporcionar resultados apropiados y confiables durante el desarrollo de un método analítico se deben tomar en cuenta diversos factores en torno a la sustancia de referencia utilizada, los disolventes y las condiciones de almacenamiento.

La calidad de una forma farmacéutica se determina tanto por el contenido del fármaco, como por su pureza, así mismo se debe garantizar la estabilidad de este.

La estabilidad de fármacos es de suma importancia debido a que esta propiedad nos ayuda a conocer que tanto mantiene un fármaco sus características fisicoquímicas y de esta manera garantizar su seguridad y eficacia. El estudio de estabilidad determina el periodo de tiempo y las condiciones de almacenamiento en las cuales las materias primas y las preparaciones oficiales se mantienen dentro de las especificaciones sobre identidad, pureza y calidad requeridas.

De acuerdo con la ICH Q1 A (R2) "Pruebas de estabilidad de nuevos fármacos y productos farmacéuticos", los fármacos deben ser sometidos a pruebas de estrés dentro de las cuales se incluyen los cambios de temperatura, pH, fotoestabilidad y almacenamiento para ayudar a identificar los posibles productos de degradación, la cual dependerá de la sustancia farmacéutica individual y el tipo de producto farmacéutico utilizado. Estas pruebas se realizan con la finalidad de establecer vías de degradación y desarrollar y validar procedimientos analíticos adecuados, para garantizar la eficacia de su actividad farmacológica. (European Medicines Agency, 2006)

Un medicamento debe garantizar que durante su vida útil en el mercado tendrá la estabilidad requerida; una sustancia farmacológica se debe evaluar en condiciones de almacenamiento que compruebe su estabilidad térmica y la duración del estudio debe cubrir tanto el almacenamiento como su envío y uso posterior, garantizando de esta manera que el medicamento presente los componentes activos para su actividad farmacológica.

Los estudios de estabilidad se llevan a cabo en periodos de tiempo de 6-12 meses en condiciones diferentes dependiendo del tipo de estudio a realizar como se muestra en la tabla 2.

Tabla 2. Condiciones de almacenamiento para estabilidad. (NOM-073-SSA1-2015)

Estudio	Condición de almacenamiento	Periodo de tiempo requerido
A largo plazo	25°C ± 2°C/60 % HR ± 5 % o 30°C ± 2°C/65 % HR ± 5 %	12 meses
Intermedio	30°C ± 2°C/65 % HR ± 5 %	6 meses
Acelerado	40°C ± 2°C/75 % HR ± 5 %	6 meses

Sin embargo, no siempre es necesario llevar a cabo este periodo de tiempo en determinaciones de estabilidad dentro del análisis químico farmacéutico, esto es, durante los tiempos dedicados al análisis de las formas farmacéuticas dentro de un laboratorio de control de calidad ya que la duración de estos estudios es relativamente corta, dado que se requiere determinar el nivel de calidad, características organolépticas y fisicoquímicas relacionadas con la calidad de la forma farmacéutica, la cual será destinada para el uso del paciente final, y con estos análisis, garantizar la calidad, la seguridad y eficacia del medicamento en cuestión.

3.7. CROMATOGRAFÍA

La cromatografía es una de las técnicas que más se utiliza en el análisis de farmacéutico debido a la simplicidad y rapidez además relaciona diversos conjuntos de métodos que permiten separar e identificar los componentes químicos de una mezcla, esto se basa en la migración diferencial de cada componente entre una fase móvil y una estacionaria. (Watson, 2012)

3.7.1. CROMATOGRAFÍA LIQUIDA DE ALTA RESOLUCIÓN

La cuantificación de fármacos y medicamentos se puede determinar por diferentes metodologías, si bien dentro del análisis farmacéutico en la industria y en diferentes áreas de investigación se ha utilizado a menudo la determinación por cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC por sus siglas en inglés) ya que permite la separación e identificación de cada uno de los componentes presentes en una mezcla a través de la afinidad hacia una fase estacionaria que puede ser de sílice alúmina o resinas de intercambio iónico o bien a una fase móvil compuesta por uno o varios líquidos, por lo que es importante conocer la estructura de la molécula a analizar para poder tomar en cuenta factores como la polaridad.

De acuerdo con la farmacopea de los estados unidos Mexicanos (FEUM) existe una clasificación de los tipos de columnas de acuerdo con su material de relleno, entre las cuales se encuentra la columna L1 (C 18) que es una columna que contiene un relleno Octadecil silano ligado químicamente a partículas de sílice porosa o a

micropartículas cerámicas, de 1,5 a 10 µm de diámetro, es una de las columnas más versátiles ya que proporcionan una buena retención y resolución. (FEUM, 2018)

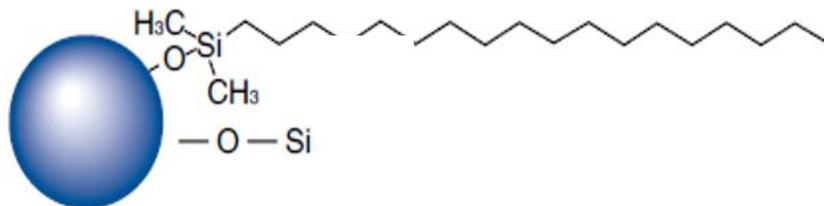


Figura 5. Estructura de columna C 18

Existen varios tipos de detectores acoplados a la cromatografía, el más utilizado suele ser el detector de ultravioleta que abarca longitudes de onda desde 200 hasta 400 nm. Para que la molécula pueda absorber en esta región es necesario que presente un sistema conjugado, es decir, que los átomos se encuentren enlazados mediante enlaces sencillos y enlaces dobles alternados.

El detector de Diodos (DAD) se basa en un modo de óptica inversa, es decir el haz de radiación que atraviesa la muestra es dispersado por medio de una red de difracción fija lo que permite recoger simultáneamente todas las longitudes de onda dispersadas mediante una matriz de arreglo de fotodiodos lo que permite analizar la pureza del pico comparando los espectros UV en varios puntos a lo largo de este, cuyos valores deberían estar entre 1.0 y 1.5 para así poder confirmar la presencia de un solo analito en dicho pico cromatográfico. (Moffat, Osselton, & Widdop, 2011; PerkinElmer, 2013)

3.8. MÉTODOS DE CUANTIFICACIÓN DE NITAZOXANIDA

De acuerdo con investigaciones recientes existen diferentes métodos de cuantificación para NTZ, así como para sus metabolitos activos (TZX y glucurónido de TZX) que han sido detectados en plasma, orina y bilis.

En 2016 Jinqiu Liu et al., desarrollaron un método de cuantificación de TZX y glucurónido de TZX en plasma de ratón por cromatografía líquida- espectrometría de masas en tándem, donde se seleccionó el modo de ionización para la cuantificación de TZX y glucurónido de

TZX en virtud de la presencia del grupo hidroxilo fenólico o grupo carboxilo en sus estructuras. Donde utilizaron una columna Poroshell 120 C18 (50 × 2,0 mm, 2,7 μm, Agilent) y una precolumna C18 (4 × 3,0 mm, 5 μm, Phenomenex). La temperatura de la columna se mantuvo a 25 °C. La fase móvil era una mezcla de formiato de amonio 5 mM que contenía 0,05 % de ácido fórmico (A) y acetonitrilo que contenía 0,05 % de ácido fórmico (B). El gradiente consistió en 10 % de B durante 0,00 a 1,00 min, 10 a 95 % de B durante 1,00 a 1,50 min, 95 % de B durante 1,50 a 3,00 min y, finalmente, una disminución al 10 % de B para volver a equilibrar la columna durante 3,00 min. El caudal fue de 0,4 mL/min y el volumen de inyección fue de 10 μL. (Liu et al., 2016)

También se han desarrollados métodos electroquímicos como la voltamperometría cíclica y de onda cuadrada en el electrodo de carbono vítreo para la determinación de NTZ, en donde se toma a consideración la amplitud y frecuencia del pulso, para una resolución de NTZ. (Jain et al., 2013)

4.0. JUSTIFICACIÓN

Desde su origen, la Nitazoxanida (NTZ) se ha utilizado tradicionalmente como un fármaco con actividad antiparasitaria y antimicrobiana de amplio espectro. Recientemente se le han encontrado aplicaciones como agente antiviral, y una de las más interesantes ha sido su actividad contra el VHB y VHC, además de su amplio espectro antibacteriano y parasiticida. Por estas razones, NTZ se considera una molécula con un alto grado de interés farmacológico y que se utiliza de forma rutinaria en el tratamiento de diversas enfermedades.

Por esta misma razón, el control de calidad de las diferentes formas farmacéuticas comerciales es necesario, y con ello, el manejo de condiciones experimentales para la evolución de calidad de la NTZ. Sin embargo, en determinadas condiciones ambientales y experimentales, se ha encontrado que la NTZ se degrada de forma rápida a su principal producto de degradación, la Tizoxanida (TZX), interfiriendo claramente con la estabilidad de NTZ en cada etapa de los procesos analíticos donde la molécula es expuesta, generando incertidumbre acerca de su integridad durante cada proceso analítico, y mayormente en relación con la cantidad de fármaco presente en las muestras analizadas.

Este proyecto se centrará en realizar pruebas de degradación de NTZ en diferentes condiciones experimentales, priorizando aquellas que sean las más utilizadas en los ensayos de cuantificación derivadas de pruebas o estudios de formulación, estudios de liberación y de valoración.

5.0. HIPÓTESIS

La exploración de las condiciones experimentales para el análisis de NTZ permitirá encontrar los parámetros de solubilidad y temperatura adecuados para llevar a cabo el análisis rutinario del compuesto en diferentes tipos de muestras en los ensayos de formulación, estudios de liberación y estudios de valoración rutinarios.

6.0. OBJETIVOS

6.1. OBJETIVO GENERAL

Evaluar la degradación de NTZ en diferentes disolventes y a distintas temperaturas para desarrollar mejores condiciones de trabajo durante el análisis químico farmacéutico de muestras.

6.2. OBJETIVOS ESPECIFICOS

1. Evaluar la estabilidad de NTZ en diferentes condiciones de disolventes (agua, buffer de fosfatos, metanol:agua 1:1, etanol:agua 1:1, metanol, etanol, acetonitrilo, acetato de etilo) y temperaturas (refrigeración, congelación, temperatura ambiente, y 37 °C).
2. Obtener la cinética de degradación de NTZ en las diferentes condiciones evaluadas.
3. Establecer las mejores condiciones experimentales para la preparación de muestras durante el tratamiento previo a la cuantificación en diferentes tipos de ensayos farmacéuticos.

7.0. METODOLOGÍA

7.1. Instrumentación y condiciones cromatográficas

Se utilizó un equipo de cromatografía de líquidos de alta resolución HITACHI modelo L-7000 con detector UV con las siguientes condiciones: longitud de onda de 347 nm, volumen de inyección de 25 µL, un flujo de 0.8 mL/min y con un tiempo de corrida de 5 minutos. Se utilizó una columna Waters Xbridge C18 con dimensiones de 4.6 × 75 mm con un tamaño de partícula de 2.5 µm.

7.2. Preparación de solución STOCK.

Se preparó una solución madre equivalente a 1000 µg/mL (sustancia de referencia NTZ). La cual se preparó disolviendo 10 mg de fármaco en 10 mL de dimetil sulfoxido (DMSO) en un matraz volumétrico.

7.3. Preparación de las soluciones de trabajo.

Se preparó una serie de soluciones a diferentes concentraciones (20 y 5 µg/mL), en diferentes disolventes, las cuales fueron almacenadas a diferentes temperaturas en tubos cónicos de 25 mL cubiertos con aluminio. Estas se prepararon como se muestra en las tablas 3 y 4:

Tabla 3. Preparación de soluciones de trabajo

Solución	Concentración (µg/mL)	Volumen de solución STOCK (mL)	Volumen de disolvente (mL)	Volumen final (mL)
STOCK	1000	-	-	10
TRABAJO	100	1	9	10

Tabla 4. Preparación de muestras de NTZ.

Solución	Concentración (µg/mL)	Volumen de solución de trabajo (mL)	Volumen de disolvente (mL)	Volumen final (mL)
MUESTRA 1	20	5	20	25
MUESTRA 2	5	1.25	23.75	25

Los disolventes y temperaturas utilizadas durante los estudios de verificación de estabilidad en condiciones de análisis químico-farmacéutico se describen en la tabla 5.

Tabla 5. Condiciones Experimentales

Disolvente	Temperatura			
	Ambiente (19-23 °C)	Refrigeración (3 °C)	Congelación (- 18 °C)	37 °C
Agua	X	X	X	
Buffer de fosfatos pH 6.8	X	X		X
Agua:Metanol 1:1	X	X	X	
Agua:Etanol 1:1	X	X	X	
Metanol	X	X	X	
Etanol	X	X	X	
Acetonitrilo	X	X	X	
Acetato de Etilo	X	X		X

7.4. Preparación de soluciones

Agua acidulada (H₃PO₄) 0.5%

En un matraz volumétrico de 10 mL agregar 5 mL de agua tridestilada y 0.684 mL de ácido fosfórico 85 % m/v, aforar. Agregar 100 mL de agua tridestilada en un matraz aforado de 200 mL, verter la solución anterior y aforar con agua tridestilada.

Buffer de fosfatos 0.05 M

Pesar 0.6941 g de fosfato de sodio monobásico monohidrato, vaciar en un matraz aforado de 100 mL agregar 50 mL de agua destilada, agitar medir el pH y en caso necesario justar el pH a 6.8 con hidróxido de sodio 1 M, llevar al volumen de aforo con el mismo disolvente.

7.5. Estudio de estabilidad de NTZ

Se prepararon soluciones STOCK en diferentes días de trabajo, durante los cuales se pesaron 105,104,102 y 101 mg de NTZ Lote-2 RJV respectivamente, se vertieron en un matraz volumétrico de 10 mL, se diluyeron con 5 mL de DMSO, se agitó hasta la disolver y se llevó a volumen de aforo con el mismo disolvente.

7.6. Estudio de estabilidad de NTZ a 37 °C

La estabilidad de NTZ a 37 °C se evaluó utilizando la solución STOCK preparada como se mencionó previamente, las soluciones de muestra utilizadas fueron preparadas de acuerdo con la tabla 4 utilizando los disolventes correspondientes para cada análisis (buffer de fosfatos pH 6.8 y acetato de etilo), estas soluciones fueron vertidas en tubos cónicos de 25 mL.

Posteriormente en microtubos de color azul (20 µg/mL NTZ) y amarillo (5 µg/mL) recubiertos con aluminio se transfirieron 1.5 mL de las soluciones de muestra. Estos tubos fueron etiquetados del 1-8 y de 1.1-8.1 indicando las réplicas de lectura de cada concentración, se colocaron en una gradilla y se almacenaron en la campana de extracción dentro de un baño maría a 37°C ± 2 °C durante 56 horas. La temperatura se monitoreo con un termómetro.

El análisis de estabilidad se llevó a cabo leyendo una muestra de las réplicas de cada concentración a las 7, 24, 31, 47 y 55 h después de la primera lectura (tiempo 0) en el equipo de HPLC con las condiciones cromatográficas descritas en el punto 7.1.

7.7. Estudio de estabilidad de NTZ a temperatura ambiente

La estabilidad de NTZ a temperatura ambiente se evaluó utilizando las soluciones STOCK preparadas previamente y las soluciones de muestra utilizadas fueron preparadas como se indica en la tabla 4 utilizando los disolventes mencionados en la tabla 5. Las muestras fueron almacenadas en tubos cónicos de 25 mL tapados herméticamente, recubiertos con papel aluminio y etiquetados correctamente, se dejaron durante 56 h a temperatura ambiente 19-23 °C.

De los tubos cónicos se tomaron 1.5 mL de muestra a las 8, 24, 31, 48 y 56 h para su lectura en el equipo de HPLC con las condiciones que se describen en el apartado 7.1.

7.8. Estudio de estabilidad de NTZ a temperatura de refrigeración

La estabilidad de NTZ a temperatura ambiente se evaluó utilizando las soluciones STOCK preparadas previamente, las soluciones de muestra utilizadas fueron preparadas como se indica en la tabla 4 utilizando los disolventes mencionados en la tabla 5. Las muestras fueron almacenadas en tubos cónicos de 25 mL tapados

herméticamente, recubiertos con papel aluminio y etiquetados correctamente, se dejaron durante 56 h en el refrigerador y se monitoreo la temperatura durante este tiempo.

De los tubos cónicos se tomaron 1.5 mL de muestra a las 8, 24, 31, 48 y 56 h para su lectura en el equipo de HPLC con las condiciones que se describen en el apartado 7.1, tratando que las muestras fueran expuestas al cambio de temperatura (ambiente) lo menos posible.

7.9. Estudio de estabilidad de NTZ a temperatura de congelación

La estabilidad de NTZ a temperatura ambiente se evaluó utilizando las soluciones STOCK preparadas previamente, las soluciones de muestra utilizadas fueron preparadas como se indica en la tabla 4 utilizando los disolventes que se mencionan en la tabla 5 (con excepción del acetato de etilo y buffer de fosfatos), estas soluciones fueron vertidas en tubos cónicos de 25 mL.

Posteriormente en microtubos de color azul (20 µg/mL NTZ) y amarillo (5 µg/mL) recubiertos con aluminio se transfirieron 1.5 mL de las soluciones de muestra. Estos tubos fueron etiquetados del 1-8 y de 1.1-8.1 indicando las réplicas de lectura de cada concentración, se colocaron en una gradilla y se almacenaron en el congelador a -18 °C durante 56 horas.

Para poder llevar a cabo las lecturas en el HPLC se descongeló una muestra de cada replica a las 8, 24, 31, 48 y 55 h, y se leyeron siguiendo lo especificado en el punto 7.1

4.0. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Implementación del Método Analítico

En la figura 6 se puede observar un cromatograma típico de NTZ bajo las condiciones cromatográficas descritas. La NTZ tiene un tiempo de retención de 1.7 minutos y su principal metabolito TZX sale a los 2.9 minutos, no observándose mayor número de señales dentro de la corrida.

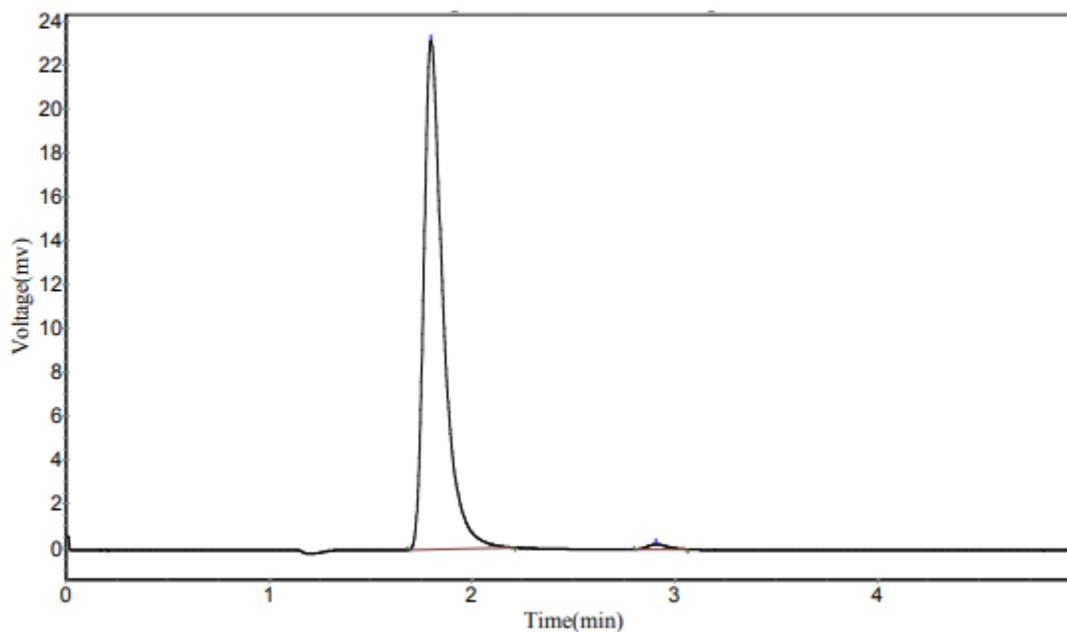


Figura 6. Cromatograma de NTZ

Estudios de Estabilidad

Durante este estudio de estabilidad se observó la degradación de NTZ durante 56 horas, obteniéndose los correspondientes perfiles de degradación. Se hace una revisión de las diferentes condiciones planteadas en los objetivos. En la primera parte se revisaron las cinéticas de degradación en cada uno de los disolventes donde se evaluó la degradación de la NTZ a dos niveles de concentración (20 y 5 $\mu\text{g/mL}$) a diferentes temperaturas.

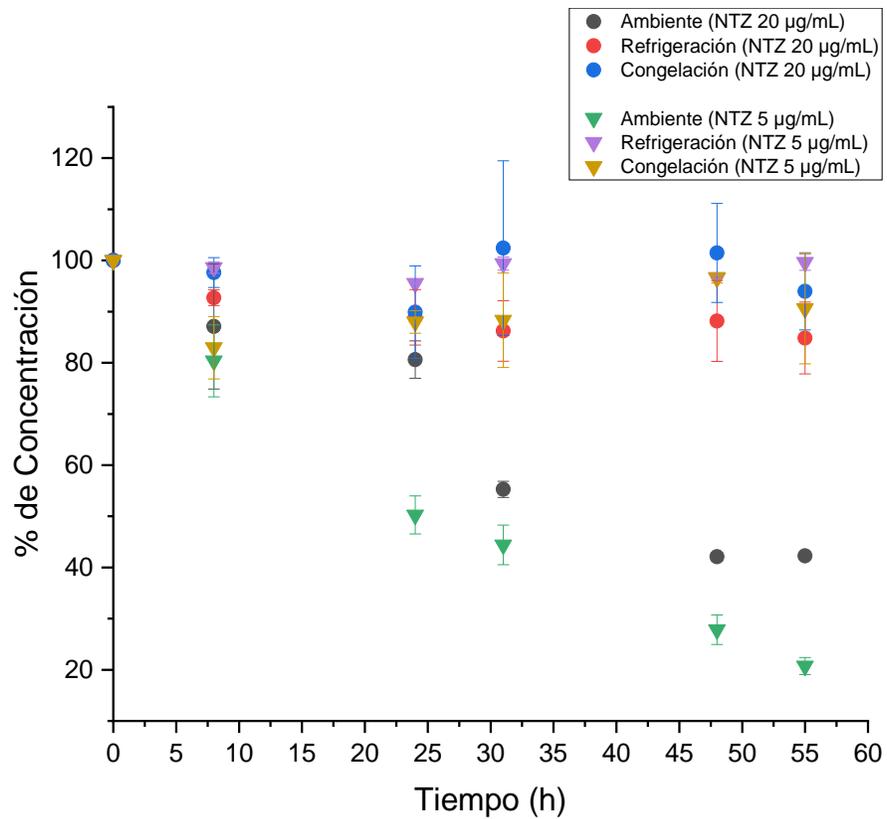


Figura 7. Perfil de degradación de NTZ en agua.

En la figura 7 se observa la degradación de NTZ en agua. Los perfiles de degradación muestran un mayor grado de descomposición a temperatura ambiente, alcanzando esta una disminución de la concentración inicial entre el 60 % y 80 %, a concentraciones de 20 y 5 µg/mL de NTZ respectivamente, mientras que, en refrigeración y congelación, la degradación alcanza entre un 5 a un 15 % máximo.

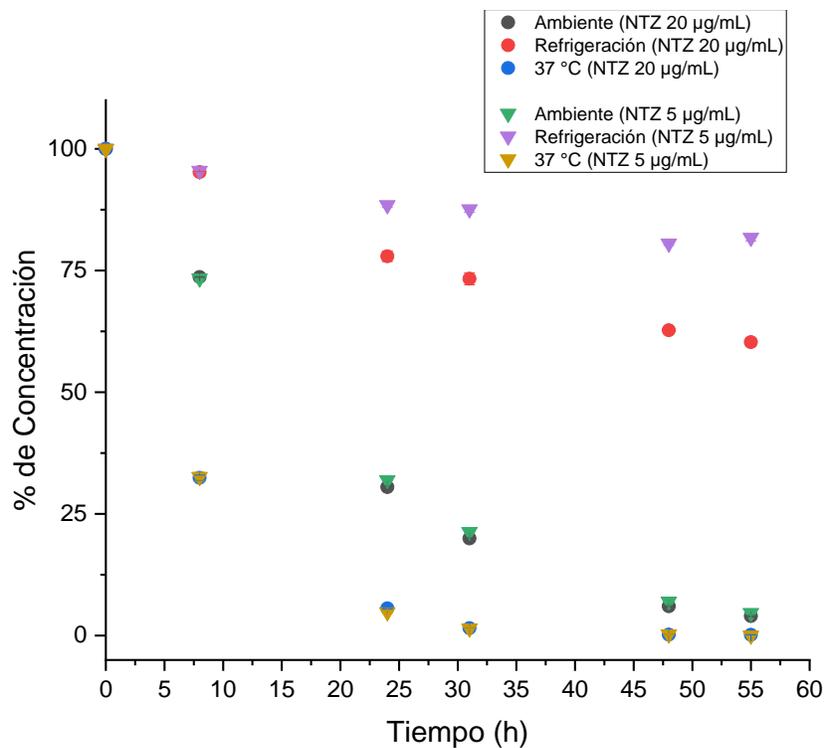


Figura 8. Perfil de degradación de NTZ en buffer de fosfatos 0.05 M pH 6.8

El perfil de degradación en buffer de fosfatos 0.05 M pH 6.8 (Figura 8) muestra que NTZ a temperatura ambiente y a 37 °C se alcanza la mayor tasa de degradación. A temperatura ambiente, se alcanza hasta más del 90 % de disminución en ambos niveles evaluados a las 56 horas de estudio, mientras que a 37 °C la degradación llega casi al 100 % en un tiempo cercano a las 30 horas, como se puede apreciar en el gráfico en ambas concentraciones analizadas. En refrigeración, la degradación de NTZ alcanza entre un 15 y 30 % a las 56 h. Es importante indicar que, en esta condición, la concentración de 20 µg/mL presenta mayor degradación que la de 5 µg/mL.

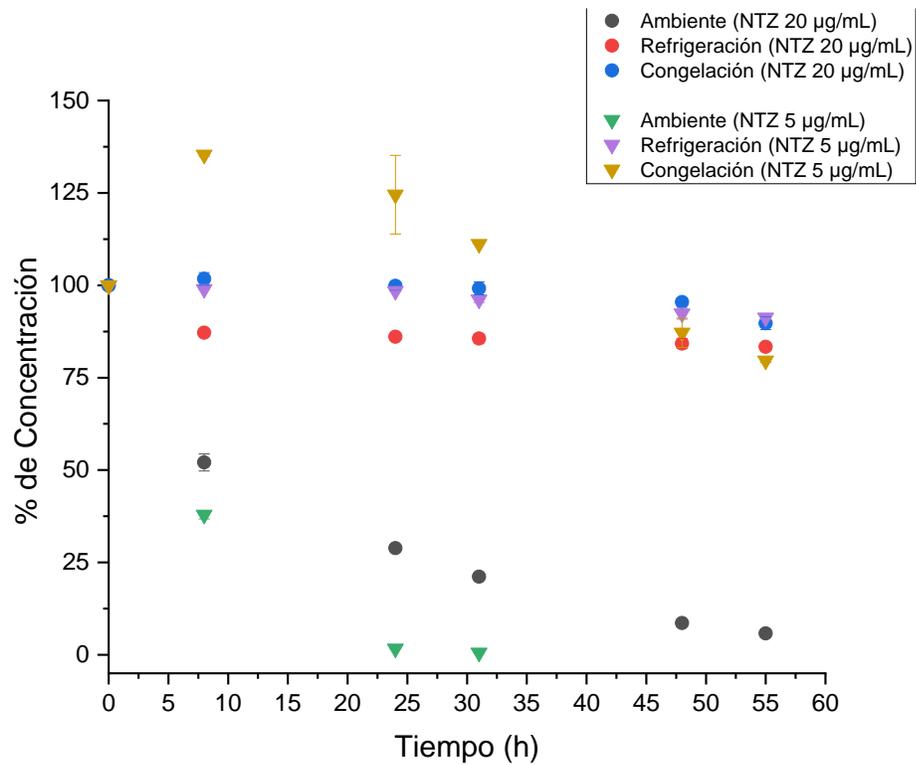


Figura 9. Perfil de degradación de NTZ en MetOH:Agua 1:1.

En la figura 9, se observa que NTZ en metanol: agua 1:1 y a temperatura ambiente se degrada completamente a una concentración de 5 µg/mL en menos de 40 h y a 20 µg/mL alcanza hasta un 95 % de degradación a las 55 h. A temperaturas bajas, refrigeración y congelación (3 y -18 °C) presenta una degradación entre el 10 y 20 % a la 55 h, no mostrando tendencia alguna en cuanto a la concentración.

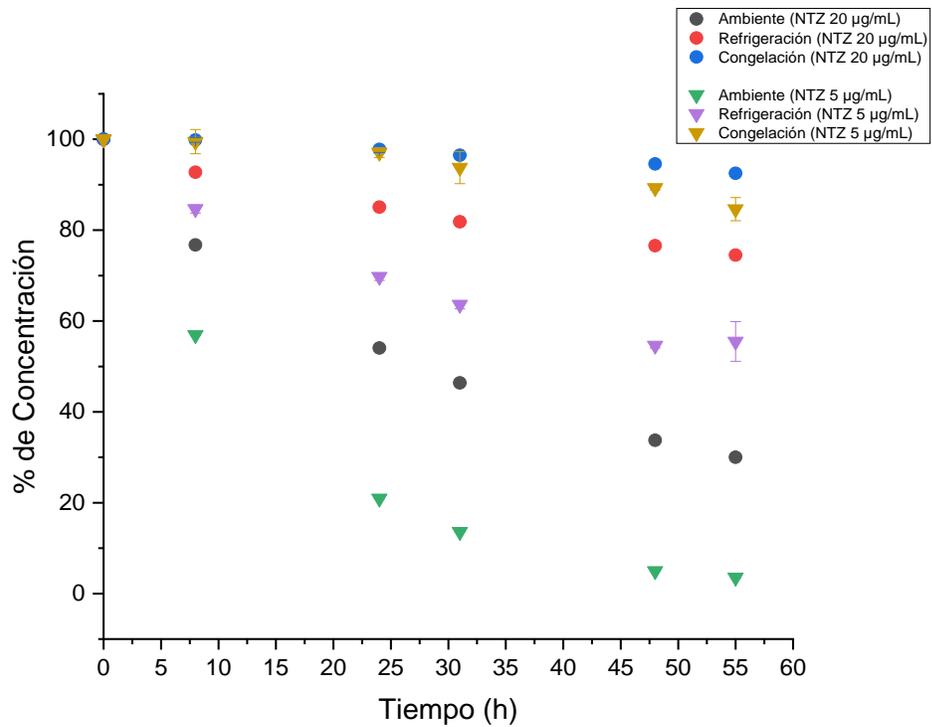


Figura 10. Perfil de degradación de NTZ en EtOH:Agua 1:1

El comportamiento que presenta NTZ en EtOH:Agua (Figura 10) en condiciones de congelación es similar para las concentraciones evaluadas, alcanzando solo un 10 % de degradación en ambas, mientras que en refrigeración se observa una mayor degradación a 5 µg/mL que en 20 µg/mL, alcanzando niveles del 50 y 30 % respectivamente. A temperatura ambiente, la degradación es mucho más acelerada que en las condiciones antes mencionadas, llegando hasta a tener una pérdida entre el 70 y 98 % de la concentración inicial a 20 y 5 µg/mL respectivamente.

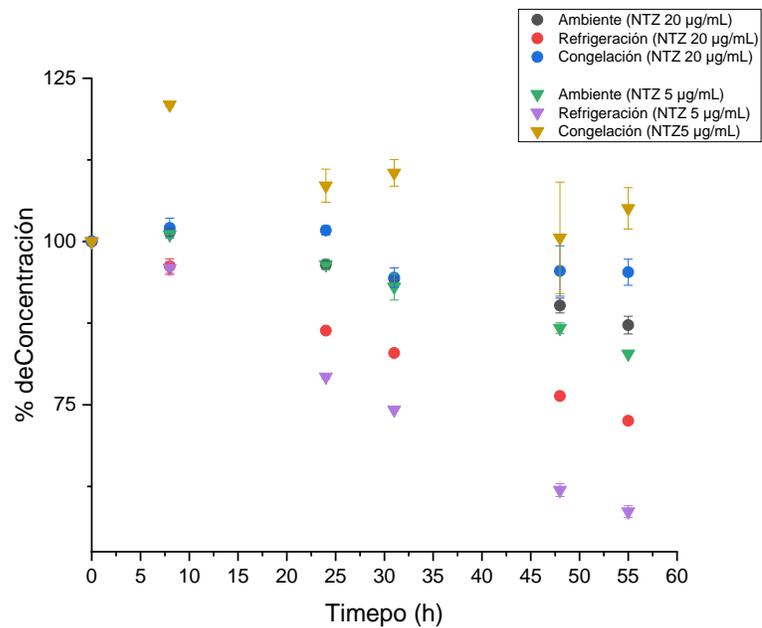


Figura 11. Perfil de degradación de NTZ en Metanol.

En la figura 11 el perfil de degradación de NTZ en MetOH se logra observar que, en condiciones de refrigeración, el compuesto presenta la mayor degradación alcanzando cerca del 50% de su concentración inicial en 56 horas a 5 µg/mL y alcanza un 25 % de degradación a 20 µg/mL; así mismo, el perfil que presenta en temperatura ambiente es muy similar en ambas concentraciones teniendo aproximadamente un 20 % de degradación del fármaco. Los perfiles de congelación muestran la menor degradación, alcanzando solamente un 10 %.

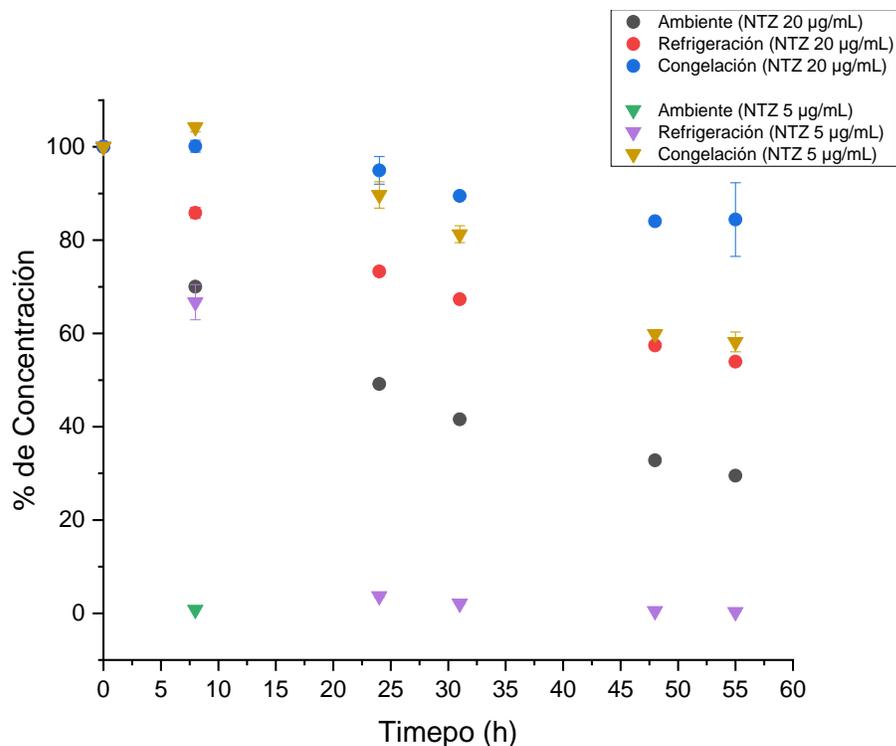


Figura 12. Perfil de degradación de NTZ en Etanol.

El perfil de degradación de NTZ en etanol (Figura 12) muestra que después de 8 h en condiciones de temperatura ambiente, la concentración baja (5 µg/mL) presenta una degradación del 100 %, mientras que a 20 µg/mL la degradación es de un 50 % en el mismo periodo, y alcanza un 70 % a las 56 h. En refrigeración (4°C), la concentración baja ha disminuido más del 99 % en 25 horas, y la concentración de 20 µg/mL llega al 40 % de degradación en 55 h. En condiciones de congelación, NTZ se muestra menos sensible, pero se alcanza una degradación entre el 40 % y el 20 % para ambas concentraciones. En esta condición se observa que la concentración más baja (5 µg/mL) presenta una mayor estabilidad en etanol comparada con la concentración más alta, y de igual forma, dicha inestabilidad es mayor en relación con la mostrada en las cinéticas de metanol.

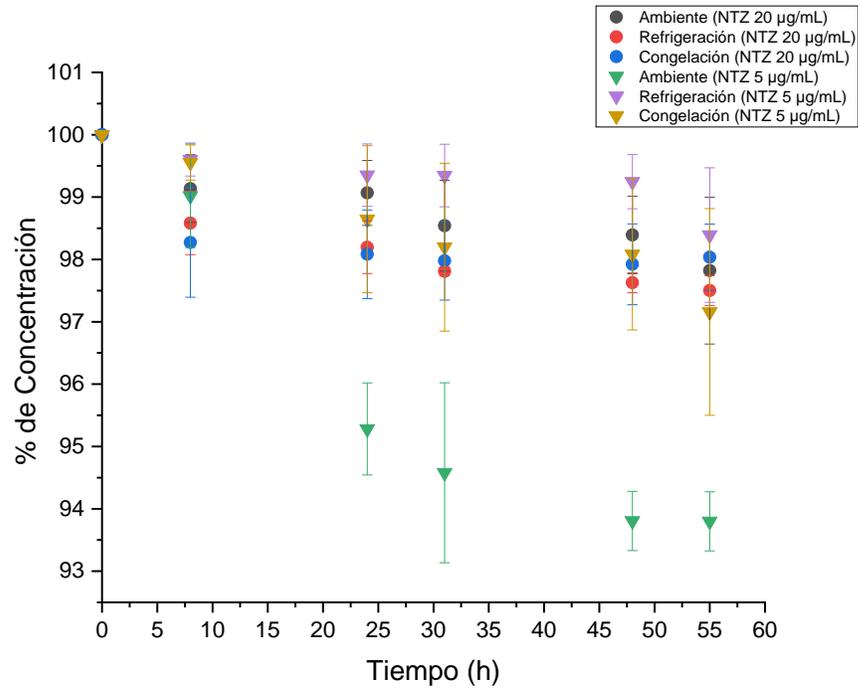


Figura 13. Perfil de NTZ en Acetonitrilo.

En acetonitrilo, NTZ tiende a ser muy estable pues durante las 55 horas, la mayor degradación observada fue de 6% a la concentración de 5 µg/mL a temperatura ambiente, mientras que la concentración de 20 µg/mL solo muestra una degradación del 2 %. En condiciones de refrigeración y congelación, la degradación máxima fue de 2 % en ambas concentraciones evaluadas. Los perfiles de pueden apreciar en la figura 13.

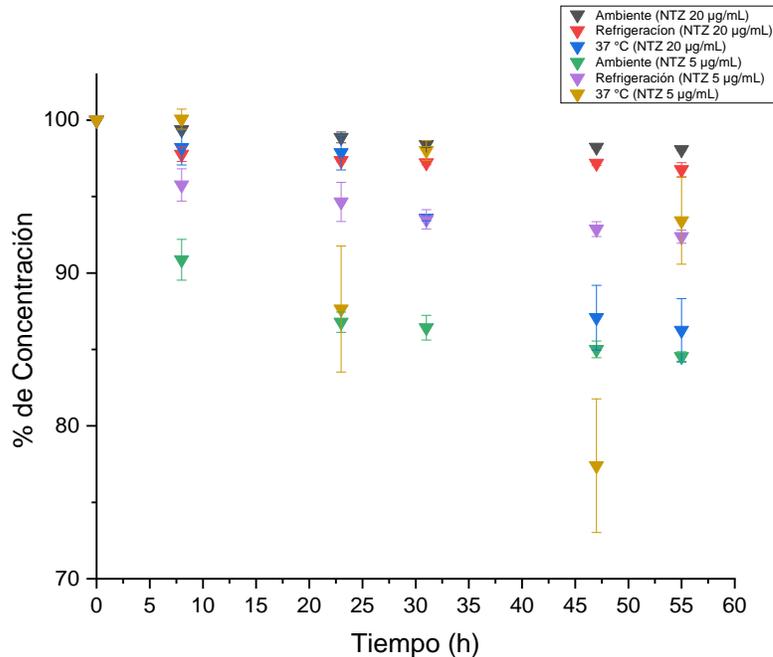


Figura 14. Perfil de degradación de NTZ en Acetato de etilo.

En acetato de etilo, se puede apreciar una tasa de degradación variable, ya que a temperatura de refrigeración la degradación varía entre el 3 % y 8 %; a temperatura ambiente la degradación que se alcanza se encuentra entre el 2 % y 15 %. En la condición de 37 °C, NTZ alcanza una degradación entre 15 % y 20 %, mostrándose un efecto muy marcado de la temperatura sobre la cinética de descomposición, así como de la concentración, dado que, en todos los casos, la mayor degradación en cada condición corresponde a la concentración de 5 µg/mL con relación a de 20 µg/mL. Los perfiles de degradación se muestran en la figura 14.

Cinética de degradación.

Se hizo una evaluación de ajuste de las cinéticas de degradación con la finalidad de determinar el mejor ajuste y encontrar el orden de la cinética de degradación que más representará el proceso estudiado. Para ello se procedió a ajustar los resultados a los modelos de cinética de orden 0 y orden 1 ($[C]_t = -kt + [C]_0$ y $\ln[C]_t = -kt + \ln[C]_0$), y conforme al mejor valor de correlación se eligió el orden de la cinética mostrado en las tablas 6-9. Se puede observar que, en la mayoría de los ajustes, se encuentra un orden de reacción de primer orden, lo que indica que la reacción de degradación en general puede presentar una cinética de primer orden en cada uno de los disolventes utilizados en el estudio y bajo las diferentes condiciones de temperatura evaluados.

Tabla 6. Constantes de degradación de NTZ a temperatura ambiente.

Disolvente	Temperatura	Concentración (µg/mL)	Constante de degradación (k)	Orden de Reacción
Agua	Ambiente	5	0.0278	1
		20	0.0169	1
Buffer de fosfatos		5	0.0500	1
		20	0.0549	1
Metanol Agua 1:1		5	0.1730	1
		20	0.0494	1
Etanol:Agua 1:1		5	0.0608	1
		20	1.2034	0
Metanol		5	0.3296	0
		20	0.0026	1
Etanol		5	0.6092	1
		20	0.0211	1
Acetonitrilo		5	0.0012	1
		20	0.0003	1
Acetato de etilo	5	0.0036	1	
	20	0.0003	1	

NOTA: Para cinética de orden cero, las unidades de k son µg/min y para cinética de orden 1 las unidades de la constante son min⁻¹

Tabla 7. Constantes de degradación de NTZ a temperatura de refrigeración.

Disolvente	Temperatura	Concentración (µg/mL)	Constante de degradación	Orden de Reacción
Agua	Refrigeración	5	0.0153	0
		20	0.0025	0
Buffer de fosfatos		5	0.0038	1
		20	0.0096	1
Metanol Agua 1:1		5	0.0017	1
		20	0.2222	0
Etanol:Agua 1:1		5	0.0109	1
		20	0.0052	1
Metanol		5	0.0101	1
		20	0.0058	1
Etanol		5	0.1118	1
		20	0.0108	1
Acetonitrilo		5	0.0002	1
		20	0.0004	1
Acetato de etilo	5	0.1163	0	
	20	0.0435	0	

Tabla 8. Constantes de degradación de NTZ a temperatura de congelación.

Disolvente	Temperatura	Concentración (µg/mL)	Constante de degradación	Orden de Reacción
Agua	Congelación	5	0.0001	1
		20	0.0186	0
Metanol Agua 1:1		5	0.0066	1
		20	0.1749	0
Etanol:Agua 1:1		5	0.2728	0
		20	0.1352	0
Metanol		5	0.0010	1
		20	0.0013	1
Etanol		5	0.0123	1
		20	0.0036	1
Acetonitrilo		5	0.0005	1
		20	0.0003	1

Tabla 9. Constantes de degradación de NTZ a 37 °C

Disolvente	Temperatura	Concentración (µg/mL)	Constante de degradación	Orden de Reacción
Buffer de fosfatos	37 °C	5	0.1203	1
		20	0.1195	1
Acetato de etilo		5	0.0049	1
		20	0.0028	1

Los resultados obtenidos después del estudio de estabilidad durante el análisis químico farmacéutico se observan que NTZ presenta una mayor degradación en disolventes acuosos (entre un 60-99% del producto inicial) y en disolventes como acetonitrilo y acetato de etilo la degradación de NTZ es mínima (5-20%).

Con respecto a los resultados para obtener el orden de reacción de degradación mediante el coeficiente de correlación (ANEXO 1) en la mayoría de las condiciones a la que fue sometida NTZ, se encontró que los procesos de degradación en el mayor número de condiciones fueron de primer orden.

NTZ presenta degradación de orden cero a temperatura ambiente en etanol:agua 1:1 en 20 µg/mL y en metanol en 5 µg/mL; en refrigeración se presenta este orden de degradación en agua en ambas concentraciones, en metanol:agua en 20 µg/mL y en acetonitrilo en ambas concentración y en congelación en disolventes como agua en 20 µg/mL etanol:agua en ambas concentraciones y metanol:agua 20 µg/mL.

Hidrólisis de NTZ

Para la determinación del tipo de reacción de hidrólisis que presenta NTZ, se clasificaron los disolventes utilizados de acuerdo con la teoría de Lewis que indica que un ácido es una sustancia que puede aceptar un par de electrones para la formación de un enlace covalente, por lo tanto, una base es aquella sustancia que puede ceder un par de electrones. En la tabla 10 se muestra la clasificación de acuerdo con el carácter ácido o base de cada uno de los disolventes considerando la Teoría de Lewis.

Tabla 10. Clasificación de los disolventes en ácido o base

Disolvente	pka	Clasificación
Buffer de fosfatos		
H ₂ PO ₄ ⁻	2.14	Acido
HPO ₄ ⁻²	7.2	Base
Agua	15	Acido-base
Metanol	15.5	Acido
Etanol	16	Acido
Acetato de etilo	17	Base
Acetonitrilo	25	Base

RIDDICK, JA Y AL. (1986)

Tomando en cuenta esto, y el mecanismo de hidrólisis ácida y básica mostradas en las figuras 3 y 4 respectivamente, se muestra que NTZ presenta una mayor hidrólisis en medios ácidos como el metanol, etanol, etanol:agua1:1, metanol:agua 1:1 y en buffer de fosfatos, ya que el mayor porcentaje de degradación se da en estos disolventes, los cuales actúan como ácidos de Lewis, mientras que con el acetonitrilo y el acetato de etilo que actúan como base en la hidrólisis que presenta NTZ, no se observa una degradación tan rápida, independientemente de la degradación que se puede dar por efecto de la temperatura.

5.0. CONCLUSIÓN

Se establecieron las condiciones de un método analítico para la cuantificación de NTZ por cromatografía de Líquidos

Se evaluó la estabilidad de NTZ en diversas condiciones de trabajo experimental, y se obtuvieron los perfiles de degradación de NTZ en cada condición experimental.

Se determinó la cinética de degradación de la NTZ en cada condición experimental y se determinó el valor de la constante de velocidad correspondiente.

Se puede concluir finalmente que NTZ presenta una inestabilidad en disolventes que son ácidos ya que se presenta una degradación mayor al 50% del producto inicial.

La temperatura ambiente y a 37° C favorecen la degradación de NTZ.

Por lo tanto, es recomendable llevar los análisis de NTZ en disolventes como el acetonitrilo y para una mayor estabilidad mantener las muestras en refrigeración.

6.0. BIBLIOGRAFÍA

European Medicines Agency. (2006). *Q 1 A (R2) Stability Testing of new Drug Substances and Products*. 20.

Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos (FEUM) 12 ed. México; 2018

Gopu, C. L., Thomas, S., Paradkar, A. R., & Mahadik, K. R. (2007). *A validated stability indicating HPTLC method for determination of nitazoxanide*. 66, 5.

Jain, R., Kumar Yadav, R., & Ahmad Rather, J. (2013). Voltammetric quantitation of nitazoxanide by glassy carbon electrode. *Journal of Pharmaceutical Analysis*, 3(6), 452-455. <https://doi.org/10.1016/j.jpha.2013.07.005>

Liu, J., Meng, F., Li, Z., Yu, L., Peng, S., Guo, J., & Xu, H. (2016). Simultaneous quantification of tizoxanide and tizoxanide glucuronide in mouse plasma by liquid chromatography-tandem mass spectrometry: LC-MS/MS measurements of tizoxanide and tizoxanide glucuronide in mice. *Biomedical Chromatography*, 30(11), 1744-1749. <https://doi.org/10.1002/bmc.3748>

Malesuik, M. D., Gonçalves, H. M. L., Garcia, C. V., Trein, M. R., Nardi, N. B., Schapoval, E. E. S., & Steppe, M. (2012). Identification, characterization and cytotoxicity in vitro assay of nitazoxanide major degradation product. *Talanta*, 93, 206-211. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2012.02.014>

Malesuik, M. D., Goncalves, H. M. L., Paim, C. S., Schapoval, E. E. S., & Steppe, M. (2009). LC: Analysis of Photodegradation Kinetics of Nitazoxanide in Pharmaceutical Formulations. *Journal of Chromatographic Science*, 47(9), 745-748. <https://doi.org/10.1093/chromsci/47.9.745>

Marcelijn-Jimenez, G., Contreras-Zavala, L., Maggi-Castellanos, M., ÁngelesMoreno, A., & García-González. A. (2012) Development of a method by UPLC–MS/MS for the quantification of tizoxanide in human plasma and its pharmacokinetic application *RevBionalysis*, 4(8), 909-917.

Moffat, A. C., Osselton, M. D., & Widdop, B. (2011). *Clarke's Analysis of Drugs and Poisons in pharmaceuticals, body fluids and postmortem material* (4th ed.). United Kingdom: Pharmaceutical Press

Norma Oficial Mexicana NOM-073-SSA1-2015, Estabilidad de fármacos y medicamentos, así como de remedios herbolarios

PerkinElmer. (2013). Chromera User's Guide. In. USA.

Riddick, JA, Bunger, WB y Sakano, TK (1986) Disolventes orgánicos: propiedades físicas y métodos de purificación. Cuarta edición, Wiley-Interscience, Nueva York.

Romero-Cabello R., Gándara-Ramírez JL, Romero-Feregrino R, Navarrete-Cadena E. (2017). Estudio para evaluar la eficacia y seguridad de la nitazoxanida en el tratamiento de las parasitosis intestinales. *Rev Latinoam Patol Clin Med Lab*, 64(2), 73-78.

Rossignol, J.-F. (2014). Nitazoxanide: A first-in-class broad-spectrum antiviral agent. *Antiviral Research*, 110, 94-103. <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2014.07.014>

Rossignol, J.-F., & Keeffe, E. B. (2008). Thiazolides: A new class of drugs for the treatment of chronic hepatitis B and C. *Future Microbiology*, 3(5), 539-545. <https://doi.org/10.2217/17460913.3.5.539>

Shakya; Bhat, Hans R .; Ghosh, Surajit Kumar. (2018, septiembre 1). Nitazoxanide: A Multifunctional Chemotherapeutic Agent. *Curr Drug Discov Technol*. 2018, 15(3), 201-213(13).

Watson, D. G. (2012). *Pharmaceutical Analysis. A Textbook for Pharmacy Students and Pharmaceutical Chemists* (3rd ed.). UK: Elsevier Ltd.

Zhou, D., Porter, W. R., & Zhang, G. G. Z. (2017). Drug Stability and Degradation Studies. In *DEVELOPING SOLID ORAL DOSAGE FORMS: Pharmaceutical Theory & Practice* (2nd ed., pp. 113- 149). Amsterdam: Elsevier Inc.

7.0. ANEXOS

Tabla 1. Ajuste de orden de reacción.

Agua							
Temperatura	Disolvente	Orden de reacción 0			Orden de reacción 1		
	Parámetros	m	b	r	m	b	r
Ambiente	5 µg/mL	-1.3910	88.8154	-0.9675	-0.0278	4.5686	-0.9981
Refrigeración		-0.0153	98.3661	-0.8678	-0.0002	4.5885	-0.3516
Congelación		0.0058	95.6787	-0.3969	0.0003	4.5335	0.0990
Ambiente	20 µg/mL	-1.1034	92.5351	-0.9372	-0.0169	4.5537	-0.9503
Refrigeración		-0.2213	95.4454	-0.9151	-0.0025	4.5751	-0.6016
Congelación		-0.0186	94.7376	-0.5462	-0.0003	4.5479	-0.5262

Buffer de fosfatos							
Temperatura	Disolvente	Orden de reacción 0			Orden de reacción 1		
	Parámetros	m	b	r	m	b	r
Ambiente	5 µg/mL	-1.6572	85.9017	-0.9437	-0.0500	4.6213	-0.9845
Refrigeración		0.6746	84.5963	-0.9762	-0.0038	4.5919	-0.9785
37 °C		-1.4514	63.1683	-0.7923	-0.1203	4.4555	-0.9964
Ambiente	20 µg/mL	-1.6978	86.2758	-0.9459	-0.0549	4.6683	-0.9910
Refrigeración		-0.1411	95.3092	-0.9882	-0.0096	4.6076	-0.9941
37 °C		-1.4646	63.9542	-0.7999	-0.1195	4.4839	-0.9972

Metanol:agua							
Temperatura	Disolvente	Orden de reacción 0			Orden de reacción 1		
	Parámetros	m	b	r	m	b	r
Ambiente	5 µg/mL	-3.0473	83.3064	-0.9298	-0.1730	4.7778	-0.9968
Refrigeración		-0.1558	100.5532	-0.8532	-0.0016	4.6114	-0.9499
Congelación		-0.6206	122.2103	-0.6888	-0.0061	4.8091	-0.7091
Ambiente	20 µg/mL	-1.5075	78.5260	-0.9185	-0.0489	4.5309	-0.9970
Refrigeración		-0.2222	94.7352	-0.8746	-0.0024	4.5403	-0.7910
Congelación		-0.1749	102.5008	-0.8566	-0.0018	4.6310	-0.8526

Etanol agua							
Temperatura	Disolvente	Orden de reacción 0			Orden de reacción 1		
	Parámetros	m	b	r	m	b	r
Ambiente	5 µg/mL	-0.0614	4.5515	-0.9995	0.0050	-0.0298	0.9335
Refrigeración		-0.0118	4.5475	-0.9876	0.0002	0.0104	0.9977
Congelación		-0.0032	4.6104	-0.9451	0.0000	0.0097	0.9338
Ambiente	20 µg/mL	-1.2074	89.6085	-0.9554	0.0413	13.8383	0.8338
Refrigeración		-0.4454	97.5166	-0.9837	-0.0052	4.5830	-0.9902
Congelación		-0.1204	100.1466	-0.9925	-0.0012	4.6070	-0.9917

Metanol							
Temperatura	Disolvente	Orden de reacción 0			Orden de reacción 1		
	Parámetros	m	b	r	m	b	r
Ambiente	5 µg/mL	-0.3296	102.1257	-0.9643	-0.0036	4.6290	-0.9618
Refrigeración		-0.7848	99.7713	-0.9934	-0.0101	4.6194	-0.9986
Congelación		-0.1103	111.1050	-0.4924	-0.0010	4.7078	-0.4925
Ambiente	20 µg/mL	-0.2495	101.8328	-0.9660	-0.0026	4.6245	-0.9668
Refrigeración		-0.4981	98.8700	-0.9953	-0.0058	4.6105	-0.9970
Congelación		-0.1222	101.2117	-0.8297	-0.0013	4.6176	-0.8304

Etanol							
Temperatura	Disolvente	Orden de reacción 0			Orden de reacción 1		
	Parámetros	m	b	r	m	b	r
Ambiente	5 µg/mL	-12.402	100.000	-1.000	-0.606	4.605	-1.000
Refrigeración		-1.708	75.434	-0.855	-0.112	4.616	-0.987
Congelación		-0.916	106.574	-0.977	-0.014	4.784	-0.997
Ambiente	20 µg/mL	-1.163	85.680	-0.934	-0.021	4.474	-0.982
Refrigeración		-0.812	95.513	-0.969	-0.011	4.574	-0.996
Congelación		-0.249	101.143	-0.811	-0.004	4.624	-0.978

Acetonitrilo							
Temperatura	Disolvente	Orden de reacción 0			Orden de reacción 1		
	Parámetros	m	b	r	m	b	r
Ambiente	5 µg/mL	-0.1149	99.9204	-0.9601	-0.0012	4.6045	-0.9615
Refrigeración		-0.0002	100.0032	-0.9161	-0.0001	4.6052	-0.9159
Congelación		-0.0001	99.7143	-0.9573	-0.0008	4.6024	-0.9577
Ambiente	20 µg/mL	-0.0180	99.9227	-0.9742	-0.0002	4.6044	-0.9744
Refrigeración		-0.0389	99.5944	-0.9306	-0.0004	4.6011	-0.9313
Congelación		-0.0221	99.5615	-0.8532	-0.0002	4.6008	-0.8540

Acetato de etilo							
Temperatura	Disolvente	Orden de reacción 0			Orden de reacción 1		
	Parámetros	m	b	r	m	b	r
Ambiente	5 µg/mL	-0.2358	96.0716	-0.8898	-0.0026	4.5645	-0.8988
Refrigeración		-0.1163	98.0803	-0.8905	-0.0012	4.5792	-0.8074
37 °C		-0.2577	99.8856	-0.6054	-0.0049	4.6322	-0.7888
Ambiente	20 µg/mL	-0.0333	99.7434	-0.9484	-0.0003	4.6026	-0.9489
Refrigeración		-0.0435	98.9153	-0.7719	-0.0003	4.5792	-0.2767
37 °C		-0.1417	98.6922	-0.4717	-0.0016	4.5925	-0.4791



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS



DRA. DULCE MARIA ARIAS ATAIDE
DIRECTORA DE SERVICIOS ESCOLARES
U.A.E.M
PRESENTE

Los suscritos catedráticos de la Facultad de Farmacia, dependiente de la Universidad Autónoma del Estado de Morelos, se dirigen a Usted con el fin de comunicarle que, después de haber revisado el trabajo de tesis “**Estudio de estabilidad de Nitazoxanida en condiciones experimentales de análisis químico-farmacéutico**” presentado por la pasante de la carrera de Licenciado en Farmacia. **C. Rosaura Jiménez Vásquez (10010955)**, consideramos que reúne todos los requisitos que exige un trabajo de esta especie, por lo que hacemos saber nuestro **VOTO APROBATORIO**.

Jurado

Dr. Samuel Enoch Estrada Soto

Dra. Liliana Aguilar Marcelino

Dra. Adriana Valladares Méndez

Dra. María Crystal Columba Palomares

M. en C. Martha Hernández Labra

Firma electrónica



Atentamente

**“Por una humanidad culta
una Universidad de excelencia”**

M.P.D. REYNA AMÉRICA SERRANO LÓPEZ
SECRETARIA DE DOCENCIA

C.c.p.: archivo
*BEDM



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS

Se expide el presente documento firmado electrónicamente de conformidad con el ACUERDO GENERAL PARA LA CONTINUIDAD DEL FUNCIONAMIENTO DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS DURANTE LA EMERGENCIA SANITARIA PROVOCADA POR EL VIRUS SARS-COV2 (COVID-19) emitido el 27 de abril del 2020.

El presente documento cuenta con la firma electrónica UAEM del funcionario universitario competente, amparada por un certificado vigente a la fecha de su elaboración y es válido de conformidad con los LINEAMIENTOS EN MATERIA DE FIRMA ELECTRÓNICA PARA LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE ESTADO DE MORELOS emitidos el 13 de noviembre del 2019 mediante circular No. 32.

Sello electrónico

REYNA AMERICA SERRANO LOPEZ | Fecha:2023-08-30 11:56:30 | Firmante

RS8aThLREzi85JGHyDgK0CX4MRZ85ydUgJPgsTNTU7RPECa3VB5Xg5vcY4FLbqUiDjtlSnDGVKGF7U+3J4U78dDs56W+hitKno0CYHzNSJPZU3qOvYUg3nKjrRDML07Csua1XCbdLuwgzTABQ5wP9sgJMk6azgf9vHtMbVpxySGOjuYkC04uOjZELnzduYwt8XBNx2e6jxsp61LW9qxaXwmkMHLMDxMQ3/nOwq9wwPEu9E084jegZsW0aUMHMvi94DJImBgHD0cq0DsELt8rNnYKEO3FN7vrnBTXjF/XpS6LZQg7V7L34vpRsDxL3ntT60unnxj6r7/3vZKgHO9GA==

Puede verificar la autenticidad del documento en la siguiente dirección electrónica o escaneando el código QR ingresando la siguiente clave:



4Z0Cy96vG

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/XBhpLkEzmUJr5gRbWh7eELxVTNB6APqn>





UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS

Se expide el presente documento firmado electrónicamente de conformidad con el ACUERDO GENERAL PARA LA CONTINUIDAD DEL FUNCIONAMIENTO DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS DURANTE LA EMERGENCIA SANITARIA PROVOCADA POR EL VIRUS SARS-COV2 (COVID-19) emitido el 27 de abril del 2020.

El presente documento cuenta con la firma electrónica UAEM del funcionario universitario competente, amparada por un certificado vigente a la fecha de su elaboración y es válido de conformidad con los LINEAMIENTOS EN MATERIA DE FIRMA ELECTRÓNICA PARA LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE ESTADO DE MORELOS emitidos el 13 de noviembre del 2019 mediante circular No. 32.

Sello electrónico

MARIA CRYSTAL COLUMBA PALOMARES | Fecha:2023-10-05 10:08:47 | Firmante

yQwWAjcS2twRc4i9kqNhQWi1UvblCRSTGZaN1tAh21EODNF/gB5bSG5zKqOm2InqCW3FKwiHVJO4cL7EpSn465y0OWhtSyrwlWNfScP8QnWfGXlItWAFR5XoG8+kpimpEsnl ye+/2+wZqVETDnjKNZttRywyC9qcGVVZfSc/yx1YbJb065+LDrNhW4Wnqe1JyW8Fi/wRnkjAlxnGSXu6ZlQ/8ANmF0YRbgaarL11TWOjN3EuoFkrrO+Bkqi/6J0e1ZhmTbxgnB8ak Pu4zP2UBnEt++F9xzbgBX4ppVA1Gn1+vuxNND+ePFE51sOCfJ2Rul60uvtXL6H2Sidgw==

LILIANA AGUILAR MARCELINO | Fecha:2023-10-05 10:50:43 | Firmante

EHOIZ7N19MT0o6k6BssG7m44mzN1EkePtmRJ6GacVHsWPDeOenrxRI3huux6a0szYGqXhl6geOq7YRGdzYfdXJD9SW1iLeDh+bgpH3THrey1Zr+jrvDyqwKp+IXQERF0vTP+R 7ToQX2kv6B+6wcyG6ZsBVqaRS5O7qisFxlCeK5JmQ8Rpw8ilngJEvs5ZmyLhH628Ewk4ErwWnDrHlhoNOI+Wtp6K/uwc5kqdbbcwCu8Dh5Z0jcK8TCdegCaLRhRTDH+GpJMmg dduhdnfvKjzshYm5+6jGqEHJqxACQKOEHI8Hd+OeW8GWG9or4bz9CoG2fQ96GxcCPW/Jp/2K2j9A==

MARTHA HERNANDEZ LABRA | Fecha:2023-10-05 12:13:56 | Firmante

Y5H/WJu8UV5eO2NOAbUFLWQGRzmkIvXAeHnf44xVxpAkm+H6RNQKuAmYL/6oscHPxJ8UNyRAtrXkmtvJ9UxgleD73hIxIY+QgdJA0XzwVQXIYK/MajFN9cR/SKNqrbtWHH3lrX 4lGSLicsLLutbVPoJnhRmmais+MYyy5Qxw4zjbkLOEg8OQkNXepyeT3j4fL+9XrFibpka67Pqb0kME685H5SVbPnkzyIra+GX6l/9JBtjyggx03DYF5Y9FglD9OzWYt4ATuY/x9js9hre fURB1t6W16cUOmL7mOcXimOhG/V7eaG+23S/RgM760fhdMFMnCDem8FLWmCxeisrW==

SAMUEL ENOCH ESTRADA SOTO | Fecha:2023-10-05 15:56:28 | Firmante

X+rCgdqkZ6W351qMdbgwrJOsOQ6HSWcdarHuWPfIJGcczsvi8HXyXNilffYtKe6CjEGvI60ggN10NM6Xz8asc0sPFXbLDMkyw7dHgecLFN5wPeueEFM3husi/ibc7xyGd5K+SD7 Mr36LbkclMG/SqgysgCldrVg9iE4hO0Xuy+Gqwluwf/fjROlg8wNjY6i9kA9Z8fu5FTIRMEaKngUB0aqhEVN0eq2lOtaGe2qDesc7rmgTR7Z+yJQwor2KqrdE5IMYDwbdteyDU/0iBV2 rbfasDDK7HLRGaP9PSwinTXXXMNIdae5okYPVsunmfCreHwxCRq2ah5FRFRVNHpQ==

ADRIANA VALLADARES MENDEZ | Fecha:2023-10-05 22:35:01 | Firmante

pCuXFikW67NGJ2r/jemyO2yAWHAB5v981vYgHNvIXp690udsUIZdcC+6d/G7vY0AYsph6gk0nHRUeRRdrseO/UqPZgfrjEj7FIdxFdGtpf6yEC5zJO3yrxTrJkSHLeNBG+25pfqZGo E3p1EsKuacm4LLzaR3C7NF4n1LbzUZdRaD0Vgnmyli69KmChRPRL2mLZ7G0uih8xVm1wvTRRCHAKzjfp3eDWdrAfrFu5fgnu43RqAilTg8gjJK0nZiGeGE6v1eFmbXr7LS5gFqT tZqgzllcuLamBd3YKj3SIG0il6HXvGpknnM1XiHGnpeyOSxl7PCrH5DEIZ/1J0+9Y/7g==

Puede verificar la autenticidad del documento en la siguiente dirección electrónica o escaneando el código QR ingresando la siguiente clave:



4wgEhsQMp

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/FcwIFQ2dZgZ0M85fUFFiGO60JkNRxwxT>



