

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PAMPA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

JONATHAN MISAEL TEIXEIRA BORDIM

**DESENVOLVIMENTO DE MÉTODO PARA DETERMINAÇÃO DE NITAZOXANIDA
POR COLORIMETRIA ASSOCIADA A IMAGENS DIGITAIS**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

URUGUAIANA/RS

2022

JONATHAN MISAEL TEIXEIRA BORDIM

**DESENVOLVIMENTO DE MÉTODO PARA DETERMINAÇÃO DE NITAZOXANIDA
POR COLORIMETRIA ASSOCIADA A IMAGENS DIGITAIS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação *stricto sensus* em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Pampa, Campus Uruguaiana, como requisito parcial para obtenção do grau de mestre em Ciências Farmacêuticas.

Orientador: Prof. Dr. Marcelo Donadel Malesuik,

Coorientador (a): Profa. Dra. Fabiana Ernestina Barcellos da Silva.

URUGUAIANA/RS

2022

JONATHAN MISAEL TEIXEIRA BORDIM

**DESENVOLVIMENTO DE MÉTODO PARA DETERMINAÇÃO DE NITAZOXANIDA
POR COLORIMETRIA ASSOCIADA A IMAGENS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação *stricto sensus* em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Pampa, Campus Uruguaiana, como requisito parcial para obtenção do grau de mestre em Ciências Farmacêuticas.

Orientador: Prof. Dr. Marcelo Donadel Malesuik,

Coorientador (a): Profa. Dra. Fabiana Ernestina Barcellos da Silva.

Dissertação defendida e aprovada em: ____/____/____

Banca examinadora:

Prof. Dr. Marcelo Donadel Malesuik
Universidade Federal do Pampa - Campus Uruguaiana
(Orientador)

Profa. Dra. Fabiana Ernestina Barcellos da Silva
Universidade Federal do Pampa - Campus Uruguaiana
(Coorientador)

Prof. Dr. Elton Luis Gasparotto Denardin
Universidade Federal do Pampa - Campus Uruguaiana

Prof. Dr. Rafael Roehrs
Universidade Federal do Pampa - Campus Bagé

RESUMO

Nas últimas décadas vivemos um grande avanço tecnológico e científico, mas as parasitoses continuam representando um grande problema de saúde pública, principalmente em países subdesenvolvidos, afetando diretamente a qualidade de vida da população. Os fármacos antiparasitários são uma alternativa rápida e eficaz no tratamento, quando questões como educação e saneamento básico, que poderiam ajudar na solução desses problemas, são temas mais complexos, levam mais tempo e necessitam de grandes investimentos financeiros. A nitazoxanida (NTZ) está, atualmente, sendo largamente utilizada na terapêutica, principalmente por apresentar amplo espectro antiparasitário e anti-helmíntico. Devido ao seu largo uso pela população, a segurança e eficácia terapêutica desses produtos é de suma importância. Neste sentido, estão disponíveis diversos métodos na literatura para quantificação do fármaco, como também, monografia em compêndios oficiais. Em ambos os casos, percebe-se que o uso de reagentes tóxicos, o elevado tempo das análises, a baixa frequência analítica, aliado ao alto valor dos equipamentos utilizados, são problemas no controle de qualidade de rotina das formas farmacêuticas disponíveis. Neste contexto, buscou-se desenvolver método simples, levando em consideração a aplicação de ferramentas mais econômicas, no intuito de proporcionar maior rapidez e diminuir impactos ambientais. No presente trabalho foi desenvolvido método para determinação da nitazoxanida em comprimidos e pó para suspensão utilizando a colorimetria associada a imagens digitais. A análise colorimétrica foi baseada na reação de cor obtida quando o fármaco é exposto ao meio básico. Para aquisição das imagens foi utilizado sistema portátil que compreende uma caixa desenvolvida para controle da luminosidade e um *smartphone*. O processamento e tratamento das imagens foi realizado pelo aplicativo PhotoMetrix PRO[®] decodificando a cor pelo sistema RGB (*Red, Green, Blue*). Após o desenvolvimento e otimização do método, realizou-se a validação de acordo com os guias oficiais, levando-se em consideração os parâmetros como linearidade, efeito matriz, precisão, exatidão e robustez. O método desenvolvido utilizando a colorimetria associada a imagens digitais se apresentou como uma promissora ferramenta, aliada a princípios da química verde, para o emprego no controle de qualidade de comprimidos e pó para suspensão contendo NTZ, pois proporciona rápidas análises, com baixo custo, alta frequência analítica e equipamentos acessíveis. O método proposto foi comparado ao método oficial farmacopeico e os resultados obtidos demonstraram que são equivalentes, ou seja, ambos fornecem resultados estatisticamente semelhantes para quantificação da NTZ nas formas farmacêuticas disponíveis comercialmente. Neste sentido, o método proposto vem a contribuir com o controle de qualidade de rotina do fármaco, colaborando com a segurança e eficácia terapêutica dos produtos disponíveis comercialmente, bem como, com o meio ambiente.

Palavras-chaves: Nitazoxanida. Colorimetria. Imagens digitais. RGB.

ABSTRACT

In the last decades, we have experienced a great technological and scientific advance, but parasitic diseases keep representing a major public health problem, especially in underdeveloped countries, directly affecting the population's quality of life. Antiparasitic drugs are a quick and effective alternative in treatment, while issues such as education and basic sanitation, which could help in solving these problems, are more complex issues, taking longer and requiring large financial investments. Nitazoxanide (NTZ) is currently being widely used in therapy, mainly because it has a broad antiparasitic and anthelmintic spectrum. Due to their wide use by the population, the safety and therapeutic efficacy of these products is of paramount importance. In this sense, several methods are available in the literature for drug quantification, as well as monographs in official compendia. In both cases, it is clear that the use of toxic reagents, the long analysis time, the low analytical frequency, together with the high value of the equipment used, are problems in the routine quality control of the available pharmaceutical forms. In this context, we sought to develop a simple method, taking into account the application of more economical tools, in order to provide greater speed and reduce environmental impacts. In this work, a method was developed for the determination of nitazoxanide in tablets and powder for suspension using colorimetry associated with digital images. Colorimetric analysis was based on the color reaction obtained when the drug is exposed to a basic medium. For image acquisition, a portable system was used, comprising a box designed to control the brightness and a smartphone. The processing and treatment of the images was performed using the PhotoMetrix PRO[®] application, decoding the color using the RGB (Red, Green, Blue) system. After the development and optimization of the method, the validation was carried out according to the official guides, taking into account parameters such as linearity, matrix effect, precision, accuracy and robustness. The method developed using colorimetry associated with digital images presented itself as a promising tool, allied to the principles of green chemistry, for the use in the quality control of tablets and powder for suspension containing NTZ, as it provides fast analyses, with low cost, high analytical frequency and affordable equipment. The proposed method was compared to the official pharmacopoeial method and the results obtained showed that they are equivalent, that is, both provide statistically similar results for the quantification of NTZ in commercially available pharmaceutical forms. In this sense, the proposed method contributes to the routine quality control of the drug, collaborating with the safety and therapeutic efficacy of commercially available products, as well as with the environment.

Keywords: Nitazoxanide. Colorimetry. Digital images. RGB.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1: Estrutura química da Nitazoxanida.....	6
FIGURA 2: Região visível.....	9
FIGURA 3: Diagrama geral da aquisição de imagens digitais.....	12
FIGURA 4: Representação do sistema RGB no plano cartesiano.....	13
FIGURA 5: Processo para aquisição das imagens digitais.....	18
FIGURA 6: Aparato instrumental para a aquisição das imagens digitais.....	21
FIGURA 7: Comportamento do fármaco frente a condição ácida e básica.....	28
FIGURA 8: Curva de calibração para os canais R, G e B de soluções de NTZ SQR nas concentrações de 16 a 48 µg/mL.....	29
FIGURA 9: Coloração da NTZ em diferentes concentrações.....	29
FIGURA 10: Superfícies de resposta obtidas na otimização dos parâmetros.....	30
FIGURA 11: Otimização dos fatores que influenciam o desenvolvimento do método.....	31
FIGURA 12: Análise univariada do fator intensidade de emissão da luz.....	32
FIGURA 13: Análise univariada do fator distância.....	33
FIGURA 14: Análise univariada do fator tempo.....	34
FIGURA 15: Análise univariada do fator ROI.....	34
FIGURA 16: Avaliação do efeito matriz pelo paralelismo das retas.....	36
FIGURA 17: Superfícies de resposta obtidas no desenho experimental por CCD para avaliação da robustez.....	40
FIGURA 18: Teste TOST para avaliação da equivalência entre os métodos na determinação de NTZ em pó para suspensão.....	43
FIGURA 19: Teste TOST para avaliação da equivalência entre os métodos na determinação de NTZ em comprimidos.....	43

LISTA DE TABELAS

TABELA 1: Compilação de métodos analíticos encontrados na literatura para análise de NTZ em formas farmacêuticas.....	7
TABELA 2: Cores básicas e complementares do sistema RGB.....	14
TABELA 3: Variáveis codificadas pelo planejamento.....	22
TABELA 4: Condições analíticas otimizadas no método proposto.....	23
TABELA 5: Preparo das curvas de pó para suspensão e comprimidos em balão volumétrico de 10 mL para avaliação do efeito matriz.....	24
TABELA 6: Preparo das soluções para o teste de exatidão pelo método de recuperação de padrão.....	25
TABELA 7: Variáveis independentes codificadas pelo CCD.....	26
TABELA 8: Condições cromatográficas para determinação de NTZ definidos pela Farmacopéia Brasileira 6ª Edição (2019).....	27
TABELA 9: Análise de Teste de Variância ANOVA.....	35
TABELA 10: Resultado da Repetibilidade e Precisão Intermediária.....	37
TABELA 11: Resultados obtidos para o teste de recuperação realizado em amostra de comprimidos.....	38
TABELA 12: Resultados obtidos para o teste de recuperação realizado em amostra de pó para suspensão.....	39
TABELA 13: Determinação da concentração de NTZ em comprimidos e suspensão utilizando dois <i>smartphone</i>	41
TABELA 14: Resultado dos teores de NTZ empregando método colorimétrico associado a imagens digitais e CLAE.....	42
TABELA 15: Comparação entre as principais características de cada método.....	44

LISTA DE ABREVIATURAS

ACN	Acetonitrila
ANOVA	Análise de Variância
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
CCD	Delineamento Composto Central (do inglês - <i>Central Composite Design</i>)
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
DPR	Desvio Padrão Relativo (do inglês - <i>Relative Standard Deviation</i>)
FDA	Agência Reguladora Americana de Alimentos e Fármacos (do inglês - <i>Food and Drug Administration</i>)
HCl	Ácido Clorídrico
HSL	Matriz, Saturação e Luminosidade
HSV	Matriz, Saturação e Valor
LD	Limite de Detecção (do inglês - <i>Limit of Detection</i>)
LED	Diodo Emissor de Luz (do inglês - <i>Light Emitting Diode</i>)
LQ	Limite de Quantificação (do inglês - <i>Limit of Quantification</i>)
mg	Miligramas
mL	Mililitros
NaOH	Hidróxido de Sódio
NTZ	Nitazoxanida
pH	Potencial Hidrogeniônico
R²	Coefficiente de determinação
RGB	Vermelho, Verde e Azul (do inglês - <i>Red, Green and Blue</i>)
ROI	Região de interesse (do inglês - <i>Region of Interest</i>)
SQR	Substância Química de Referência
PFOR	Enzima Piruvato Ferredoxina Oxirredutase
µg	Microgramas
µL	Microlitros

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
2. OBJETIVOS	4
2.1. Objetivo Geral	4
2.2. Objetivos Específicos.....	4
3. REVISÃO DA LITERATURA	5
3.1. Epidemiologia e transmissão de parasitas intestinais.....	5
3.2. Nitazoxanida.....	6
3.3. Métodos para determinação da NTZ	7
3.4. Colorimetria	9
3.5. Captura e transformação da imagem digital em sinal analítico.....	10
3.5.1. Imagens digitais.....	10
3.6. Modelo RGB	12
3.7. Aplicativo PhotoMetrix PRO®	14
3.8. Princípios da Química Verde	15
4. MATERIAL E MÉTODOS	17
4.1. Descrição geral do método proposto.....	18
4.2. Aparato para aquisição das imagens digitais	18
4.3. Amostras, reagentes e soluções.....	19
4.4. Preparo das amostras e solução padrão de NTZ.....	19
4.4.1. Preparo da solução padrão de NTZ.....	19
4.4.2. Preparo da amostra Nitazoxanida Comprimidos	20
4.4.3. Preparo da amostra Nitazoxanida Pó para Suspensão	20
4.4.4. Água Acidificada pH 4,0.....	20
4.5. Instrumentação e reagentes	21
4.6. Aparato para aquisição da imagem digital segundo o método proposto.....	21
4.7. Otimização dos parâmetros	22
4.8. Condições Analíticas.....	23
4.9. Validação do método	23
4.9.1. Linearidade.....	23
4.9.2. Efeito Matriz.....	24
4.9.3. Precisão	25
4.9.4. Exatidão.....	25
4.9.5. Robustez.....	26
4.10. Determinação do teor das amostras pelo método farmacopeico.....	27
5. RESULTADO E DISCUSSÃO	28

5.1. A reação colorimétrica	28
5.2. Escolha do canal RGB	28
5.3. Otimização dos parâmetros	30
5.4. Validação do método proposto.....	35
5.4.1. Linearidade.....	35
5.4.2 Efeito Matriz.....	36
5.4.3. Precisão	37
5.4.4. Exatidão.....	38
5.4.5. Robustez.....	39
5.4.6. Comparação entre método proposto x farmacopeico.....	42
6. CONCLUSÃO	45
7. REFERÊNCIAS	46

1. INTRODUÇÃO

Apesar do grande avanço tecnológico e científico ao longo dos anos, as parasitoses continuam representando um grande problema de saúde pública a ser enfrentado, tanto para humanos quanto para animais. Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS) as parasitoses estão entre as doenças tropicais mais negligenciadas. Em virtude disso, países subdesenvolvidos, por possuírem menores condições sanitárias, são os principais acometidos, influenciando a saúde e qualidade de vida da população. Nesse sentido, os fármacos antiparasitários surgem com potencial de minimizar os impactos causados por estes agentes. Há diversas classes de medicamentos utilizados na terapêutica, entre eles os nitrotiazóis a qual pertence a Nitazoxanida (NTZ), desenvolvido para amplo espectro e com menor efeito colateral quando comparado aos demais fármacos com a mesma finalidade (MOTA *et al.*, 2018; SANTOS *et al.*, 2012).

NTZ é um agente antiparasitário e anti-helmíntico, ativo contra uma ampla gama de organismos, incluindo protozoários, helmintos, vírus e bactérias. O grupamento nitro está envolvido no seu mecanismo de ação, pois inibe a enzima piruvato ferredoxina oxireductase (PFOR), vital para sobrevivência desses microorganismos (GILLES & HOFFMAN, 2002; WHITE, 2014). A NTZ encontra-se disponível comercialmente nas formas farmacêuticas de comprimidos (500 mg) e pó para suspensão oral (20 mg/mL).

É possível encontrar na literatura diferentes métodos analíticos para avaliar a qualidade dos produtos contendo NTZ (KAPSE *et al.*, 2006; GOPU *et al.*, 2007; JADHAV *et al.*, 2007; RANE *et al.*, 2008; MALESUIK *et al.*, 2010; NOURUDDIN *et al.*, 2011; FAHIMA *et al.*, 2012; MAHA *et al.*, 2013; RAJEEV *et al.*, 2013; SALEH *et al.*, 2014; VARUN *et al.*, 2016; SMITA *et al.*, 2017; GHANDI *et al.*, 2018; MOHAMED *et al.*, 2022). Na Farmacopéia Brasileira 6ª edição (2019) estão disponíveis as monografias para análise do fármaco em matéria-prima, comprimidos e pó para suspensão oral. Apesar de existir diferentes métodos na literatura científica para análise do fármaco, bem como métodos oficiais disponíveis, permanecem as preocupações com o uso de grandes quantidades de reagentes tóxicos que acarretam prejuízos ao meio ambiente, como também o tempo nas

análises de rotina e o alto valor agregado dos equipamentos utilizados que elevam o custo das análises.

Diante do exposto, crescem as necessidades de se estudar e aplicar diferentes metodologias analíticas que levem em consideração a agilidade nos processos e a simplicidade na execução, levando em conta parâmetros sustentáveis seguidos pelos princípios da “química verde”, como uma alternativa aos métodos já existentes. Nesse sentido, a análise colorimétrica associada a imagens digitais tem se apresentado como uma alternativa aos métodos tradicionais. A colorimetria é uma metodologia analítica quantitativa, em que a intensidade da cor é medida por meio da absorção da luz em função do comprimento de onda. Na análise colorimétrica por meio da aquisição de fotos digitais, a imagem de uma região do compartimento que contém a amostra/padrão é adquirida pelo *smartphone* e parâmetros da imagem como as cores do sistema RGB (Red - Green - Blue) são mensuradas e relacionadas com a concentração das espécies, ou seja, são decompostas a suas cores primárias, permitindo estabelecer uma relação entre valores de intensidade e concentração do analito (TIBES *et al.*, 2014; PLÁCIDO, 2017; PHADUNGCHAROEN *et al.*, 2019).

O modelo de cor RGB é baseado na sensibilidade do olho, e utiliza um sistema cartesiano (x, y, z) em que cada uma das cores primárias (*Red*, *Green*, *Blue*) representa um dos eixos no cubo RGB. A regra universal de adição das cores primárias, vermelho, verde e azul, resulta em milhares de combinações devido a diferentes intensidades em que cada canal pode variar (0-255) (GONZALEZ & WOODS, 2011; MENESES *et al.*, 2012). Nesse sentido, é possível decodificar as diferentes intensidades das cores por meio do aplicativo PhotoMetrix PRO® (disponível gratuitamente para *smartphone*) em valores numéricos e posteriormente utilizá-los para modelos matemáticos. Além disso, para a aquisição das imagens digitais, podemos empregar os sistemas “*spot-test*” que vão de acordo com os princípios da química verde visando a minimização do uso de reagentes tóxicos, gerando, conseqüentemente, uma menor quantidade de resíduos (HELFER *et al.*, 2017). Diante do exposto, o objetivo deste trabalho foi desenvolver um método levando em consideração a aplicação de ferramentas mais econômicas, diminuindo

impactos ambientais com a geração de resíduos tóxicos, e empregando como aparato instrumental um aparelho *smartphone*.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

Desenvolver método analítico por colorimetria associada a imagens digitais para determinação de nitazoxanida em diferentes formas farmacêuticas.

2.2. Objetivos Específicos

- Otimizar as condições experimentais para o preparo das amostras de NTZ em pó para suspensão e comprimidos, juntamente com o modo de aquisição das imagens digitais.
- Validar o método desenvolvido pelos parâmetros internacionais.
- Realizar a comparação entre método proposto e método farmacopeico.

3. REVISÃO DA LITERATURA

3.1. Epidemiologia e transmissão de parasitas intestinais

Um dos principais problemas de saúde mundial a ser enfrentado é a infecção por parasitas intestinais. Parasitas como *Ascaris lumbricoides*, *Trichuris trichiura*, *Enterobius vermicularis*, *Strongyloides stercoralis*, entre outros, acometem cerca de um bilhão de pessoas ao redor do mundo, principalmente em populações consideradas em desenvolvimento. Nesse sentido, fatores como a deficiência em instalação sanitária, sistema de disposição de resíduos humanos inseguro, falta e local inadequado de abastecimento de água potável e baixo nível socioeconômico contribuem para a disseminação dos parasitas, além disso, imigrantes são potenciais propagadores entre a população local (RODRIGUES *et al.*, 2013; ZEIBIG, 2014). A geolocalização dos microorganismos intestinais é influenciada pelas condições de vida e nutricional dos hospedeiros, bem como pelas condições extrínsecas favoráveis, tais como, presença de animais e insetos, solo, esgoto de irrigação, umidade, temperatura. A virulência da infecção em humanos pode ter diferentes fatores, entre eles, idade, sexo, ocupação, localização (SILVA & DIAS, 2017).

A transmissão dos parasitas intestinais ocorre por meio da transferência da matéria fecal para a boca (transmissão fecal oral). Isso ocorre por meio da ingestão de alimentos contaminados ou água, por práticas sexuais ou mudanças de fraldas, por exemplo. Alguns parasitas podem adentrar o corpo por meio da pele, devido ao contato com solo contaminado. Outros parasitas vivem em animais, como porcos e vacas, e a contaminação ocorre através da ingestão de alimentos mal cozidos ou leite não pasteurizado. Outras formas dos microrganismos completarem seu ciclo de vida dentro do hospedeiro ocorre por meio da ingestão de alimentos vegetais contaminados, como frutas ou legumes crus, não lavados ou mal lavados (TEIXEIRA *et al.*, 2018).

O tratamento das parasitoses intestinais consiste na administração de medicamentos, no entanto, é necessário a associação com as medidas de educação preventiva e de saneamento ambiental com o propósito de mudar as práticas da população, evitando o ciclo de reinfecção por parasitas. Dentre os medicamentos amplamente utilizados para o combate dessas enfermidades podemos citar os

benzimidazóis e nitroimidazóis, tais como, albendazol, mebendazol, tiabendazol, cambendazol e metronidazol. Outro medicamento muito empregado para este intuito é a nitazoxanida, que pertence à classe dos nitrotiazóis (ROSSIGNOL, 2014).

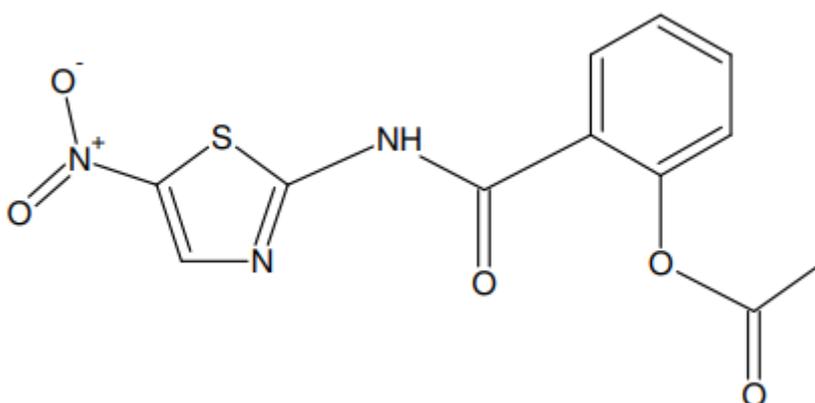
3.2. Nitazoxanida

A Nitazoxanida (NTZ) foi descrita primeiramente por Jean François Rossignol no Instituto Pasteur no ano de 1975. O fármaco pertence ao grupo dos nitrotiazóis inicialmente desenvolvido para o meio veterinário a fim de combater infecções parasitárias. A NTZ deriva da nitrotiazolil-salicilamida tendo sua ação de amplo espectro, com excelente atividade contra protozoários, bactérias, nematódeos, trematódeos e vírus (ROSSIGNOL, 2014). Após aproximadamente três décadas da sua descoberta, somente no ano de 2002, a agência reguladora *Food and Drug Administration* (FDA) aprovou a utilização do fármaco NTZ para o uso humano como antiparasitário (WHITE *et al.*, 2014; ROSSIGNOL *et al.*, 2009).

A NTZ possui características físico-químicas de pó cristalino, levemente amarelado, pouco solúvel em etanol e praticamente insolúvel em água, mas solúvel em acetonitrila. Sua estrutura química é a 2-acetiloxi-N-(5-nitro-2-tiazolil) benzamida (Figura 1), apresentando fórmula molecular $C_{12}H_9N_3O_5S$ e peso molecular 307,28 (MALESUIK *et al.*, 2010).

No Brasil, o fármaco começou a ser comercializado no ano de 2006, sob as formas farmacêuticas de comprimidos revestidos e pó para suspensão oral, com o nome comercial de ANNITA[®], fabricada pela indústria farmacêutica Farmoquímica S/A.

Figura 1: Estrutura química NTZ.



A NTZ após sua administração oral é absorvida pelo trato gastrointestinal e rapidamente hidrolisado pelas esterases plasmáticas no seu metabólito ativo, a Tizoxanida. O grupamento nitro está envolvido na inibição da enzima piruvato ferredoxina oxireductase (PFOR), via vital para estes patógenos (STOCKIS *et al.*, 2002; FAN-MINOQUE *et al.*, 2013; ROSSIGNOL *et al.*, 2014). Alguns estudos relatam que a NTZ possui atividade antiviral potente contra diversos vírus, bloqueando seletivamente a maturação da hemaglutinina viral no nível pós-traducional, inibindo sua propagação pelas células hospedeiras (ELAZAR *et al.*, 2009; ROSSIGNOL *et al.*, 2009; LA FRAZIA *et al.*, 2013; TRABATTONI *et al.*, 2016). Estudos clínicos duplo-cego randomizado realizados por ROSSIGNOL e colaboradores (2022) demonstram que a NTZ possui uma atividade contra MERS-CoV e outros coronavírus, incluindo SARS-CoV-2, no qual reduziram internações em casos leves e moderados devido a potencialização na produção de interferon alfa e beta. Porém, o mesmo estudo ressalta que o fármaco não deve ser utilizado como antiviral no tratamento de Covid 19 em pacientes graves.

3.3. Métodos para determinação da NTZ

Encontra-se disponível monografia farmacopeica para análise da NTZ em formas farmacêuticas, como também, estão descritos na literatura científica grande variedade de métodos analíticos para determinação do fármaco, como pode ser observado na Tabela 1. Um fator importante comumente citado pelos autores, que deve ser destacado, é que todos os métodos são desenvolvidos com o intuito do emprego no controle de qualidade de rotina do fármaco. Observa-se que em todos os casos, inclusive no método farmacopeico, existe uma diminuída frequência analítica, aliada a elevados tempos de análise. Neste sentido, a aplicação no controle de qualidade de rotina acarreta grande consumo de solvente, maior custo das análises e, principalmente, elevada geração de resíduos tóxicos.

Recentemente, os avanços da ciência e tecnologia permitiram a união de metodologias tradicionais, como a colorimetria associada a imagens digitais, capturadas por diferentes instrumentos, tais como, máquinas fotográficas e *smartphones*. Em análises onde há modificação de cor mediante uma reação, pode-se efetuar a captura e processamento das imagens digitais, resultando em uma

análise mais rápida, com menor custo e sem a necessidade de equipamentos complexos, como, por exemplo, o cromatógrafo a líquido (HARRIS *et al.*, 2010; SKOOG *et al.*, 2013; DE JESUS *et al.*, 2021).

Tabela 1: Compilação de métodos analíticos encontrados na literatura para análise de NTZ em formas farmacêuticas.

Método	Autores	Frequência Analítica	Tempo de Execução (min)
Espectrofotometria	Kapse <i>et al.</i> (2006)	Não informado	Não informado
CCD	Gopu <i>et al.</i> (2007)	1	8,0
CLAE	Jadhav <i>et al.</i> (2007)	1	7,5
CLAE	Rane <i>et al.</i> (2008)	1	5,7
CLAE	Malesuik <i>et al.</i> (2010)	1	4,3
Espectrofotometria	Malesuik <i>et al.</i> (2010)	1	Não informado
Eletroforese Capilar	Malesuik <i>et al.</i> (2010)	1	12,0
Cromatografia em Camada Delgada associada a densitometria	Nouruddin <i>et al.</i> (2011)	Não informado	Não informado
Espectrofotometria	Fahima <i>et al.</i> (2012)	1	Não informado
Voltametria de onda quadrada	Rajeev <i>et al.</i> (2013)	1	Não informado
CLAE	Maha <i>et al.</i> (2013)	1	5,3
CLAE	Saleh <i>et al.</i> (2014)	1	6,3
CLAE	Varum <i>et al.</i> (2016)	1	5,7
Espectrofotometria	Smita <i>et al.</i> (2017)	1	Não informado
Espectrofotometria	Ghandi <i>et al.</i> (2018)	1	Não informado
Fluorescência	Mohamed <i>et al.</i> (2022)	1	30,0
CLAE	Farmacopéia Brasileira (2019)	1	7,0

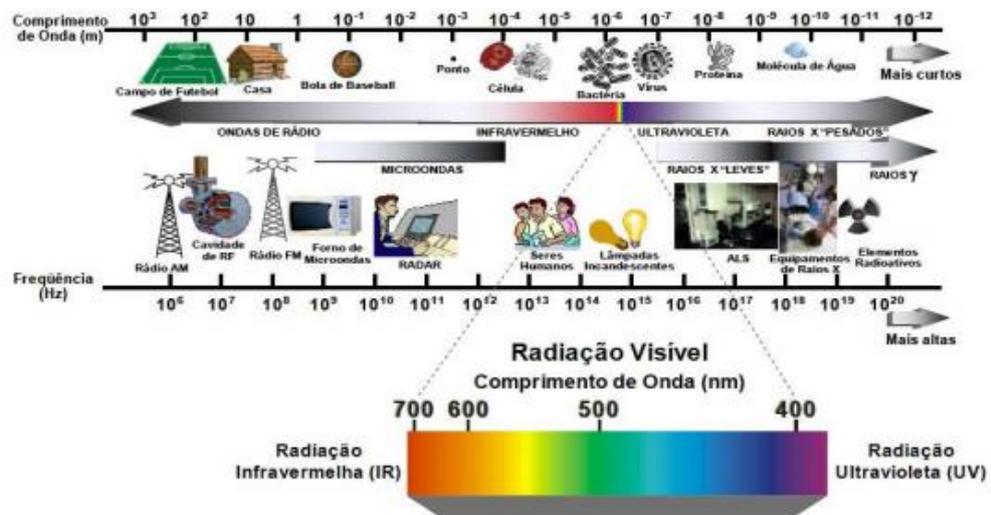
Neste sentido, a colorimetria associada a imagens digitais pode ser empregada como uma alternativa aos métodos existentes, no intuito de potencializar

fatores importantes como o tempo e a frequência analítica, diminuindo custos e geração de resíduos.

3.4. Colorimetria

A colorimetria por definição remete ao estudo da cor com a finalidade de investigar como quantificá-la e simular a percepção, e para isso leva em consideração fatores humanos. A percepção da cor possui um significado abstrato e pode ser dividida em níveis, tais como, físico, psicofísico, psicométrico e visual (WYSZECKI & STILES, 1982; FERREIRA, 2006; SCHANDA *et al.*, 2007). Segundo SCHANDA e colaboradores (2007) a identificação da cor é tratada com um processo subjetivo, pelo fato de diferentes indivíduos atribuírem características distintas para a mesma cor. Quanto aos aspectos relacionados à sensação causada pelas cores, pode ser definida por meio da faixa do espectro eletromagnético a qual o sistema visual humano é sensível e posteriormente processada pelo cérebro, no qual se estende aproximadamente de 400 a 700 nm, sendo denominada região visível (TILLEY *et al.*, 2011; CARDOSO *et al.*, 2015;), conforme a Figura 2.

Figura 2: Região visível.



Fonte: QUEIROZ & GOMES, 2006).

No domínio da física, a definição de cor não leva em consideração os aspectos perceptivos humanos, mas a diferença de frequência de dois feixes de luz. Essa diferença de frequência entre os feixes luminosos definem uma medida de “aparência de cor” para um observador (HARKNESS *et al.*, 2006). Assim, a cor

propriamente dita só existe no cérebro do observador dependendo basicamente de um pensamento minimalista formado por três condições fundamentais: 1) a fonte luminosa 2) objeto iluminado e 3) detector empregado na aquisição. A fonte luminosa escolhida deve ter a propriedade de emitir um conjunto de frequências que chegam até o objeto. O objeto reflete parte das radiações eletromagnéticas oriundas da fonte de emissão. Essa faixa de frequências modificadas pela interação luz x matéria chegam até o detector. O detector é responsável por gerar um sinal elétrico proporcional à luz incidente sobre sua superfície promovendo a conversão de energia de fótons para energia elétrica para ser medida. Essa aquisição é devido a uma perturbação promovida pelo estímulo luminoso oriundo da faixa espectral na qual o detector gera uma resposta mensurável (CROWLEY & CHRISTENSEN, 1995; SCHANDA *et al.*, 2007).

Nesse sentido, o estudo físico das cores, observando a estrutura do olho humano e como as informações são processadas se tornam importantes, pois a definição da cor pode se alterar de acordo com a fonte de luz. Além disso, as variações de percepção dependem do observador da área de cobertura pelo pigmento da cor e do plano de fundo (contraste).

3.5. Captura e transformação da imagem digital em sinal analítico

A análise química instrumental consiste na interpretação e o processamento de sinais que tem por objetivo extrair ou tornar um sinal viável para estimativas ou medidas qualitativas ou quantitativas. Essa importante área da ciência é utilizada nos mais diversos ramos profissionais, tais como, farmácia, engenharia, química, física, matemática e afins. Dependendo do instrumento analítico utilizado o sinal pode incluir distintos sistemas de detecção como sons, imagens, ondas de rádio, sinais de infravermelho, analisadores de massa, detectores que empregam detecção multicanal, entre outros. Os sinais instrumentais têm por objetivo tornar o objeto de análise mais simples e útil e assim resolver o problema abordado (ORFANIDIS *et al.*, 1988; GONZALEZ *et al.*, 2004).

3.5.1. Imagens digitais

Uma imagem é configurada pela interação e reflexão entre luz e matéria e pode ser reproduzida levando como condição principal a simulação da visão humana (LAND *et al.*, 1977; LAND *et al.*, 1983).

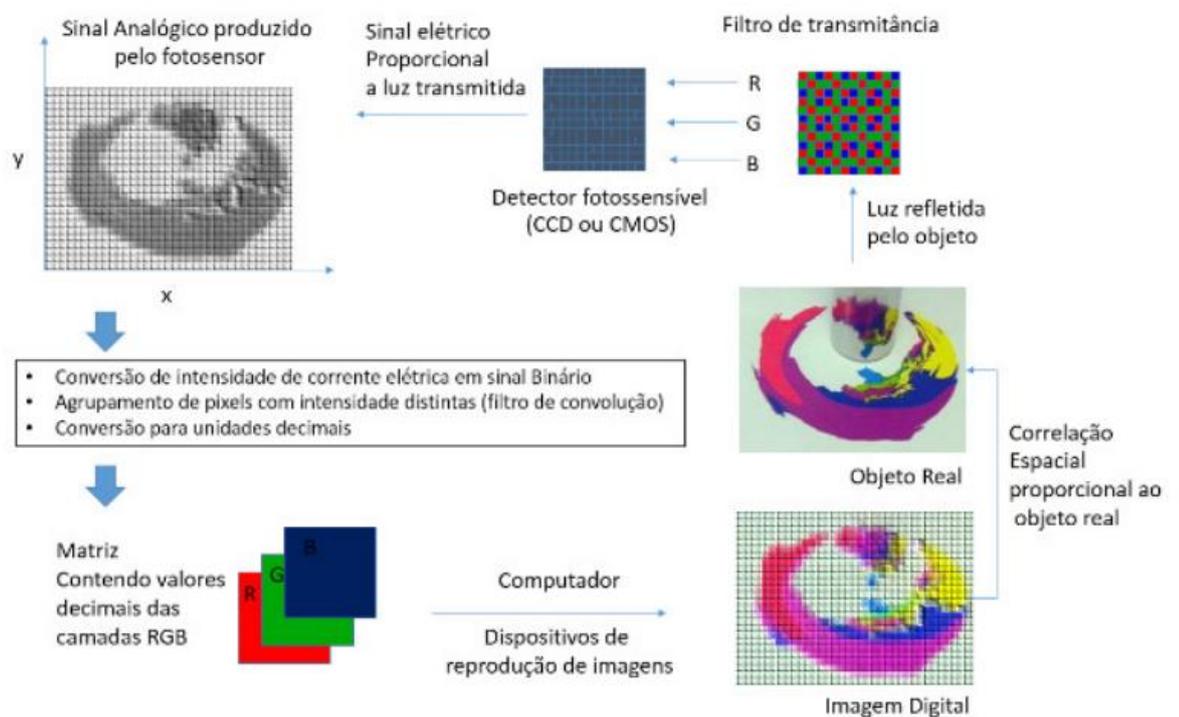
Para realizar essa tentativa de simulação da visão humana, detectores do tipo CCD (*charge-coupled device*) e CMOS (*complementary metal-oxide-semiconductor*) são utilizados para a aquisição de imagens digitais. Esses sensores são materiais semicondutores e convertem a energia fóton em energia elétrica e a resposta obtida são alinhadas em coordenadas cartesianas composto por pontos denominados pixels. Cada pixel do sensor é capaz de indicar variações na intensidade de iluminação, pela luz refletida no objeto de análise real. Quando alinhados no sistema de coordenadas x e y, em condições específicas de transmissão de luz, esses sensores transmitem como resposta uma matriz com informações relevantes da luz refletida ou absorvida pela matéria trazendo contribuições para diferentes áreas da ciência (CARLSON, 2002; OHTA, 2007; WALTHAM, 2013).

A imagem digital é um registro do fenômeno físico de espalhamento e reflexão da luz sobre um objeto. Essa luz passa por um conjunto de filtros com as cores vermelho, verde e azul agrupados na forma de mosaico e conhecido como filtro de *Bayer*. A luz após a passagem pelo filtro é atenuada antes de chegar ao detector fotossensível. Os detectores fotossensíveis empregados são constituídos por diversos pontos conhecidos como pixels. Cada ponto do detector é composto geralmente por um material semicondutor com capacidade de converter energia elétrica a luz que incide sobre a superfície de análise (CROWLEY *et al.*, 1995; CARLSON, 2002; HARKNESS, 2006; PHADUNGCHAROEN *et al.*, 2019; FAN *et al.*, 2021).

O sinal elétrico adquirido (sinal analógico) é agrupado espacialmente e a intensidade de corrente elétrica é convertida em um número binário (sinal digital). A partir das diferentes transmitâncias adquiridas para cada pixel e utilizando como base o modelo de cores vermelho, verde e azul (do inglês **Red**, **Green** and **Blue** - RGB), o sinal é convertido em unidades decimais entre 0 e 255 e alinhado em camadas (*layers*). As camadas adquiridas são equivalentes a matrizes numéricas que podem ser interpretadas por dispositivos de reprodução de imagem, conforme a Figura 3.

Portanto, o processamento da imagem captada pela câmera de um dispositivo pode ser utilizado como um analisador colorimétrico. A luz que incide sobre os sensores da câmera cria uma imagem com diferentes combinações de intensidades das cores primárias vermelho, verde e azul. Dessa forma, a imagem digital é decomposta às suas colorações primárias, que são utilizadas para estabelecer a relação entre valores e concentração do analito, empregando modelos matemáticos para a determinação de suas intensidades.

Figura 3 - Diagrama geral da aquisição de imagens digitais.



Fonte: HARKNESS *et al.*, 2006.

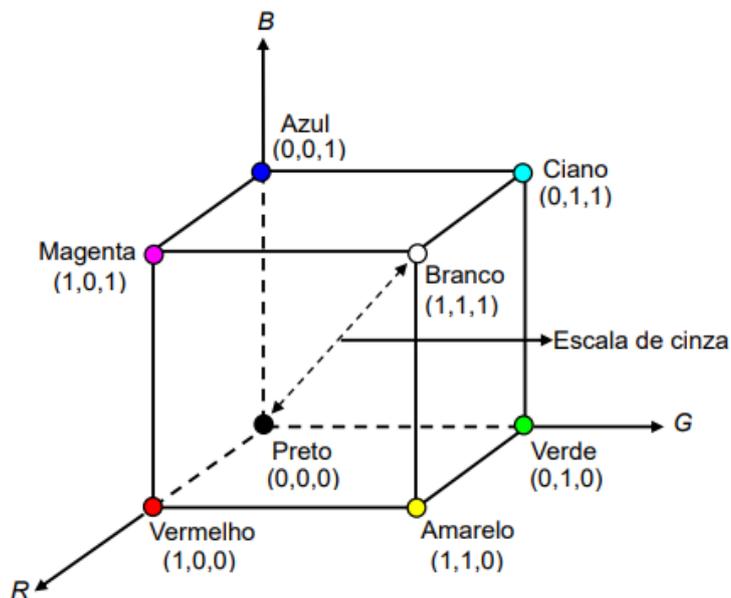
3.6. Modelo RGB

O modelo RGB é um sistema que baseia-se na teoria dos três estímulos proposta por YOUNG-HELMHOLTZ. Segundo a teoria, o olho humano é capaz de perceber as cores através da estimulação dos pigmentos visuais presentes nos cones da retina, nos quais possuem picos de sensibilidade em cada comprimento de onda, como: 730 nm (vermelho), 546 nm (verde) e 435,8 nm (azul) (RUSS, 2007; BHATIA, 2008).

As leis de Hermann Günther Grassmann, relacionadas ao conceito de adição de cores, são consideradas uma das bases para a colorimetria (TURNER *et al.*, 1996; SCALCO *et al.*, 2005):

- 1ª Lei:** a sensação de cor de qualquer espectro pode ser obtida da mistura de três cores primárias (Vermelho, Verde e Azul). Dessa forma, temos: $C = rR + gG + bB$;
- 2ª Lei:** uma cor pode ser escrita como: $C = rR + gG + bB$, então, se intensificarmos os espectros de um fator α as cores resultantes também seriam metaméricas. Ou seja, temos: $\alpha C = \alpha rR + \alpha gG + \alpha bB$.
- 3ª Lei:** duas cores podem ser escritas como: $C_1 = r_1R + g_1G + b_1B$ e $C_2 = r_2R + g_2G + b_2B$. Logo, se somarmos os espectros delas teremos uma outra cor que pode ser representada por $(r_1+r_2, g_1+g_2, b_1+b_2)$. Ou seja: $C_1+C_2 = (r_1+r_2)R + (g_1+g_2)G + (b_1+b_2)B$.

Figura 4: Representação do sistema RGB no plano cartesiano.



Fonte: DE JESUS *et al.*, 2021.

Assim sendo, uma determinada cor pode ser representada por um conjunto de triplas de números reais (r, g, b) , que suportam operações de soma e multiplicação por um valor escalar (número real). Ademais diferentes sistemas podem ser utilizados para essa decodificação das cores em modelos matemáticos, tais como RGB (*Red, Green and Blue*), CMYK (*Cyan, Magenta, Yellow and Black*), HSV (*Hue, Saturation and Value*), HLS (*Hue, Lightness and Saturation*), RYB (*Red, Yellow, and Blue*), entre outros.

No presente trabalho utilizaremos o modelo RGB que tem sua gênese na visão tricromática sobre as cores de Young (BUCHSBAUM & GOTTSCHALK, 1983). O espaço de cores RGB é um modelo aditivo que descreve as diversas combinações a partir das três cores primárias, conforme demonstrado no sistema de coordenadas cartesianas 3D (Figura 4) (BURNS, 2017).

Para determinar certa cor é usado um intervalo pré especificado, que vai de 0 a 255, sendo que a cor preta é obtida pela combinação (0, 0, 0), a branca (255, 255, 255), o vermelho (255, 0, 0), verde (0, 255, 0) e o azul (0, 0, 255). As demais cores são variações dessas cores primárias e podem ser feitas diversas combinações variando de 0 a 255 (BHATIA, 2008).

Tabela 2: Cores básicas e complementares do sistema RGB.

Cores	Canais		
	Vermelho (R)	Verde (G)	Azul (B)
Vermelho	255	0	0
Verde	0	255	0
Azul	0	0	255
Ciano	0	255	255
Magenta	255	0	255
Amarelo	255	255	0
Preto	0	0	0
Branco	255	255	255

Conforme mencionado, o modelo RGB é considerado aditivo, em que as diferentes combinações intensidades de seus canais resultam em novas cores, conforme descrito na Tabela 2.

3.7. Aplicativo PhotoMetrix PRO®

O PhotoMetrix PRO[®] é um aplicativo gratuito utilizado em *smartphones*, empregado como uma ferramenta para análise química, no qual através da decomposição de imagens é possível realizar a análise quantitativa de uma determinada amostra. O aplicativo conta com dois canais de análise das imagens obtidas, que são: o modelo RGB e derivadas deste modelo, como: matiz, saturação e valor (HSV); matiz, saturação e luminosidade (HSL); e matiz, saturação e intensidade (HSI). O aplicativo avalia os pixels de cada imagem digital baseado na intensidade das cores RGB e em modelos derivados, incluindo as combinações com o matiz (que faz a diferenciação entre vermelho e amarelo), a saturação (que diferencia a cor vermelho do rosa), e a intensidade (que distingue cores claras de escuras). Ainda, existe a opção na interface do aplicativo de realizar análises univariadas ou multivariadas (GONZALEZ & WOODS, 2008; RUSS, 2011; HELFER *et al.*, 2017; BÖCK *et al.*, 2020).

3.8. Princípios da Química Verde

A partir da necessidade de mudanças das condutas químicas, visando tanto ao controle quanto à prevenção da poluição ambiental, causada por algumas de suas atividades, é que surge a chamada Química Verde. A mesma foi conceituada por ANASTAS & WANER (1998) como: “a criação, o desenvolvimento e a aplicação de produtos e processos químicos para reduzir ou eliminar o uso e a geração de substâncias nocivas à saúde e ao ambiente”. Além disso, procura orientar e atuar na redução da produção de resíduos, incentivando a fabricação de produtos compatíveis com o ambiente (MACHADO, 2004).

Segundo ANASTAS e colaboradores (1998) os 12 princípios da química verde são guiados pela preocupação na qualidade de vida e com o meio ambiente, sendo eles:

- **1º Prevenção:** é melhor prevenir a formação de resíduos do que tratá-los posteriormente;
- **2º Economia Atômica:** os métodos sintéticos devem ser desenvolvidos para maximizar a incorporação dos átomos aos reagentes nos produtos finais;
- **3º Síntese com Reagentes de Menor Toxicidade:** sempre que possível utilizar reagentes com pouca ou nenhuma toxicidade para a saúde humana e o meio ambiente;

- **4º Desenvolvimento de Compostos Seguros:** os produtos químicos deverão ser desenvolvidos para possuírem a função desejada, apresentando a menor toxicidade possível;
- **5º Diminuição de Solventes e Auxiliares:** a utilização de substâncias auxiliares (solventes, agentes de separação, etc) deverá ser evitada quando possível ou usadas substâncias inócuas no processo;
- **6º Eficiência Energética:** os métodos sintéticos deverão ser conduzidos sempre que possível à pressão e temperatura ambientes, diminuindo seu impacto econômico e ambiental;
- **7º Uso de Matéria-Prima Renovável:** sempre que possível técnica e economicamente utilizar matéria-prima renovável;
- **8º Redução de Uso de Derivados:** uso de reagentes bloqueadores, de proteção ou desproteção, e modificadores temporários que deverão ser minimizados ou evitados quando possível, pois estes passos podem produzir subprodutos indesejáveis;
- **9º Catálise:** reagentes catalíticos (tão seletivos quanto possível) são superiores aos reagentes estequiométricos;
- **10º Desenvolvimento de Compostos Degradáveis:** produtos químicos deverão ser desenvolvidos para a degradação inócua de produtos tóxicos, não persistindo no ambiente;
- **11º Análise em Tempo Real para a Prevenção da Poluição:** as metodologias analíticas precisam ser desenvolvidas para permitirem o monitoramento do processo em tempo real, para controlar a formação de compostos tóxicos;
- **12º Química Segura para a Prevenção de Acidentes:** as substâncias utilizadas nos processos químicos deverão ser escolhidas para diminuir acidentes em potencial, tais como explosões e incêndios.

Além disso, outro fator que minimiza os impactos ambientais quando associados a análise química instrumental é a miniaturização ou “*spot test*”. No desenvolvimento de métodos analíticos a miniaturização têm como principal característica a manipulação de pequenos volumes do analito e de reagente, como consequência são procedimentos extremamente simples, rápidos e de baixo custo,

aplicáveis tanto para compostos orgânicos, como inorgânicos, e podem ser realizados em equipamentos portáteis para análises *in situ* (ZERAİK *et al.*, 2008; LUIZ *et al.*, 2013). Por este motivo, é possível associar as análises colorimétricas por meio de imagens digitais a estes sistemas miniaturizados, visando a diminuição do consumo de reagentes e aumento da frequência analítica.

Atualmente, diversos estudos em diferentes áreas têm sido publicados com a finalidade de aplicação dos princípios da química verde. Na área das ciências farmacêuticas, mais precisamente no desenvolvimento e controle de qualidade de medicamentos, diversos estudos empregam esses princípios, principalmente no intuito da diminuição da produção ou consumo de reagentes tóxicos. Em estudo realizado por SCHLOSSER e colaboradores (2020) foi desenvolvido método capaz de determinar o teor de etanol em medicamentos homeopáticos, podendo ser utilizado em análises de rotina para o controle de qualidade dessas preparações. Os autores empregaram a entalpimetria de infravermelho, monitorado por uma câmera de infravermelho. O método mostrou-se rápido, de baixo custo e com utilização reduzida de reagentes tóxicos quando comparado com o método oficial, indo de acordo com os princípios da Química Verde. Ainda em análises farmacêuticas, NOPPHARAT e colaboradores (2020) desenvolveram método capaz de quantificar cloridrato de clorpromazina em comprimidos, com o emprego da colorimetria associada a imagens digitais, utilizando como aparato instrumental um *smartphone*. Os autores aplicaram conceitos de química verde, diminuindo o consumo de reagentes, realizando as análises em sistemas miniaturizados.

Além desses, outros trabalhos preocupados com os princípios da química verde ganham destaque atualmente, tais como, o estudo proposto por EMAN e colaboradores (2022) que desenvolveram método para determinação de quatro fármacos antipsicóticos; o trabalho de DEENA e colaboradores (2022) para análise de remdesivir e favipiravir, medicamentos utilizados na terapêutica da COVID-19; e o estudo proposto por SIVA e colaboradores (2021) empregado para determinação simultânea de clorocresol e dipropionato de betametasona em formulações tópicas.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Descrição geral do método proposto

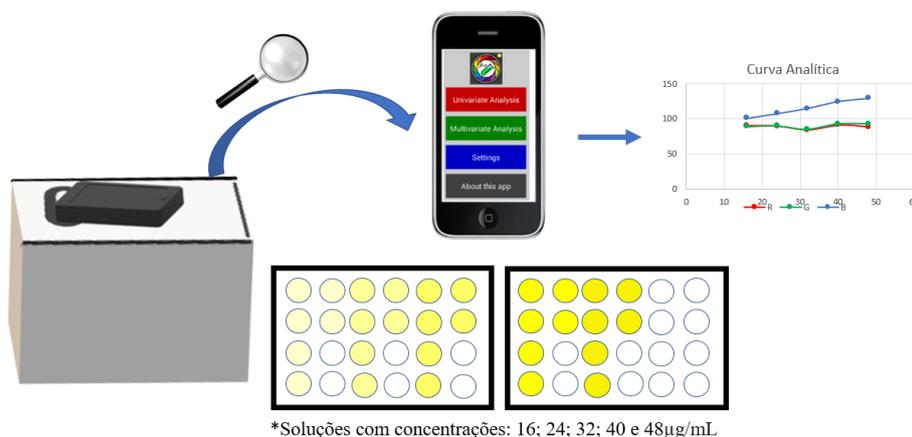
A NTZ quando colocada em meio básico, desacetila e desprotona o grupo amino do anel tiazol, formando um produto de coloração amarela. A partir da formação da coloração foi proposto um método colorimétrico que relaciona a cor com a concentração do analito, baseado na captura da imagem digital por um smartphone e decomposição do sinal analítico nos canais RGB.

Este princípio foi utilizado para desenvolver o método proposto, no qual os parâmetros relativos à reação que promove a cor, como a concentração do reagente básico, tempo de reação e proporção entre o reagente básico e o analito foram otimizados. Outros parâmetros relacionados à captura da imagem digital foram também avaliados, conforme descrito abaixo.

4.2. Aparato para aquisição das imagens digitais

As amostras foram preparadas e colocadas em placas de acrílico, utilizando micropipetas automáticas para transferência das soluções. Uma câmara escura contendo uma lâmpada LED acoplada na parte inferior da caixa foi utilizada para fornecer uniformidade de luz e garantir resultados reprodutíveis nas análises.

Figura 5: Processo para aquisição das imagens digitais.



As imagens foram capturadas utilizando *smartphone* da marca Motorola G7 PLUS® com câmera de 16MP (megapixel) com resolução de 4619 x 3464. O aparelho foi fixado à câmara escura por meio de uma abertura circular na parte

superior da caixa. O aplicativo PhotoMetrix PRO[®] foi utilizado para decompor a imagem e processá-la baseado no sistema **RGB**, a Figura 5 ilustra o processo.

4.3. Amostras, reagentes e soluções

Comprimidos revestidos contendo 500mg de NTZ (Annita[®]), fabricado pela empresa Farmoquímica S/A. (Lote: 202654, prazo de validade: 12/2022) foram adquiridos em farmácia comercial, no município de Uruguaiana/RS. Conforme consta na bula do medicamento, os excipientes que compõem o comprimido são: amido, álcool isopropílico, amidoglicolato de sódio, sorbitol, talco, estearato de magnésio, hipromelose, dióxido de titânio, Eudragit L100, água purificada, macrogol, óxido de ferro amarelo, citrato de trietila e acetona.

Pó para suspensão oral (Annita[®]) contendo 20 mg/mL de NTZ (após reconstituição), fabricado pela empresa Farmoquímica S/A (Lote: 211102, prazo de validade: 05/2023) foi adquirido em farmácia comercial, no município de Uruguaiana/RS. Conforme consta na bula do medicamento os excipientes que compõe o pó para suspensão são: benzoato de sódio, sacarose, goma xantana, celulose microcristalina, ácido cítrico, citrato de sódio diidratado, corante vermelho nº 33 e aroma de morango.

NTZ - Substância Química de Referência - SQR (Lote: 98186, data de fabricação: 01/07/2020, prazo de validade: 01/07/2026, teor \geq 98%) foi adquirida da empresa Sigma-Aldrich.

4.4. Preparo das amostras e solução padrão de NTZ

O preparo das soluções segue como descrito abaixo:

4.4.1. Preparo da solução padrão de NTZ

Foram pesados 8 mg de NTZ SQR e transferidos, quantitativamente, para balão volumétrico de 25 mL. O volume foi completado com acetonitrila (ACN) e a solução foi homogeneizada. Uma alíquota de 1 mL dessa solução foi transferida

para o balão volumétrico de 10 mL e completado o volume com água acidificada pH 4,0, obtendo-se uma solução de 32 µg/mL.

4.4.2. Preparo da amostra Nitazoxanida Comprimidos

Para o preparo da amostra foram pesados e pulverizados 20 comprimidos. Uma quantidade de pó equivalente a 8 mg de NTZ foi transferida para balão volumétrico de 25 mL, foram adicionados 15 mL de ACN e levado a banho de ultrassom durante 10 minutos. O volume foi completado com ACN e homogeneizado. Uma alíquota foi filtrada em papel filtro quantitativo. Após a filtração, 1 mL do filtrado foi transferido para balão volumétrico de 10 mL e completado o volume com água acidificada pH 4,0, obtendo-se solução com concentração teórica de 32 µg/mL.

4.4.3. Preparo da amostra Nitazoxanida Pó para Suspensão

Para o preparo da amostra de pó para suspensão foi misturada a quantidade de pó contida no conteúdo previamente pesado de três frascos e homogeneizado. Uma quantidade de pó equivalente a 8 mg de NTZ foi transferida para balão volumétrico de 25 mL, foram adicionados 15 mL de ACN e levado a banho de ultrassom durante 10 minutos. O volume foi completado com ACN e homogeneizado. Uma alíquota foi filtrada em papel filtro quantitativo. Após a filtração, 1 mL do filtrado foi transferido para balão volumétrico de 10 mL e completado o volume com água acidificada pH 4,0, obtendo-se solução com concentração teórica de 32 µg/mL.

4.4.4. Água Acidificada pH 4,0

Água acidificada pH 4,0 foi preparada a partir de água ultrapurificada e o pH ajustado com ácido clorídrico 1 M. Conforme descrito anteriormente, a NTZ foi primeiramente solubilizada em ACN. Na segunda diluição foi utilizado água acidificada pH 4,0 para atingir a concentração de trabalho (MALESUIK *et al.*, 2010

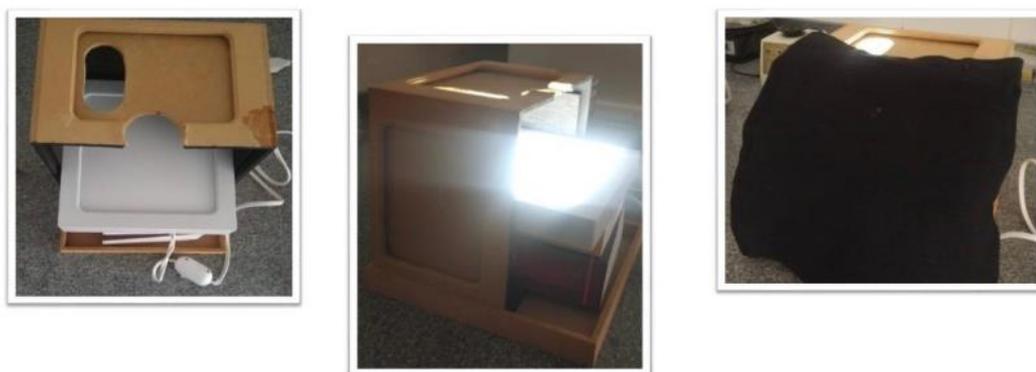
4.5. Instrumentação e reagentes

As amostras de NTZ (comprimidos e pó para suspensão) foram pesadas em balança analítica Shimadzu®, modelo AY200. O processo de homogeneização das amostras foi realizado por ultrassom da marca Unique (modelo Ultra Cleaner). O procedimento de filtração foi executado com papel filtro quantitativo. A CLAE foi empregada para a quantificação de NTZ nas amostras, conforme método descrito na Farmacopéia Brasileira 6ª edição (2019). Foi utilizado cromatógrafo à líquido marca Shimadzu®, modelo Prominence. Purificador de água Milli-Q®UV foi utilizado na produção de água purificada. Micropipetas Monocanal Labmate® Pro automáticas foram usadas em todas as etapas do desenvolvimento analítico da metodologia proposta. Todos os reagentes utilizados foram da grade analítica.

4.6. Aparato para aquisição da imagem digital segundo o método proposto

Para a aquisição do sinal analítico, uma caixa de madeira foi construída com dimensões 25 cm x 20 cm (largura x altura) contendo abertura na parte superior para acoplamento do *smartphone*.

Figura 6: Aparato instrumental para aquisição das imagens digitais.



A caixa possui um sistema com lâmpada de LED da marca Ecoforce® com potência de 16W e com três intensidades (baixa, média e alta) posicionada na parte inferior da caixa. As soluções foram adicionadas em placas de acrílico contendo 24 poços e posicionadas sobre a lâmpada LED no momento de aquisição da imagem digital. O interior da caixa foi pintado em preto com a finalidade de evitar interferência da luz externa, garantindo um ambiente homogêneo, diminuindo a

reflexão da luz e melhor captura das imagens digitais. A Figura 6 exemplifica o aparato instrumental utilizado.

4.7. Otimização dos parâmetros

A fim de garantir resultados reprodutíveis para o método proposto, testes prévios à validação foram realizados com o objetivo de buscar a melhor resposta instrumental e sensibilidade.

Os parâmetros referentes: (a) à proporção de solução de NTZ SQR em relação a solução de NaOH, (b) à concentração da solução de NaOH e (c) o volume final do poço foram avaliados de forma multivariada utilizando um planejamento de experimento do tipo *Central Composite Design* (CCD) em uma solução de NTZ SQR de 64 µg/mL, sendo a melhor condição definida por meio da análise de superfície de resposta. O planejamento do tipo CCD gerou 20 experimentos, que foram realizados de forma aleatória e com variações codificadas, conforme a Tabela 3.

Tabela 3: Variáveis codificadas pelo planejamento CCD.

Variáveis	-1,68	-1	0	+1	+1,68
Proporção de NTZ em relação ao volume final (%)	29,8	40	55	70	80,2
Concentração de NaOH (M)	0,5	0,8	1,2	1,6	1,9
Volume final no poço (mL)	0,9	1,2	1,6	2,0	2,2

Os demais parâmetros referentes à aquisição da imagem foram avaliados de forma univariada para uma solução de NTZ SQR de 32 µg/mL (solução de trabalho delimitada após avaliação da faixa linear), conforme descrito abaixo:

- Intensidade de emissão da lâmpada LED: Avaliada nos níveis baixo, médio e alto.
- Distância entre a câmera do *smartphone* e as soluções na placa de acrílico: Avaliada nas distâncias de 5, 10 e 15 cm.
- Determinação da região de interesse, do inglês *Region of Interest (ROI)*: Avaliada nas condições 8x8, 16x16, 32x32 e 64x64.

- Tempo de reação entre a NTZ e o NaOH: Avaliado nas condições 1, 2, 3, 4, 5, 10, 30 e 60 min.

Após a otimização destes parâmetros, foi possível determinar as condições analíticas ideais para o método proposto.

4.8. Condições Analíticas

As condições analíticas otimizadas neste trabalho estão descritas na Tabela 4.

Tabela 4: Condições analíticas otimizadas no método proposto.

Condição Analítica	Padronizado
Tempo	5 min
Distância	10 cm
Volume de NTZ adicionado no poço da placa de acrílico	1,0 mL
Volume de NaOH adicionado no poço na placa de acrílico	0,9 mL
Concentração de trabalho do padrão e amostras	32 µg/mL
Molaridade do NaOH	1,5

4.9. Validação do método

A validação do método proposto seguiu os critérios disponibilizados na Resolução nº 166/2017 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) e *Internacional Conference Harmonization* (ICH) de 2022, tais critérios foram:

4.9.1. Linearidade

É a capacidade do método demonstrar que o sinal analítico obtido é diretamente proporcional à concentração do analito na amostra. Para obtenção da curva de calibração, pesou-se analiticamente 8 mg de nitazoxanida SQR e transferiu-se para um balão volumétrico de 25 mL, completando-se o volume do balão com ACN, obtendo-se concentração final de 320 µg/mL. Dessa solução foram transferidas alíquotas de 0,5; 0,75; 1,0; 1,25 e 1,5 mL com auxílio de pipetas automáticas para balões volumétricos de 10 mL. Os volumes dos balões volumétricos foram completados com água acidificada pH 4,0, obtendo-se

concentrações de 16,0; 24,0; 32,0; 40,0 e 48,0 µg/mL. Foram construídas 3 curvas em dias diferentes.

O gráfico da curva de calibração foi obtido a partir da plotagem dos valores do sinal analítico *versus* a concentração de NTZ. A linearidade foi analisada a partir da obtenção do coeficiente de correlação (r) e da análise de variância (ANOVA). O tratamento dos dados foi realizado no programa Microsoft Excel® (Microsoft Corporation, EUA).

4.9.2. Efeito Matriz

Soluções mãe de NTZ comprimidos e pó para suspensão foram preparadas na concentração de 320 µg/mL em ACN. Alíquotas de 0,25 mL de ambas as soluções amostra foram transferidas para respectivos balões volumétricos de 10 mL. Em paralelo, foi preparada a solução mãe de NTZ SQR na concentração de 320 µg/mL em ACN e transferidos volumes crescentes desta solução (0,25; 0,5; 0,75; 1,0 e 1,25 mL) para os balões volumétricos, conforme descrito na Tabela 5. O volume foi completado com água acidificada pH 4,0. Outra curva, agora somente da SQR, foi preparada transferindo alíquotas da solução mãe equivalentes a 0,5; 0,75; 1,0; 1,25 e 1,5 mL para balões volumétricos de 10 mL e completado o volume com água acidificada, atingindo a mesma concentração final das curvas obtidas com as amostras. A avaliação do efeito matriz foi realizada pela análise do paralelismo das retas das amostras com a reta obtida com a SRQ nas mesmas concentrações.

Tabela 5: Preparo das curvas de pó para suspensão e comprimidos em balão volumétrico de 10 mL para avaliação do efeito matriz.

Solução de 320 µg/mL (mL)		Solução de NTZ SQR 320 µg/mL (mL)		Concentração final (µg/mL)
0,25		0,25		16
0,25		0,5		24
0,25	+	0,75	=	32
0,25		1,0		40
0,25		1,25		48

4.9.3. Precisão

A repetibilidade (precisão intra-dia) foi analisada por meio do desvio padrão relativo (DPR) obtido de seis determinações realizadas de forma independente a 100% da concentração de trabalho (32 µg/mL). A precisão intermediária (inter-dia) foi avaliada por meio do DPR entre os teores das amostras de comprimidos e pó para suspensão de análise realizada em dois dias diferentes.

O preparo das soluções padrão a fim de construir a curva de calibração para o dia do experimento e o preparo das amostras seguiu os procedimentos conforme descritos na seção 4.4.1 deste trabalho.

4.9.4. Exatidão

A exatidão foi realizada por meio do teste de recuperação. Foram preparadas soluções mãe das amostras de comprimidos, pó para suspensão e SQR na concentração de 320 µg/mL, conforme seção 4.4. Alíquotas de 0,5 mL das soluções amostra foram transferidas para respectivos balões volumétricos de 10 mL, denominados R1, R2 e R3. A cada balão volumétrico, acrescentou-se 0,25; 0,5 e 0,75 mL da solução mãe de SQR e completou-se o volume com água acidificada pH 4,0, obtendo-se concentração final de 24,0; 32,0 e 40 µg/mL de NTZ, respectivamente. Foram preparadas simultaneamente soluções amostra na concentração de 16,0 µg/mL de NTZ. O preparo das soluções para o teste de recuperação pode ser visualizado conforme esquema disposto na Tabela 6. A exatidão foi calculada como porcentagem de recuperação da quantidade conhecida do analito adicionado à amostra. Cada concentração foi preparada em triplicata.

Tabela 6: Preparo das soluções para o teste de exatidão pelo método de recuperação de padrão.

Balão volumétrico 10 mL	Volume (mL) de solução de amostra (320 µg/mL)	Volume (mL) de NTZ SQR (320 µg/mL)	Concentração final de NTZ (µg/mL)
A*	0,5	-	16
R 1	0,5	0,25	24
R 2	0,5	0,5	32
R 3	0,5	0,75	40

*Solução amostra sem adição de padrão.

A equação abaixo foi utilizada para fins de cálculo da porcentagem de padrão recuperada:

$$R\% = \frac{(C_r - C_a)}{C_{SQR}} \times 100$$

Onde:

R% = porcentagem de padrão recuperada;

C_r = concentração da solução amostra ($\mu\text{g/mL}$), com a adição da solução de SQR de nitazoxanida;

C_a = concentração da solução amostra de nitazoxanida ($\mu\text{g/mL}$) e;

C_{SQR} = concentração resultante de nitazoxanida SQR ($\mu\text{g/mL}$) adicionada à amostra.

4.9.5. Robustez

A robustez de um método pode ser definida como sua capacidade de resistir a pequenas e deliberadas variações nas condições analíticas. Neste trabalho, a robustez do método foi avaliada por meio de um planejamento fatorial do tipo CCD utilizando o software Design Expert[®]. Os parâmetros para avaliação da robustez foram os mesmos utilizados na otimização da metodologia (concentração do reagente NaOH, proporção entre o reagente NaOH e a solução de NTZ e o volume no final do poço) porém com uma variação em uma faixa mais estreita, conforme delineamento descrito na Tabela 7:

Tabela 7: Variáveis codificadas pelo CCD.

Variáveis	-1,68	-1	0	+1	+1,68
Proporção de NTZ em relação ao volume final (%)	49	50	51	52	53
Concentração de NaOH (mol/L)	1,42	1,45	1,5	1,55	1,58
Volume final do poço (mL)	1,83	1,86	1,9	1,94	1,97

A análise da superfície de resposta gerada a partir do experimento foi utilizada para determinar o “domínio de robustez”, ou seja, determinar para quais

condições o sinal analítico é mais suscetível a variações e a influência entre estes parâmetros.

Além da avaliação da robustez para os parâmetros descritos acima, foi avaliado a influência no sinal analítico referente a aquisição da imagem por um *smartphone* da mesma marca, porém com resolução da câmera digital com configuração semelhante daquele utilizado no desenvolvimento do método proposto (*smartphone* da marca Motorola G7 PLAY® com câmera de 16MP e resolução de 4163 x 3122).

4.10. Determinação do teor das amostras pelo método farmacopeico

A fim de comparar com o método proposto, o método oficial por CLAE descrito na Farmacopéia Brasileira 6ª edição (2019) foi utilizado para determinação do teor das amostras de comprimidos e pó para suspensão de NTZ. Os dados foram analisados pelo teste TOST (Minitab® - versão disponível para Windows) para avaliar a equivalência entre os métodos.

As principais condições analíticas do método farmacopeico estão descritas na Tabela 8.

Tabela 8: Condições cromatográficas para determinação de NTZ definidas pela Farmacopéia Brasileira 6ª Edição (2019).

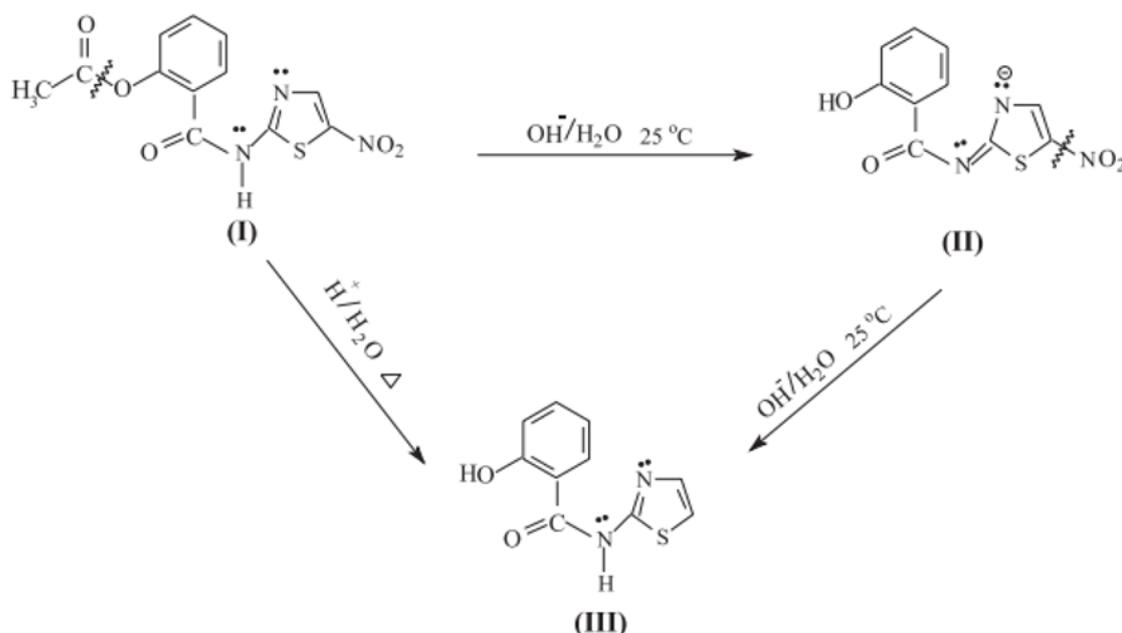
Parâmetro	Descrição
Fase móvel	Ácido ortofosfórico 0,1% (V/V) pH 6,0 com trietilamina : acetonitrila (45:55, V/V)
Fluxo	1,0 mL/min
Coluna	Phenomenex® Synergi Fusion C18 (250 x 4,6 mm, 4 µm)
Pré-coluna	C18 (4,0 x 3,0 mm, 4 µm)
Deteção	240 nm
Temperatura	25 °C
Volume injetado	20 µL

5. RESULTADO E DISCUSSÃO

5.1. A reação colorimétrica

Estudos realizados por EL-DESOKY e colaboradores (2010) demonstraram o comportamento da NTZ frente a condições ácidas e básicas, conforme descrito na figura 9. A estrutura I representa a NTZ na sua forma íntegra. Quando colocada em meio básico ($\text{pH} > 7$) ocorre a desacetilação e desprotonação do grupo amino do anel tiazol, formando um produto de coloração amarelo-alaranjado (II). Essa estrutura com o tempo e concentração dos reagentes perde o grupo nitro ligado ao anel tiazol e forma a estrutura III, incolor. Portanto, a reação entre a nitazoxanida e o NaOH proporciona a formação de um composto colorido, fato que levou a estudos sucessivos para verificar se a intensidade da cor desenvolvida estava relacionada à concentração do fármaco em solução.

Figura 7: Comportamento do fármaco frente a condição ácida e básica.



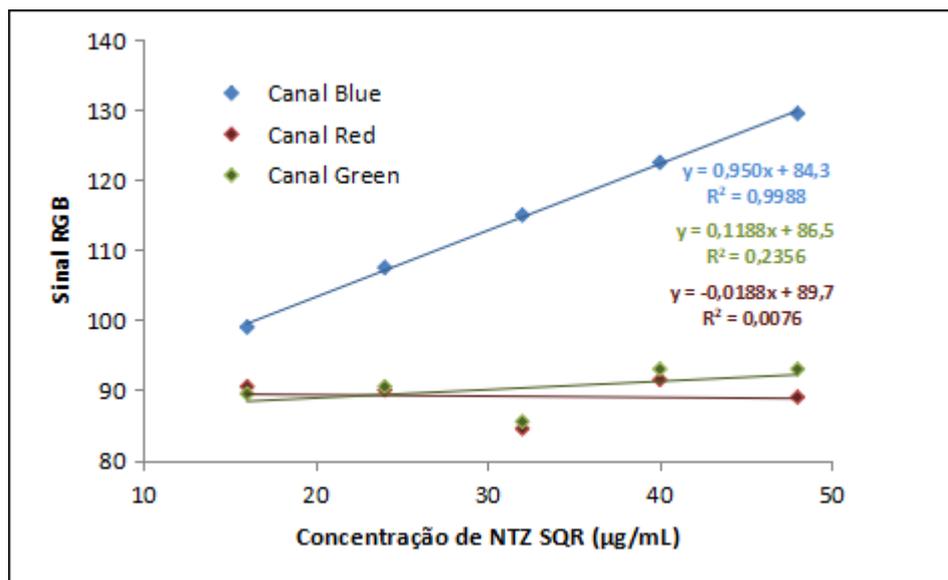
Fonte: EL-DESOKY (2010).

5.2. Escolha do canal RGB

As curvas analíticas para os canais RGB foram realizadas a partir do método colorimétrico envolvendo a reação entre o fármaco e o NaOH, e as leituras realizadas através do PhotoMetrix PRO[®] para diferentes concentrações. A Figura 8 demonstra as curvas para 5 concentrações de NTZ SQR na faixa de 16 - 48 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Para isso foi monitorado o sinal analítico dos 3 canais (R, G e B) a fim de analisar

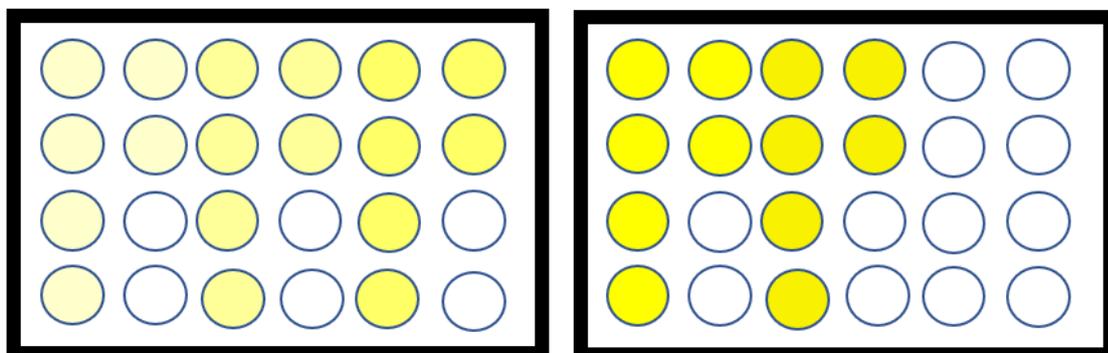
qual possui progressão do sinal de acordo com a proporcionalidade da concentração do fármaco. Percebe-se que o canal B apresentou uma relação linear entre o sinal obtido e as concentrações testadas. Nesse sentido, a equação linear foi descrita por $Y = 0,950x + 84,3$ e o coeficiente de correlação de $r = 0,9993$.

Figura 8: Curvas de calibração para os canais R, G e B de soluções de NTZ SQR nas concentrações de 16 a 48



A Figura 9, exemplifica o processo da formação da cor de acordo com as diferentes concentrações de NTZ SQR nos poços da placa de acrílico, realizadas em seis réplicas. Na figura, é perceptível que com o aumento da concentração há um aumento da coloração amarela, resultante da reação envolvida com o NaOH.

Figura 9: Coloração da NTZ SQR em diferentes concentrações.

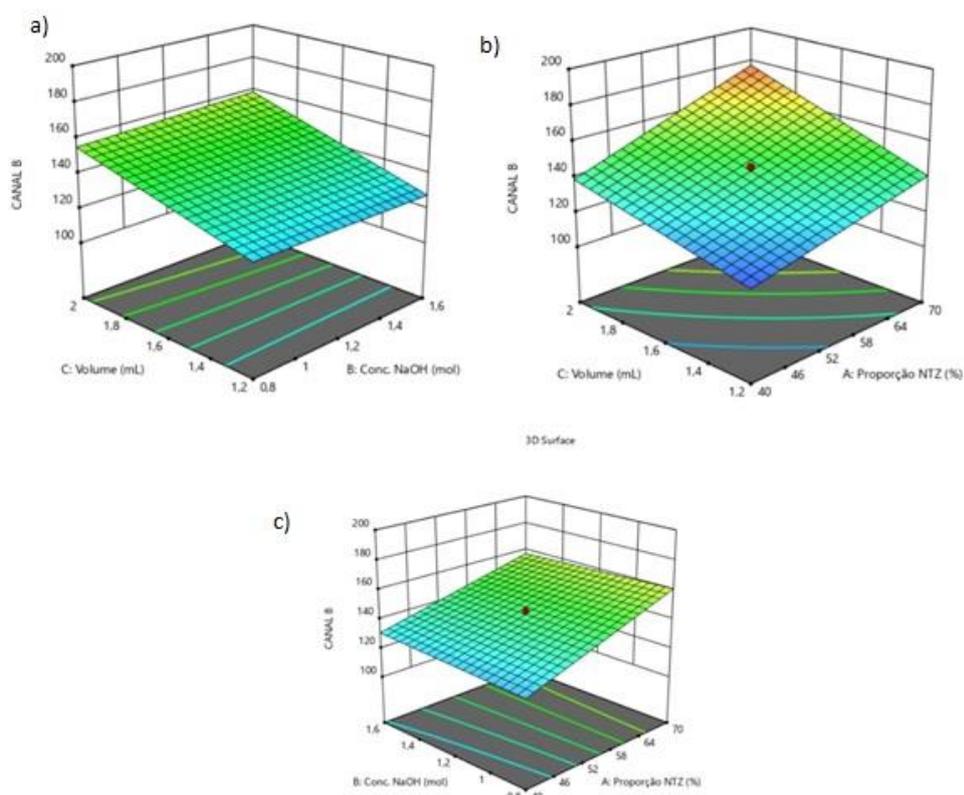


*Soluções com concentrações: 16; 24; 32; 40 e 48µg/mL

5.3. Otimização dos parâmetros

Por se tratarem de condições quantitativas, as condições experimentais referentes a proporção entre NTZ e NaOH no poço, concentração do NaOH utilizado para promover a reação colorimétrica e o volume final do poço foram otimizadas por meio de análise multivariada. A otimização ocorreu por meio de delineamento experimental do tipo CCD para os três fatores acima elencados. O delineamento CCD permite obter condições ideais que maximizam o sinal analítico, analisando de forma interligada os fatores do modelo multivariado. Os resultados foram avaliados utilizando gráficos de superfície de resposta, gerados a partir dos pontos máximos do sinal analítico.

Figura 10: Superfícies de resposta obtidas na otimização dos parâmetros.



O cálculo das coordenadas do ponto máximo é adequado para a identificação de condições ótimas, pois é neste ponto que é observado o sinal analítico máximo. O modelo matemático que descreve os dados apresentou a seguinte equação: $y = 143,70 + 15,54 A + 0,4703 B + 14,49 C - 2,28 AB + 3,70 AC + 1,30 BC$

Onde:

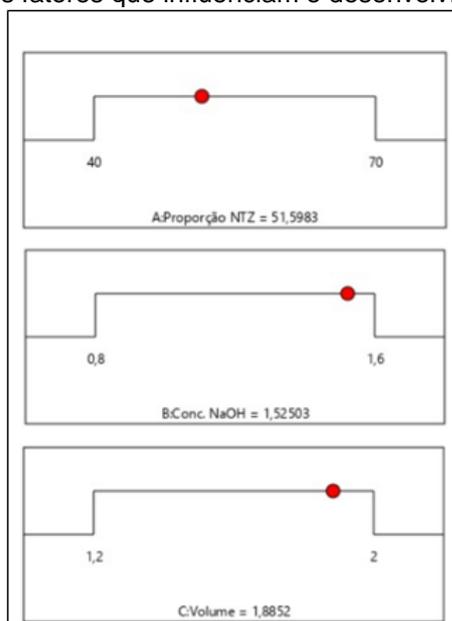
A - proporção de NTZ;

B - Concentração de NaOH e;

C - Volume Final.

Na figura 10a, está disposto o gráfico de superfície de resposta para as condições experimentais de dois fatores: concentração de NaOH *versus* Volume Final. Percebe-se que de acordo com o aumento do volume final no poço, há uma maximização do sinal analítico sendo positivo para a nossa análise. Na figura 10b, encontra-se a influência dos fatores “Proporção de NTZ *versus* Volume Final”. No mesmo sentido que a figura 10a, tanto para o aumento do volume final quanto para o aumento da proporção de NTZ, o sinal analítico potencializa. Para quantidades menores de volumes e do fármaco, o sinal analítico não tem sua maximização, o que pode ser atribuído à dificuldade de formação do composto colorido na reação. Já na figura 10c, observa-se que o fator “concentração de NaOH” não é responsável por alterações no sinal analítico, já a proporção de NTZ provoca um aumento do sinal, conforme a concentração adicionada no poço. Portanto, a variação na concentração de NaOH não demonstrou influência na aquisição do sinal analítico, nas condições estudadas. Uma possível explicação para o ocorrido é que, nas concentrações testadas para o meio básico não houve alteração das condições que produzem o composto II (Figura 7).

Figura 11: Otimização dos fatores que influenciam o desenvolvimento do método.



Após a avaliação da influência dos fatores de modo multivariável, o software disponibiliza as melhores condições otimizadas de acordo com o designado, no caso, a maximização do sinal analítico, conforme demonstrado na Figura 11.

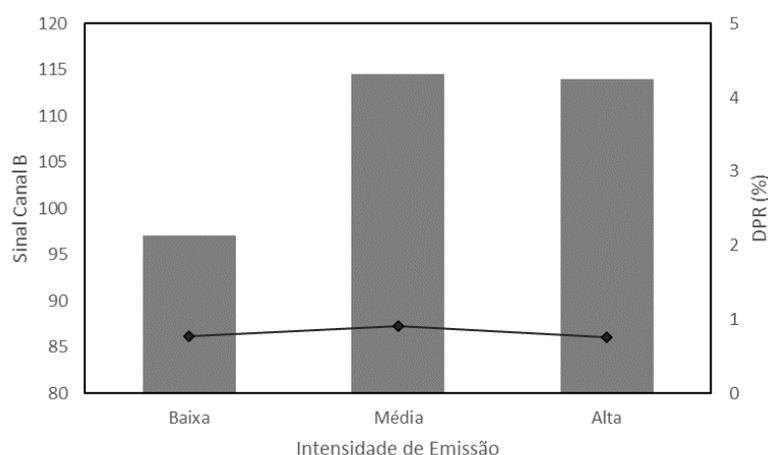
Portanto, as condições experimentais otimizadas foram: proporção de NTZ (52%), concentração de NaOH (1,5 M) e volume final do poço (1,9 mL). Isto equivale dizer que, em cada poço foi colocado 1 ml de solução de NTZ e 0,9 mL de solução de NaOH 1,5 M.

Após a definição das condições acima descritas, o qual estão relacionadas à formação da cor na reação, outros fatores relacionados à aquisição do sinal digital foram otimizados, como intensidade de emissão da lâmpada, distância do *smartphone* à superfície do poço, tempo necessário para aquisição do sinal analítico e região de coleta do sinal (ROI, do inglês, “*Region of Interest*”).

Para a otimização dos parâmetros, foi utilizado uma solução de 32 µg/mL nas seguintes condições: adicionando no poço 1 mL de solução de NTZ SQR 32 µg/mL e 0,9 mL de NaOH 1,5M. Todos os experimentos foram feitos em triplicata e a aquisição da imagem digital foi coletada seis vezes para o canal B.

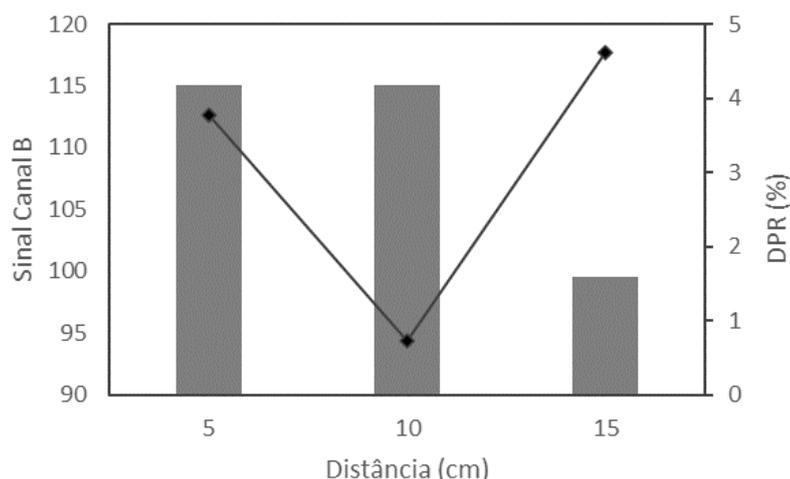
A caixa possui um sistema com lâmpada de LED da marca Ecoforce com três intensidades (baixa, média e alta) inserida na parte inferior para garantir uniformidade na coleta de sinal. A análise das intensidades da lâmpada na aquisição do sinal analítico (solução de NTZ SQR de 32 µg/mL) mostrou que a intensidade alta produziu resultados reprodutíveis, dispensando o uso do *flash* da câmera do *smartphone*, conforme demonstrado na Figura 12.

Figura 12: Análise do fator intensidade de emissão da luz.



Outro fator analisado foi a distância entre o *smartphone* e a placa de acrílico contendo solução de NTZ SQR de 32 µg/mL. Para isso, foram testadas as distâncias de 5cm, 10cm e 15cm, conforme demonstrado na Figura 13.

Figura 13: Análise univariada do fator distância.



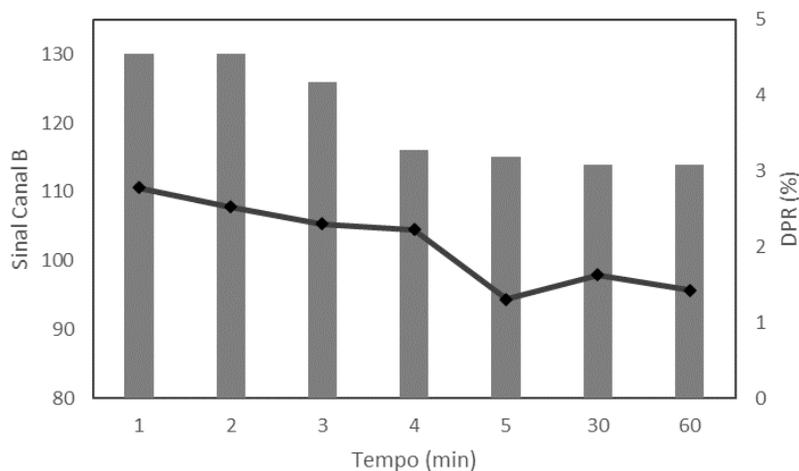
Observou-se que na distância de 15cm houve variação no sinal analítico com DPR > 4%, isso pode ter ocorrido devido à captura da imagem das bordas da placa de acrílico, o que acarreta em maior instabilidade nas imagens digitais. Para a distância de 5cm, devido à proximidade entre a placa e o aparelho móvel, o ajuste de foco foi um fator que impossibilitou análises reprodutíveis com sinais adequados. A distância de 10cm foi adequada para aplicação no método proposto, pois apresentou menor DPR entre as medidas. Vale ressaltar que esse é um parâmetro para o aparelho utilizado neste estudo, e que cada *smartphone* possui características técnicas que possibilitam uma qualidade na imagem digital diferenciada. Estudos realizados por Barreto *et al.* (2020) Maroubo *et al.* (2021) conduzido com aparatos instrumentais semelhante ao utilizado neste trabalho (caixa para controle de luminosidade e *smartphone*), demonstrou que distâncias maiores que 10 cm e menores que 5 cm apresentaram variações no sinal analítico.

O tempo de reação envolvendo a NTZ e o NaOH foi otimizado por meio da coleta de sinal analítico em diferentes tempos (1 - 60 min) para uma solução de NTZ SQR de 32µg/mL, conforme Figura 14.

A olho nu foi observado que a reação colorimétrica ocorria de forma instantânea e permanecia sem modificações durante todo o período de tempo testado, porém quando coletado o sinal RGB foi observado uma instabilidade no

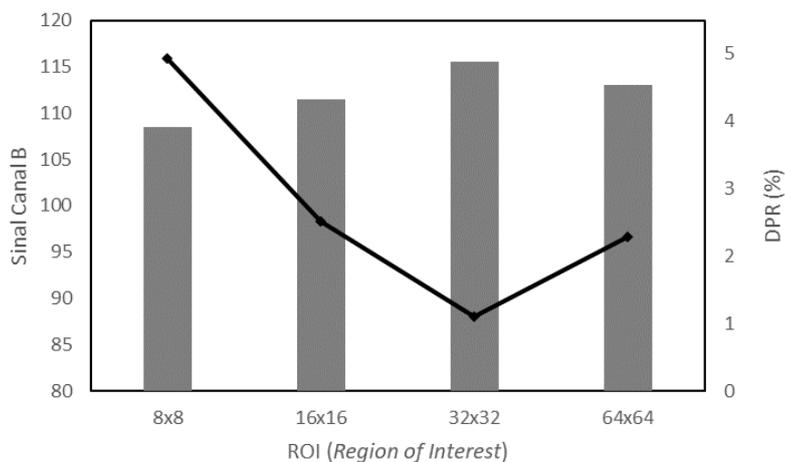
sinal durante os quatro primeiros minutos decorridos, estabilizando-se a partir do quinto minuto e permanecendo constante até 1 hora. Portanto, a condição otimizada foi de 5 min para a captura das imagens digitais.

Figura 14: Análise do fator tempo.



O PhotoMetrix PRO[®] é um aplicativo que proporciona diferentes configurações para melhor aquisição das imagens digitais, uma delas é a ROI. A ROI delimita diferentes raios, em diferentes dimensões, para que se capture a imagem exatamente no ponto de melhor incidência da cor envolvida na reação, permitindo que não haja interferência das bordas do poço de acrílico. As seguintes configurações de ROI foram testadas: 8 x 8, 16 x 16, 32 x 32 e 64 x 64. A variação do sinal analítico pode ser observada na Figura 15.

Figura 15: Análise do fator ROI.



Com essa análise foi observado que os raios 8x8 e 16x16 não permitiram uma boa definição da imagem digital, o que acarreta perda de sensibilidade da

câmera, não diferenciando o sinal em diferentes concentrações do analito. Isso pode estar relacionado à capacidade de definição dos pixels do Motorola G7 Plus (1080 x 2270) em não distinguir imagens em alta definição e em pequenas dimensões. Já a configuração de 64 x 64 abrange uma área maior, incluindo as bordas da placa de acrílico, ocorrendo uma distorção e uma menor sensibilidade da imagem digital frente às diferentes concentrações. Portanto, a escolha da ROI foi de 32 x 32, pois nesta configuração o sinal analítico foi reprodutível e com sensibilidade adequada.

5.4. Validação do método proposto

A validação do método analítico foi realizada segundo os critérios estabelecidos pelos guias oficiais (ICH, 2022; ANVISA, RDC 166/2017), conforme os seguintes parâmetros: linearidade, efeito matriz, precisão, exatidão e robustez.

5.4.1. Linearidade

Em métodos analíticos a linearidade visa quantificar a resposta instrumental relacionada a concentração do analito, de modo que essas variações sejam perceptíveis ao método desenvolvido em questão, de acordo com a proporcionalidade aplicada (ANVISA, 2017).

No presente trabalho, o estudo da linearidade foi realizado por meio da curva analítica de soluções de NTZ SQR, nas concentrações de 16, 24, 32, 40 e 48 µg/mL. A equação da reta obtida ($y = 0,950x + 84,3$) apresentou coeficiente de correlação (r) de 0,999.

Tabela 9: Análise de Teste de Variância ANOVA

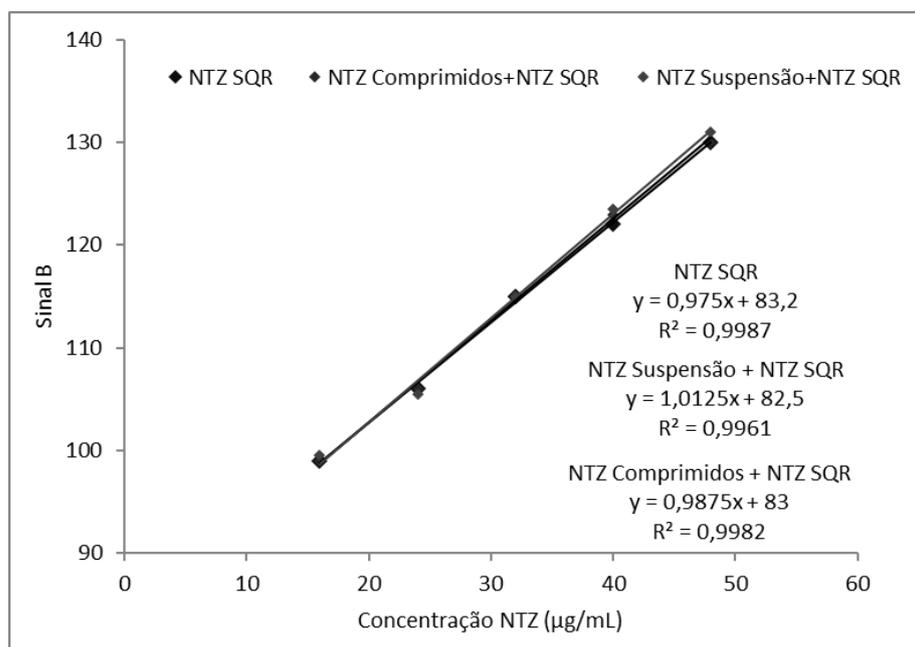
Fontes de Variação	GL	SQ	Variância	F (calc.)	p (5%)	p (1%)
Entre Concentrações	4	1756,8	439,2	381,92	3,48	5,99
Regressão Linear	1	1748,03	1747,03	1519	4,96	10,04
Desvio da Linearidade	3	8,8005	2,9335	2,551	3,71	6,55
Dentro (resíduos)	10	11,5000	1,15000			
Total	14	1768,3				

A análise de variância (ANOVA) foi aplicada para avaliar a significância da regressão, bem como, se existe desvio da linearidade. Como pode ser observado na Tabela 9, os valores de F obtidos demonstraram a presença de regressão linear sem desvio de linearidade para a faixa de concentração proposta, num nível de significância de 5%.

5.4.2 Efeito Matriz

O efeito matriz é um teste exigido pelos guias de validação de métodos analíticos que visa garantir que os componentes da amostra não causem interferência na quantificação do analito. Portanto, o efeito matriz tem por objetivo verificar a seletividade do meu método frente aos componentes que estão na amostra, no caso de medicamentos, os excipientes, ocasionando um aumento ou diminuição da aquisição do sinal analítico (ANVISA, 2017).

Figura 16: Avaliação do efeito matriz pelo paralelismo das retas.



Nesse sentido, o parâmetro foi realizado por meio da comparação do gráfico das curvas de calibração da SQR de NTZ, com aquelas empregando as amostras de NTZ em comprimidos e pó para suspensão, conforme Tabela 5. As curvas obtidas da SQR e das respectivas amostras foram avaliadas por meio do paralelismo das retas e da inclinação das curvas, indicando presença ou ausência da interferência da matriz.

A figura 16 demonstra as inclinações avaliadas por meio dos coeficientes angulares das equações das curvas analíticas realizadas tanto do padrão de NTZ, quanto das suas respectivas formas farmacêuticas. Nesse caso, percebe-se que as inclinações das três curvas não houve divergência significativa, ou seja, não há interferência da matriz na aquisição do sinal e conseqüentemente na quantificação das amostras, isso é possível observar graficamente por meio do paralelismo das retas.

5.4.3. Precisão

A precisão tem como objetivo analisar a dispersão dos dados entre ensaios independentes, repetidos de uma mesma amostra, em condições pré estabelecidas. Há três maneiras de expressá-la: por meio da repetitividade, da precisão intermediária e da reprodutibilidade, sendo no desvio padrão relativo à forma mais comum avaliar (ANVISA, 2017).

Tabela 10: Resultado da Repetibilidade e Precisão Intermediária.

	Repetibilidade*			
	NTZ Comprimidos		NTZ Pó para Suspensão	
	Teor (%)	DPR (%)	Teor (%)	DPR (%)
Dia 1	102,96	1,20	102,96	1,20
Dia 2	100,67	1,22	101,49	1,68
Precisão Intermediária**	101,81	1,21	102,22	1,44

*Média de 6 determinações em triplicata;

**Média dos resultados obtidos nos dois dias diferentes

Para a realização da repetibilidade as condições analíticas estipuladas pelos guias são as seguintes: mesmo procedimento de medição, mesmo operador,

mesmo instrumento usado sob mesmas condições estabelecidas e o mesmo local. Já para as condições analíticas da precisão intermediária devem ser realizados da seguinte forma: diferentes analistas, diferentes equipamentos ou diferentes dias de análise, porém sob as mesmas concentrações e número de réplicas (BRASIL, 2017).

A precisão do método foi demonstrada pela repetibilidade (intra-dia) e precisão intermediária (entre-dias). O valor experimental obtido para a determinação da NTZ de nas amostras analisadas no mesmo dia, sob as mesmas condições experimentais, foi de 102,96% para comprimidos e 102,96% para pó para suspensão. Nas análises realizadas no segundo dia obteve-se 100,67% para comprimidos e 101,49% para pó para suspensão, respectivamente (Tabela 10). Os desvios padrão obtidos (< 2%) confirmam a adequada precisão do método analítico.

5.4.4. Exatidão

Os guias de validação de métodos analíticos definem a exatidão como o grau de concordância entre um valor medido e um valor considerado verdadeiro (ANVISA, 2017).

Nesse sentido, a exatidão foi realizada por meio da fortificação da amostra em nove determinações, dentro do intervalo da linear do método analítico, ou seja, 3 concentrações: baixa, média e alta. Foram utilizadas amostras de NTZ (comprimidos e pó para suspensão) com a concentração fixada em 16 µg/mL e adicionadas de concentrações conhecidas de padrão, como pode ser visualizado nas Tabela 11 e 12.

Tabela 11: Resultados obtidos para o teste de recuperação realizado em amostra de comprimidos.

Amostra	Concentração da amostra (µg/mL)	Concentração de padrão adicionado (µg/mL)	Concentração recuperada (µg/mL)*	Recuperação média (%)*	DPR (%)
R1	16	8	23,24	96,19	0,26
R2	16	16	32,02	99,10	0,65
R3	16	24	40,80	100,84	0,23

*média da triplicata.

Tabela 12: Resultados obtidos para o teste de recuperação realizado em amostra de pó para suspensão.

Amostra	Concentração da amostra (µg/mL)	Concentração de padrão adicionado (µg/mL)	Concentração recuperada (µg/mL)*	Recuperação média (%)*	DPR (%)
R1	16	8	24,01	97,32	0,70
R2	16	16	32,02	97,55	0,65
R3	16	24	40,80	99,57	0,40

*média da triplicata.

Com o resultado das médias de cada um dos 3 níveis de concentração preparados e analisados em triplicata, a exatidão foi calculada como a porcentagem de fármaco recuperado a partir de amostras testes. Conforme tabela 9 e 10, o método proposto baseado em colorimetria apresentou exatidão, com uma média de recuperação do padrão entre 96,19% a 100,84% para comprimidos e 97,32% a 99,57% para pó para suspensão.

5.4.5. Robustez

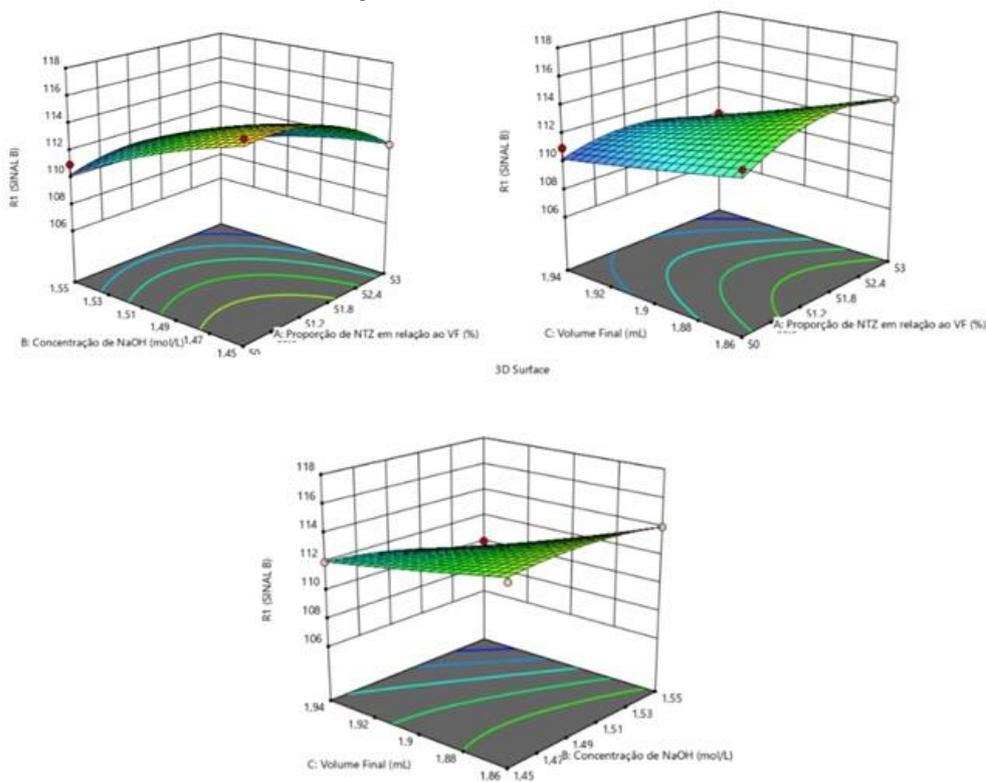
A robustez tem como finalidade avaliar a susceptibilidade de um método analítico a pequenas e deliberadas alterações nas condições experimentais (ANVISA, 2017). Neste trabalho, a robustez foi avaliada por meio de um desenho experimental do tipo CCD, conforme descrito no item 4.9.5.

A Figura 17 mostra as superfícies de respostas geradas para os parâmetros avaliados. A equação que descreve o modelo matemático para os dados experimentais foi: $+114,5-0,4893 A-1,40B-1,113C+0,6250AB-0,6250AC-0,6250BC-1,35A^2$. As letras representadas na equação correspondem a: A - proporção de NTZ; B - Concentração de NaOH e C - Volume Final.

Na avaliação da robustez, por meio da análise de gráficos de superfície de resposta é possível determinar quais parâmetros possuem potencial condição de alterar o método proposto. Nesse sentido, é possível observar que o sinal analítico não sofreu alterações em função das modificações testadas, devido principalmente ao formato plano apresentado pelos gráficos. Entretanto, o modelo matemático fornecido pelo *software* estabelece os coeficientes e o impacto (positivo ou negativo) dos mesmos. Nesta perspectiva, o fator "A" (proporção de NTZ em relação ao

volume final do poço), causou a menor influência no modelo. Desta forma, é possível afirmar que, mesmo diante da maior influência deste fator na otimização dos parâmetros do método analítico, na avaliação de uma faixa estreita de variação, este parâmetro se mostrou robusto.

Figura 17: Superfícies de resposta obtidas no desenho experimental por CCD para avaliação da robustez.



Com este estudo foi possível determinar o “domínio de robustez” como sendo: (a) proporção de NTZ, de 49 a 53%; (b) concentração de NaOH, de 1,42 a 1,58 mol/L e (c) volume final no poço de 1,83 a 1,97 mL.

A fim de avaliar um parâmetro relacionado à aquisição da imagem, a robustez foi também testada para um smartphone diferente daquele utilizado no desenvolvimento do método. Os dois smartphones possuem a seguinte configuração da câmera digital: (a) smartphone Moto G7 Plus®, resolução de 4619 x 3464 e (b) smartphone Moto G7 Play®, com resolução de 4163 x 3122. As imagens digitais foram coletadas e decodificadas pelo sistema RGB e analisado o teor das amostras comprimido e pó para suspensão, na concentração de trabalho de 32µg/mL. A Tabela 13 mostra o teor e o DPR para as amostras testadas:

Tabela 13: Determinação da concentração de NTZ em comprimidos e suspensão utilizando dois smartphones

	NTZ Comprimidos	NTZ Suspensão
	Teor (%)	Teor (%)
Moto G7 Plus	94,09	101,05
	97,34	97,81
	100,66	97,81
	106,04	101,05
	102,78	101,05
	101,69	104,29
Moto G7 Play	98,58	97,96
	96,39	97,96
	97,48	96,87
	100,78	99,06
	99,68	100,15
	95,29	97,97
Média	99,23	99,42
DP	3,39	2,14
DPR	3,42	2,15

Em relação a avaliação do sinal obtido a partir de diferentes *smartphones*, Kanong e colaboradores (2021), observou que houve diferença no sinal analítico para três aparelhos distintos. Este fato se deve às especificações técnicas relacionadas à qualidade da câmera que cada aparelho possui. No presente trabalho, foram produzidas as curvas de calibração relativas a cada *smartphone*, as quais apresentaram equações distintas ($Y = 0,968x + 83,8$ e coeficiente de correlação $r = 0,998$ para o Moto G7 Plus e $Y = 0,956x + 109,5$ e coeficiente de correlação $r = 0,998$ para o Moto G7 Play). Apesar dessa diferença, ambos aparelhos foram capazes de determinar a concentração das amostras e o DPR entre as medidas não foi maior que 3,5%. Este valor foi considerado adequado para o

parâmetro robustez, visto que os smartphones possuem configurações diferentes da câmera digital.

5.4.6. Comparação entre método proposto x farmacopeico

Com o objetivo de estabelecer uma comparação entre o método desenvolvido e o farmacopeico, realizou-se análise estatística comparativa no intuito de avaliar se existe semelhança entre os resultados obtidos pelos mesmos. Foram preparadas seis soluções amostra de comprimidos e pó para suspensão e analisadas por ambos os métodos. Na Tabela 14 estão apresentados os resultados obtidos. Posteriormente, os dados foram analisados pelo teste TOST (Minitab® - versão disponível para Windows) para avaliar a equivalência entre os métodos. Os resultados obtidos podem ser visualizados nas figuras 18 e 19.

Tabela 14: Resultados dos teores de NTZ empregando método colorimétrico associado a imagens digitais e CLAE.

Amostra	Pó para suspensão		Comprimidos	
	Teor (%) método proposto	Teor (%) método CLAE	Teor (%) método proposto	Teor (%) método CLAE
1	98,34	95,14	95,37	97,94
2	98,48	95,45	99,40	95,87
3	100,87	98,29	93,83	97,56
4	101,88	103,50	101,82	97,09
5	101,81	96,64	99,40	96,21
6	98,58	97,24	96,97	97,16
Média	99,99	97,71	97,79	96,97
DPR	1,71	3,06	2,95	0,79

Segundo a análise realizada pelo teste TOST, em um intervalo de confiança de 95%, podemos afirmar que existe equivalência entre os resultados encontrados para quantificação de NTZ em comprimido e pó para suspensão pelo método proposto e o método farmacopeico. Essa análise permite afirmar que os métodos são equivalentes e podem ser intercambiáveis, para determinação do teor de NTZ nas formas farmacêuticas de comprimidos e pó para suspensão oral. Neste

sentido, o método proposto se torna uma ferramenta útil para análise de rotina do fármaco nas formas disponíveis comercialmente, principalmente devido a rapidez nas determinações e alta frequência analítica, proporcionando agilidade nas análises de rotina.

Figura 18: Teste TOST para avaliação da equivalência entre os métodos na determinação de NTZ em pó para suspensão.

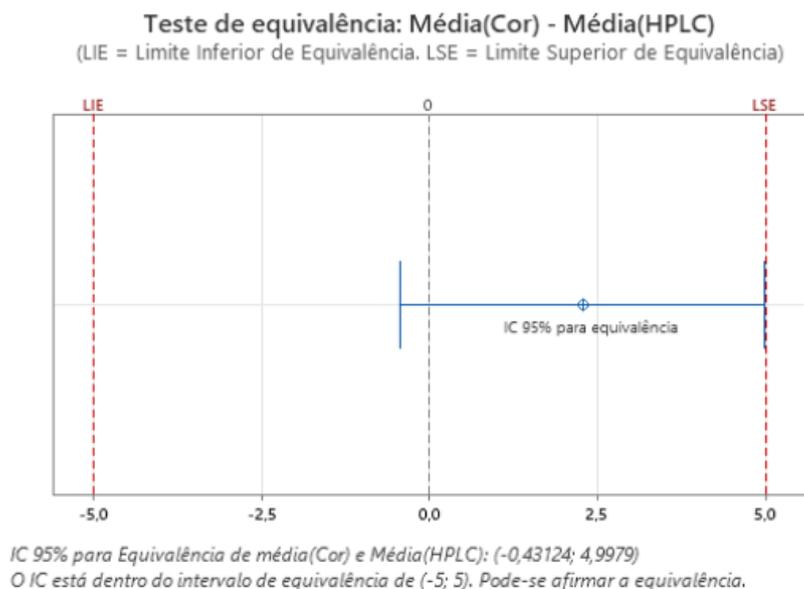
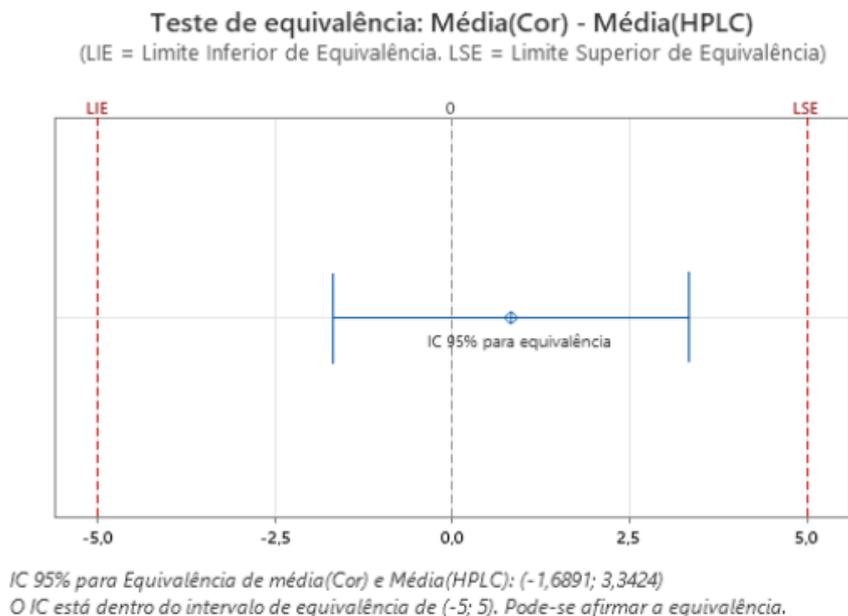


Figura 19: Teste TOST para avaliação da equivalência dos métodos para determinação de NTZ em comprimidos.



Segundo a análise realizada pelo teste TOST, em um intervalo de confiança de 95%, podemos afirmar que existe equivalência entre os resultados encontrados para quantificação de NTZ em comprimido e pó para suspensão pelo método proposto e o método farmacopeico. Essa análise permite afirmar que os

métodos são equivalentes e podem ser intercambiáveis, para determinação do teor de NTZ nas formas farmacêuticas de comprimidos e pó para suspensão oral. Neste sentido, o método proposto se torna uma ferramenta útil para análise de rotina do fármaco nas formas disponíveis comercialmente, principalmente devido a rapidez nas determinações e alta frequência analítica, proporcionando agilidade nas análises de rotina.

Além disso, o método por colorimetria associado a imagens digitais é mais econômico, de fácil aplicação/manuseio, requer um menor tempo de análise e, conseqüentemente, gera menor quantidade de resíduo, indo de encontro a alguns princípios da química verde, conforme exemplificado na Tabela 15.

Tabela 15: Comparação entre as principais características de cada método.

Método	Tempo de análise (min)	Frequência Analítica	Uso de solvente orgânico	Uso de solvente inorgânico	Valor do Equipamento
CLAE	7	1	***	*	***
Proposto	5	30	*	***	*

*: baixo; **: médio, ***: alto.

6. CONCLUSÃO

- O método desenvolvido por colorimetria associada a imagens digitais, nas condições experimentais estabelecidas, mostrou-se linear, seletivo, preciso, exato e robusto para análise quantitativa de NTZ em comprimidos e pó para suspensão oral;
- O método desenvolvido e validado possui significativas vantagens quando comparado aos métodos convencionais, tais como, aplicação de sistema miniaturizado, facilidade de operação, baixo custo, rapidez e, conseqüentemente, diminuição do uso de reagentes tóxicos e geração de resíduos, indo de encontro aos princípios da química verde;
- A análise comparativa entre o método por colorimetria associada a imagens digitais e o método cromatográfico farmacopeico demonstrou não haver diferença estatisticamente significativa, sendo caracterizada a equivalência entre os mesmos;
- Os resultados obtidos neste estudo demonstram que o método desenvolvido e validado por colorimetria associada a imagens digitais pode ser empregado para determinação do teor de NTZ no controle de qualidade de rotina de comprimidos e pó para suspensão oral.

7. REFERÊNCIAS

ANASTAS, P. T.; WARNER, J. Green Chemistry: Theory and Practice, **Oxford University Press**: Oxford, 1998.

(ANISA) Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução da Diretoria Colegiada, **RDC nº 166, de 24 de julho de 2017**. Diário Oficial da União [Internet]. Brasília, DF: Ministério da Saúde 2017. Disponível em: https://www.in.gov.br/materia/-/asset_publisher/Kujrw0TZC2Mb/content/id/19194581/do1-2017-07-25-resolucao-rdc-n-166-de-24-de-julho-de-2017-19194412. Acesso em: 28 NOV. 2021.

BARRETO, J. A. et al. Pressure variation in-syringe dispersive liquid-liquid microextraction associated with digital image colorimetry: Determination of cobalt in food samples. **Microchemical Journal**, v. 157, p. 105064, 2020.

BHATIA, P. K. Computer Graphics. 2. ed. [S.l.]: I.k. **International Pvt. Ltd**, 2008. 400 p. ISBN 9788189866730.

BÖCK, Fernanda C. et al. PhotoMetrix and colorimetric image analysis using smartphones. **Journal of chemometrics**, v. 34, n. 12, p. e3251, June 2020.

BYRNE & HILBERT, "Color realism and color science," Behav. **Brain Sci.**, vol. 26, no. 1, pp.3–21, 2003.

BUCHSBAUM & GOTTSCHALK, "Trichromacy, opponent colours coding and optimum colour information transmission in the retina," **Proc. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.**, vol. 220, no. 1218, pp. 89–113, 1983.

BURNS, "Subtractive Color Mixture Computation," **ArXiv Prepr.** ArXiv171006364, 2017.

CARDOSO *et al.* A Análise multivariada de imagens na química: um experimento para determinação do pH de águas potáveis. **Química Nova** v. 38, n. 6, p. 836–841, 2015.

CARLSON, B. S. Comparison of modern CCD and CMOS image sensor technologies and systems for low resolution imaging. **IEEE COMPUTER SOCIETY**, 1st, 2002, Orlando. Proceedings... [S.l.]: IEEE Press, 2006. Disponível em: <<http://ieeexplore.ieee.org/stamp/stamp.jsp?arnumber=1037011>>. Acesso em: 28 mar. 2022.

CROWLEY, J. L.; CHRISTENSEN, H. I. Vision as process: basic research on computer vision systems. **Berlin; New York: Springer-Verlag**, 1995.

DE JESUS, *et al.* Applications of smartphones in analysis: Challenges and solutions. In: Smartphone-Based Detection **Devices. Elsevier**, p. 199-248, 2021.

DEENA *et al.* Novel environment friendly TLC-densitometric method for the determination of anti-coronavirus drugs "Remdesivir and Favipiravir": Green

assessment with application to pharmaceutical formulations and human plasma
Microchemical Journal, 2022. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.microc.2021.107101>

EL-DESOKY, H. *et al.* Stripping Voltammetric Method for Determination of the Antiparasitic Drug Nitazoxanide in Bulk Form, Pharmaceutical Formulation and Human Serum. **Journal Brazilian Chemistry Society**. 2010. DOI: <https://doi.org/10.1590/s0103-50532010000400013>

ELAZAR *et al.* The anti-hepatitis C agent nitazoxanide induces phosphorylation of eukaryotic initiation factor 2 α via protein kinase activated by double-stranded RNA activation. **Gastroenterology Journal**, 137:1827–1835. doi:10.1053 /j.gastro.2009.07.056. 2009.

EMAN, A. *et al.* Two new HPLC methods, assessed by GAPI, for simultaneous determinations of four antipsychotics in pharmaceutical formulations: a comparative study. **Separations**, 2022.

FAN, Yajun *et al.* Digital image colorimetry on smartphone for chemical analysis: A review. **Measurement**, v. 171, p. 108829, Feb. 2021.

FERREIRA, “Confiabilidade metrológica e validação de procedimentos espectroradiométricos para medição de fontes luminosas,” Mestre em metrologia, **Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro**, Rio de Janeiro, Brasil, 2006.

FAHIMA, A. *et al.*, Development and Validation of a Simple and Rapid UV Spectrophotometric Method for Assay of Nitazoxanide in Pharmaceutical Dosage Forms. **Bangladesh Pharmaceutical Journal**, 2012.

FAN-MINOQUE *et al.* A c-Myc activation sensor-based high throughput drug screening identifies an anti-neoplastic effect of Nitazoxanide. **Mol Cancer Ther.** 12(9): 1896–1905. 2013.

Farmoquímica S / A. Anitta® 500 mg. Rio de Janeiro. 2016.

FDA Guidance for Industry: Quality considerations for continuous manufacturing. February 2019. <https://www.fda.gov/regulatory-information/search-fda-guidance-documents/qualityconsiderations-continuous-manufacturing>. [Acessado em: 03/05/2022].

GANDHI, *et al.* Application of Multivariate Calibration Methods for Simultaneous Determination of Drugs in Fixed Dose Combination. **Asian Journal of Pharmaceutical Analysis**, 2018.

GILLES, H. M., HOFFMAN, P. S. Treatment of intestinal parasitic infections: a review of nitazoxanide. **Trends parasitol.** 2002; 18: 95 – 97.

GONZALEZ, R. C.; WOODS, R. E.; EDDINS, S. L. Digital image processing using MATLAB. Upper Saddle River: **Pearson Prantice Hall**, 2004.

GONZALEZ, R. C, WOODS, R. E. Digital Image Processing. 3rd ed. New Jersey: **Pearson Prentice Hall**; 2008.

GONZALEZ, R. C., WOODS, R. E., Processamento Digital de Imagens. 3.ed., Editora **Pearson Education** - Br. São Paulo, 2011.

GOPU, C. L. *et al.* A validated stability indicating HPTLC method for determination of nitazoxanide. **Journal Science Ind.** Res.66:141–145 (2007).

HARKNESS, N. The colour wheels of art, perception, science and physiology. **Optics & Laser Technology**, v. 38, n. 4/6, p. 219-229, June 2006.

HARRIS, Daniel C. Quantitative chemical analysis. **Macmillan**, 2010.

HELPER *et al.* Photometrix: An application for univariate calibration and principal components analysis using colorimetry on mobile devices. **Journal of the Brazilian Chemical Society** , v. 28, n.2, p. 328-335, 2017.

ICH, In: International Conference on Harmonization of Technical requirements for registration of pharmaceuticals for human use, Validation of analytical methods: text and methodology Q2(R1). ICH Steering Committee, Switzerland, 2022.

JADHAV, A. S. *et al.* A validated stability indicating RP-LC method for nitazoxanide, a new antiparasitic compound. **Chromatographia** 66:595–600 (2007).

KANONG, R. *et al.* Smartphone-based technique for the determination of a titration equivalence point from an RGB linear-segment curve with an example application to miniaturized titration of sodium chloride injections. **Talanta**. Vol, 233. 2021.

KAPSE, G. K. *et al.* Spectrophotometric methods for the estimation of nitazoxanide in pharmaceutical formulations. **Indian Journal Pharmaceutical Science** 68:403–406 (2006).

PLÁCIDO, M. K. Avaliação do uso de imagens digitais obtidas por smartphones para determinação de amônia total em água. (2017) **Universidade de Brasília – Trabalho de Conclusão de Curso**.

LAFRAZIA *et al.*, 2013. Thiazolidines, a new class of antiviral agents effective against rotavirus infection, target viral morphogenesis, inhibiting viroplasm formation. **Journal Virol** 87:11096–11106. doi:10.1128/JVI.01213-13.

LAND, E. H. The retinex theory of color vision. **Scientific American**, v. 237, n. 6, p. 108- 128,1977.

LAND, E. H. Recent advances in retinex theory and some implications for cortical computations: color vision and the natural image. **Proceedings of the National Academy of Sciences United States of America**, v. 80, n. 16, p. 5163-5169, 1983.

LUIZ, V. H. M. *et al.* Rapid determination of furosemide by combined spot test/diffuse reflectance spectroscopy to detect doping in sport. **Microchemical Journal** v.109, p. 68–72 , jul. 2013.

MACHADO, A. A. S. C. Química e Desenvolvimento Sustentável - QV, QUIVES, QUISUS. Boletim da **Sociedade Química Portuguesa**, n. 95, p. 56-67, 2004.

MAHA *et al.* Validated Stability Indicating RP-HPLC for Quantitation of Nitazoxanide in Presence of Its Alkaline Degradation Products and Their Characterization by HPLC-Tandem Mass Spectrometry. **Journal of Chromatographic Science**, 2013.

MAROUBO, L. A.; PEDRINA, G.; MELCHERT, W. R. Total sulfonamides determination in bovine milk using smartphone-based digital images. **Microchemical Journal**, v. 170, p. 106657, 2021.

MALESUIK *et al.* Development of a simple, rapid and validated spectrophotometric method for nitazoxanide in pharmaceutical formulations and comparasion with HPLC. **Química Nova**, 2010.

MENESES, P. R.; ALMEIDA, T. D. Introdução ao Processamento de Imagens de Sensoriamento Remoto. Universidade de Brasília, Brasília, 2012, 266 p.

MOHAMED, A. *et al.* A specific turn-on flurescence probe for determination of nitazoxanide based on feasible oxidation reaction with hypochlorite: Applying cobalt ferrite nanoparticles for pre-concentration and extraction of its metabolite from real urine samples. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**. Vol, 219. 2022.

MOTA, K. C.P. *et al.*, Distribution and risk factors of Ascarididae and other geohelminths in the soil of Uberlandia, Minas Gerais, Brazil. *Rev Inst Med Trop São Paulo*. 2018;60:e17. DOI:10.1590/s1678-9946201860017.

NOPPHARAT *et al.* Ion pair extration coupled with digital image colorimetry as a rapid and green platform for pharmaceutical analysis: An example of chlorpromazine hydrochloride tablet assey. **Talanta**. 2020.

NOURUDDIN *et al.* Validated stability indicating methods for determination of nitazoxanide in presence of its degradation products. **Journal of Pharmaceutical Analysis**, 2011.

OHTA, J. Smart CMOS image sensors and applications. Boca Raton: **CRC Press**, 2007.

ORFANIDIS, S. J. Introduction to signal processing. **New York: McGraw Hill**, 1988.

PHADUNGCHAROEN *et al.* Smartphone-based Ellman's colourimetric methods for the analysis of D-penicillamine formulation and thiolated polymer [Periódico] // **International Journal of Pharmaceutics**. – Thailand: Elsevier, 2019. – Vol. 558. – pp. 120-127.

RAJEEV J. *et al.* Voltammetric quantitation of nitazoxanide by glassy carbon electrode. **Journal of Pharmaceutical Analysis**, 2013.

RANE, V.P. *et al.* Stability-indicating LC determination of nitazoxanide in bulk drug and in pharmaceutical dosage form. **Chromatographia** 67:455–459 (2008).

RODRIGUES *et al.* Infecção por helmintos gastrintestinais: perfil de crianças em escola públicas e privadas no sertão paraibano. **News Lab**. 2013. 186:128-36.

ROSSIGNOL, J.F. *et al.* Thiazolides, a new class of anti-influenza molecules targeting viral hemagglutinin at the post-translational level. **Journal Biol Chem** 284:29798-29808. doi:10.1074/jbc.M109.029470. 2009.

ROSSIGNOL, J.F. Nitazoxanide: a first-in-class broad-spectrum antiviral agent. *Antiviral Res* 110:94–103. doi:10.1016/j.antiviral.2014.07.014. 2014.

ROSSIGNOL, J.F. Nitazoxanide, a new drug candidate for the treatment of Middle East respiratory syndrome coronavirus, **J.Infect.Public Health**. (2016) 227230, <https://doi.org/10.1016/j.jiph.2016.04.001>.

ROSSIGNOL *et al.* A randomized double-blind placebo-controlled clinical trial of nitazoxanide for treatment of mild or moderate COVID-19. **eClinical Medicine part of THE LANCET Discovery Science**. Vol, 45. 2022.

RUSS, J. C. *The Image Processing Handbook*. 5. ed. [S.l.]: CRC Handbook Published in Cooperation with IEEE Press, 2007. 817 p. ISBN 978-0849325168.

RUSS, J. C. *The Image Processing Handbook*. 6th ed. Boca Raton: CRC Press; 2011.

SALEH, *et al.* A Validated High Performance Liquid Chromatographic (HPLC) Assay for Nitazoxanide in Bulk and in Pharmaceutical Formulations. **Current Pharmaceutics Analysis**, 2014.

SANTOS, M. C., *et al.* Environmental Factors Influencing The Transmission of *Haemonchus contortus*. **Veterinary Parasitology**, v. 188, s.1, p.277-84. 2012.

SCALCO, *Introdução a computação gráfica*. **Roberto Scalco**, 2005.

SCHANDA, *Colorimetry: understanding the CIE system*. **John Wiley & Sons**, 2007.

SCHLOSSER, K. *et al.* A green method for determination of ethanol in homeopathic medicines using thermal infrared enthalpimetry. **Annals of the Brazilian Academy of Sciences**, 2020. DOI: 10.1590/0001-3765202020181307.

SILVA, L. J., DIAS, M. E. Detecção de *Giardia lamblia* em exames parasitológicos de fezes: avaliação comparativa de resultados em laboratório de análises clínicas de rede privada e pública. **Rev Saud UniToledo**. 2017;1(1):147-156

SIVA *et al.* Eco-friendly and green chromatographic method for the simultaneous determination of chlorocresol and betamethasone dipropionate in topical formulations using Box-Behnken design. **Journal of the Iranian Chemical Society**. 2022. <https://doi.org/10.1007/s13738-021-02388-5>.

SKOOG, *et al.* Fundamentals of analytical chemistry, **Cengage Learning**, Michigan, 9th ed., 2013.

SMITA *et al.* Simultaneous determination of Nitazoxanide and Ofloxacin in pharmaceutical preparations using UV-spectrophotometric and high performance thin layer chromatography methods. **Arabian Journal of Chemistry**, 2017.

STOCKIS, A. *et al.* Nitazoxanide pharmacokinetics and tolerability in man during 7 days dosing with 0.5 g and 1 g b.i.d. **Int Journal Clinical Pharmacology Ther** 40:221–227. doi:10.5414/CP40221. 2002.

TEIXEIRA, A. G. S. *et al.* OS EFEITOS DO SANEAMENTO BÁSICO PRECÁRIO PARA O AUMENTO DA ASCARIS LUMBRICOIDES. **Revista Brasileira de Pesquisa em Ciências da Saúde**, v. 5, p. 34-40, 2018.

TRABATTONI *et al.* Thiazolidines elicit anti-viral innate immunity and reduce HIV replication. **Sci Rep** 6:27148. doi:10.1038/srep27148. 2016.

TIBES C. M. S. Aplicativo móvel para prevenção e classificação de úlceras por pressão. - **São Carlos** : [s.n.], 2014.

TILLEY, R. J. D. Colour and the Optical Properties of Materials – An Exploration of the Relationship Between Light, the Optical Properties of Materials and Colour. 2. ed. **Wes Sussex, United Kingdom: John Wiley & Sons, Ltd**, 2011.

TURNER, “The origins of colorimetry: What did Helmholtz and Maxwell learn from Grassmann?,” in Hermann Günther Graßmann Referências Bibliográficas 127 (1809–1877): Visionary Mathematician, Scientist and Neohumanist Scholar, Springer, 1996, pp. 71–86.

VARUN *et al.* Development and validation of rp-hplc method for the determination of nitazoxanide and ofloxacin in combined pharmaceutical dosage forms. **Indian Research Journal of Pharmacy and Science** 2016.

WALTHAM, N. CCD and CMOS sensors. In: HUBER, M. C. E. *et al.* (Ed.). **Observing photons in space**. 2nd ed. London: Springer, 2013. Chap. 23, p. 423-442. (ISSI scientific report series, v. 9).

WHITE AC. Nitazoxanide: a new broad spectrum antiparasitic agent. **Expert Rev Anti-infect Ther**. 2014; 2(1): 43 – 50.

WYSZECKI & STILES, Color science, vol. 8. **Wiley New York**, 1982.

ZEIBIG E. **Parasitologia Clínica: uma abordagem clínica-laboratorial**. 2.ed. Elsevier, 2014. 392p.

ZERAIK *et al.* Desenvolvimento de um Spot Test para o Monitoramento da Atividade da Peroxidase em um Procedimento de Purificação. **Quim. Nova** v. 31, n. 4, p. 731–734, 2008.