

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPIRITO SANTO
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E ENGENHARIAS - CCAE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS**

LARISSA ATAIDE SIQUEIRA

**DESENVOLVIMENTO FARMACOTÉCNICO DE SUSPENSÃO ORAL
RECONSTITUÍDA CONTENDO COMPLEXO FURAZOLIDONA:β-
CICLODEXTRINA**

ALEGRE-ES

2018

LARISSAATAIDE SIQUEIRA

**DESENVOLVIMENTO FARMACOTÉCNICO DE SUSPENSÃO ORAL
RECONSTITUÍDA CONTENDO COMPLEXO FURAZOLIDONA:β-
CICLODEXTRINA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Veterinárias do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Espírito Santo, como requisito para obtenção do Título de Mestre em Ciências Veterinárias, linha de pesquisa em Diagnóstico e Terapêutica das Enfermidades Clínico-Cirúrgicas.

Orientadora: Prof.(a) Dr.(a): Janaína Cecília Oliveira Villanova Konishi

Co-orientador: Prof. Dr. Marcos Santos Zanini

ALEGRE-ES

2018

Dados Internacionais de Catalogação-na-publicação (CIP)
(Biblioteca Setorial Sul da Universidade Federal do Espírito Santo, ES, Brasil)

Siqueira, Larissa Ataide, 1990-
S618d Desenvolvimento farmacotécnico de suspensão oral
 reconstituída contendo complexo furazolidona: β -Ciclodextrina
 /
 Larissa Ataide Siqueira. - 2018.
 77 f. : il.

Orientadora: Janaína Cecília Oliveira Villanova Konishi.
Coorientador: Marcos Santos Zanini.
Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) –
Universidade Federal do Espírito Santo, Centro de Ciências
Agrárias e Engenharias.

1. Leishmaniose. 2. Medicamentos veterinários. 3. Análise
espectral. I. Konishi, Janaína Cecília Oliveira Villanova. II. Zanini,
Marcos Santos. III. Universidade Federal do Espírito Santo.
Centro de Ciências Agrárias e Engenharias. IV. Título.

CDU: 619

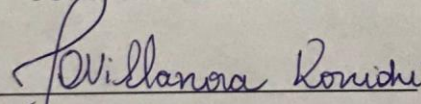
LARISSA ATAIDE SIQUEIRA

**DESENVOLVIMENTO FARMACOTÉCNICO DE SUSPENSÃO ORAL
RECONSTITUÍDA CONTENDO COMPLEXO FURAZOLIDONA:β-
CICLODEXTRINA**

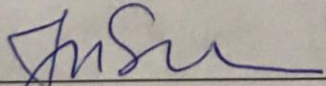
Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias do Centro de Ciências Agrárias e Engenharias - CCAE, da Universidade Federal do Espírito Santo, como requisito para obtenção do Título de Mestre em Ciências Veterinárias, linha de pesquisa em Diagnóstico e Terapêutica das Enfermidades Clínico-cirúrgicas.

Aprovado em 20 de Novembro de 2018.

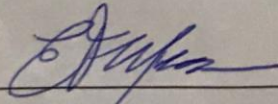
COMISSÃO EXAMINADORA



Prof (ª). Dr (ª). Janaína Cecília Oliveira Villanova Konishi
Universidade Federal do Espírito Santo - UFES
Orientadora



Prof (ª). Dr (ª). Juliana Aparecida Severi
Universidade Federal do Espírito Santo – UFES
Examinador Interno



Prof. Dr. Eduardo Frizzera Meira
Universidade Federal do Espírito Santo - UFES
Membro Externo

A Deus, minha família e amigos.

AGRADECIMENTOS

À **Deus** pela minha vida, pela minha saúde, minha família, meus amigos, meus estudos, pelas oportunidades de aprendizado e por todo o caminho percorrido até aqui.

Aos meus pais **Creusa Ataíde** e **Dailton Siqueira**, que, entendendo ou não, apoiaram-me todo o tempo, me dando amor, atenção e carinho. Se hoje estou aqui, sou eternamente grata a vocês.

Ao meu noivo, **Roberto Sobreira**, por todo apoio e paciência nos momentos mais difíceis, amo você.

A minha orientadora, **Janaína**, pela confiança, orientação, amizade, compreensão e revisão crítica.

Ao meu co-orientador **Marcos Santos Zanini** pelo apoio e confiança no meu trabalho.

A todos os colegas de trabalho do departamento de Agronomia, pela convivência, colaboração e compreensão da minha ausência e falta de atenção em determinadas épocas.

Aos colegas **Suzana Carvalho**, **Maria Paula Debona** e **Carlos Marchiorio** por todo o auxílio prestado na parte experimental, vocês foram fundamentais na realização deste trabalho.

Ao Programa de Ciências Veterinárias, meus sinceros agradecimentos

A todas as pessoas que sempre me incentivaram, me deram forças, ouviram-me, me acompanharam, brigaram comigo, me ajudaram e que, de alguma maneira tornaram real este momento da minha vida.

Nunca diga “não posso”. Levante-se, respire, sorria e siga a diante; se você lutar pelo que quer, cedo ou tarde conseguirá alcançar!

Autor desconhecido

RESUMO

SIQUEIRA, LARISSA ATAIDE. **DESENVOLVIMENTO FARMACOTÉCNICO DE SUSPENSÃO ORAL RECONSTITUÍDA CONTENDO COMPLEXO FURAZOLIDONA:β-CICLODEXTRINA**. 2018. 77p. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) - Centro de Ciências Agrárias e Engenharias – CCAE, Universidade Federal do Espírito Santo, Alegre, ES, 2018.

A leishmaniose cutânea canina (LCC) é uma doença infecciosa, causada por um protozoário do gênero *Leishmania*, de transmissão vetorial, que acomete pele e mucosa. É considerada uma zoonose que afeta animais e homens. Atualmente não existe uma farmacoterapia disponível para o tratamento da LCC no Brasil. Assim, a busca por alternativas farmacêuticas para uso nos animais tem sido objeto de inúmeras pesquisas. A atividade leishmanicida da furazolidona vem sendo estudada por diversos autores e, uma vez que o fármaco não é utilizado no tratamento das leishmanioses no homem, seu uso para o tratamento da LCC pode ser considerado. Neste sentido, o objetivo do presente trabalho foi dar continuidade à pesquisa desenvolvida pelo grupo com vistas a desenvolver um novo medicamento para tratar a leishmaniose cutânea em cães. Na presente etapa do trabalho, foi proposto o desenvolvimento farmacotécnico de uma suspensão oral reconstituída contendo o complexo furazolidona:β-ciclodextrina preparado na razão 1:2 e obtido por malaxagem. Inicialmente, foram preparados veículos estruturados contendo a carboximetilcelulose sódica como agente suspensor, nas concentrações 0,3%, 0,4%, 0,5% e 0,6% p/v. Flavorizante de uso veterinário sabor bacon foi utilizado para adequar o sabor da formulação ao paladar dos cães. Os veículos tiveram o pH, a viscosidade e o comportamento reológico estudados. Em seguida, o complexo foi incorporado nas formulações, que foram submetidas a ensaios para avaliação da estabilidade física, a saber, pH, tamanho de partícula, potencial zeta, velocidade de sedimentação e tempo de reconstituição. Finalmente, para determinação do teor de fármaco na suspensão, um método de doseamento por espectrometria na região do ultravioleta foi validado. O veículo que apresentou melhor viscosidade foi aquele contendo 0,5% p/v do espessante, sendo o comportamento reológico observado, o de um fluido não-Newtoniano pseudoplástico, adequado ao requerimento das

suspensões. O índice de dispersão obtido para as partículas foi de 3,68 e o sistema pode ser considerado polidisperso, o que foi confirmado na análise por microscopia eletrônica de varredura. O tamanho médio das partículas foi inferior a 10 μm e o potencial zeta da suspensão em pH 6,0 foi -59 mV, podendo o sistema ser considerado flocculado. A suspensão apresentou volume de sedimentação adequado e pequeno tempo de redispersão, não sendo observada a formação de aglomerado rígido, o que contribui para a uniformidade de doses. Por fim, o método de doseamento proposto mostrou-se específico, linear, exato, preciso e robusto, podendo ser utilizado com segurança para o doseamento do fármaco complexado na suspensão oral reconstituída. O teor de fármaco encontrado foi 104,7%. Considerando que os produtos farmacêuticos devem conter de 90 a 110% do princípio ativo declarado em seus rótulos para serem considerados estáveis do ponto de vista químico, a formulação atendeu a este requisito.

Palavras-chave: atividade leishmanicida; complexo de inclusão; estabilidade física; validação de método analítico.

ABSTRACT

SIQUEIRA, LARISSA ATAIDE. **PHARMACEUTICAL DEVELOPMENT OF ORAL SUSPENSION RECONSTITUTED CONTAINING COMPLEX FURAZOLIDONE: β -CYCLODEXTRIN**. 2018. 77p. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) - Centro de Ciências Agrárias e Engenharias – CCAE, Universidade Federal do Espírito Santo, Alegre, ES, 2018.

Canine cutaneous leishmaniasis (LCC) is an infectious disease, caused by a protozoan of the genus *Leishmania*, vector transmission, which affects skin and mucosa. It is considered a zoonosis that affects animals and men. There is currently no pharmacotherapy available for the treatment of LCC in Brazil. Thus, the search for pharmaceutical alternatives for use in animals has been the subject of numerous researches. The leishmanicidal activity of furazolidone has been studied by several authors and, since the drug is not used in the treatment of leishmaniasis in man, its use for the treatment of LCC can be considered. In this sense, the objective of the present work was to continue the research developed by the group with a view to developing a new medicine to treat cutaneous leishmaniasis in dogs. In the present stage of the work, the pharmacotechnical development of a reconstituted oral suspension containing the furazolidone: β -cyclodextrin complex prepared in the ratio 1: 2 and obtained by malaxation was proposed. Initially, structured carriers containing sodium carboxymethylcellulose as suspending agent were prepared in concentrations 0.3%, 0.4%, 0.5% and 0.6% w / v. Flavoring veterinary use of bacon flavor was used to tailor the flavor of the formulation to the palate of dogs. The vehicles had pH, viscosity and rheological behavior studied. The complex was then incorporated into the formulations, which were tested for physical stability, namely, pH, particle size, zeta potential, sedimentation rate and reconstitution time. Finally, for the determination of the drug content in the suspension, a spectrophotometric assay method in the ultraviolet region was validated. The vehicle having the best viscosity was the one containing 0.5% w / v of the thickener, and the rheological behavior observed was that of a non-Newtonian pseudoplastic fluid, adequate to the requirement of the suspensions. The dispersion index obtained for the particles was 3.68 and the system can be considered polydispersed, which was confirmed by the analysis by scanning electron microscopy. The mean particle size was less than 10

μm and the zeta potential of the suspension at pH 6.0 was -59 mV, and the system could be considered flocculated. The suspension presented adequate sedimentation volume and a small redispersion time, and the formation of rigid agglomerates was not observed, which contributes to the uniformity of doses. Finally, the proposed assay method showed to be specific, linear, accurate, precise and robust, and can be safely used for the dosing of the complexed drug in the reconstituted oral suspension. The drug content was 104.7%. Considering that pharmaceuticals should contain from 90 to 110% of the active principle declared on their labels to be considered chemically stable, the formulation met this requirement.

Key words: leishmanicide activity; inclusion complex; physical stability; validation of analytical method.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Ciclo de vida dos parasitos do gênero *Leishmania*:20
- Figura 2.** Estrutura química da furazolidona, com destaque para o anel furânico contendo grupo nitro.....23
- Figura 3.** Representação esquemática da estrutura das ciclodextrinas: (A) α -ciclodexgtrina, (B) β -ciclodextrina e (C) γ -ciclodextrina.....26
- Figura 4.** Características dos sistemas floculado e defloculado.35
- Figura 5.** Curva de viscosidade (A) e reogramas (B) de suspensões de veículos obtidas utilizando splinder 34, à 25°C.52
- Figura 6.**Fotografia representativa da suspensão reconstituída em veículo SUSP3, contendo o complexo na concentração de 60 mg/mL.54
- Figura 7.** Fotomicrografias representativas do complexo FZD: β -CD obtidas por microscopia eletrônica de varredura com magnificação de 160 vezes (A) e 330 vezes (B), sob aceleração de 20 keV.56
- Figura 8.** Curvas do potencial zeta obtidas para a suspensão preparada no veículo SUSP3, determinadas em pH 6,0.57
- Figura 9.**Imagem representativa da suspensão durante o ensaio para determinação do volume de sedimentação: (A) após 2 horas; e, (B) ao final de 48 horas.58
- Figura 10.** Espectros na região do UV-Vis entre 200 e 600 nm da furazolidona (A), do veículo SUSP3 puro (B) e da β -ciclodextrina (C) em dimetilformamida.60
- Figura 11.**Curva analítica da furazolidona em dimetilformamida, determinada a 362 nm, na concentração de 2,6 a 8,0 μ g/mL.61

LISTA DE SIGLAS

CDs – Ciclodextrinas

CMC-Na - Carboximetilcelulose sódica

DMF- Dimetilformamida

DN – Doença negligenciada

DRX - Difração de raios-X

ES - Espírito Santo

FT-IR - Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier

FZD – Furazolidona

LCC - Leishmaniose Cutânea Canina

LTA - Leishmaniose Tegumentar americana

MAPA -Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento

MEV - Microscopia eletrônica de varredura

OMS - Organização Mundial da Saúde

RMN - Ressonância Magnética Nuclear

SCB - Sistema de Classificação Biofarmacêutica

SMF - Sistema monocítico fagocitário (SMF).

SUSP- Suspensão

TG/DTG - Análise termogravimétrica e Análise térmica diferencial

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Composição qualitativa e quantitativa dos veículos e função farmacotécnica dos excipientes.	49
Tabela 2. Valores da viscosidade (cP) das amostras dos veículos medidas à 30 rpm, empregando spindle 34, determinados à temperatura ambiente	52
Tabela 3. Frequência de distribuição do diâmetro das partículas do complexo na suspensão.....	55
Tabela 4. Volume de sedimento (F%) formado na suspensão durante 48 horas.....	58
Tabela 5. Confirmação da linearidade pelo método espectrofotométrico por ANOVA.	61
Tabela 6. Resultados do teste de precisão (repetibilidade).....	62
Tabela 7. Resultado de precisão intermediária obtidos pelos analistas 1 e 2.....	63
Tabela 8. Resultados do ensaio de precisão (reprodutividade)	64
Tabela 9. Porcentagens recuperadas (RC%) de FZD complexada obtidas no ensaio de exatidão.....	64
Tabela 10. Resultados obtidos no do ensaio de robustez em pH 8,54, utilizando o fármaco do lote (MKCB2249V).....	65
Tabela 11. Resultados obtidos no do ensaio de robustez em pH 9,22, utilizando o fármaco do lote (MKCG7803).....	66
Tabela 12. Resultados obtidos no do ensaio de robustez utilizando o fármaco com número de lote (MKCG7803).	66

SUMÁRIO

1.INTRODUÇÃO	17
2. REVISÃO DE LITERATURA	19
2.1 Leishmaniose cutânea canina (LCC).....	19
2.1.1 Aspectos gerais e epidemiologia	19
2.1.2 Controle e tratamento da LCC	21
2.2 Furazolidona.....	23
2.3 Complexos de inclusão com ciclodextrinas	26
2.4 Suspensões farmacêuticas	30
2.4.1 Aspectos gerais	30
2.4.2 Estabilidade e desenvolvimento farmacotécnico	33
2.5 Palatabilidade das formulações veterinárias	38
3. MATERIAIS E MÉTODOS	40
3.1 Materiais.....	40
3.2 Equipamentos	40
3.3 Complexo furazolidona:β-CD (FZD:β-CD).....	40
3.4 Abrangência dos experimentos e resultados.....	41
3.5 Métodos.....	41
3.5.1 Delineamento e manipulação dos veículos.....	41
3.5.2 Avaliação daestabilidade física da suspensão	42
3.5.2.1 Determinação do pH.....	42
3.5.2.2 Avaliação da viscosidade e do comportamento reológico do veículo .	43
3.5.2.3 Estudo da morfologia das partículas do complexo.....	43
3.5.2.4 Estudo da granulometria das partículas.....	43
3.5.2.5 Medida do potencial zeta	44
3.5.2.6 Pesquisa do tempo de redispersão.....	44

3.5.2.7 Análise do volume de sedimentação.....	45
3.5.3 Desenvolvimento e validação de metodologia para doseamento do fármaco.....	45
3.5.3.1 Seletividade	45
3.5.3.2 Linearidade	45
3.5.3.3 Sensibilidade	46
3.5.3.4 Precisão.....	46
3.5.3.5 Exatidão.....	47
3.5.3.6 Robustez.....	47
3.5.3.7 Doseamento da furazolidona	47
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	49
4.1 Obtenção do veículo	49
4.2 Avaliação da viscosidade e do comportamento reológico do veículo	51
4.3 Manipulação da suspensão e pesquisa da estabilidade física	53
4.4 Validação de metodologia analítica para doseamento da furazolidona na formulação.....	59
5. CONCLUSÕES.....	67
6. REFERÊNCIAS.....	69

1. INTRODUÇÃO

As leishmanioses constituem-se como antropozoonoses de animais silvestres e domésticos. No ciclo evolutivo, o parasito é digênico, pois, tem como hospedeiros vertebrados os cães e o homem e, como hospedeiro invertebrado, as fêmeas do mosquito palha (flebotomíneos) (PINK *et al.*, 2005; ALVAR *et al.*, 2006; MADEIRA *et al.*, 2006; DANTAS-TORRES, 2008). A leishmaniose cutânea em cães (LCC) é considerada um problema de saúde pública no Brasil, estando a zoonose disseminada por todo o território nacional (PASSOS *et al.*, 2014). No Espírito Santo, a principal espécie relacionada à LCC é a *Leishmania (Viannia) braziliensis* (SESA, 2015).

Inúmeros estudos evidenciam a ocorrência de leishmaniose em humanos no Espírito Santo desde 1912, com aumento no número de casos a partir de 1977 e controle da doença nos anos 2000. Existem relatos da existência de casos da doença em diferentes municípios do estado, entre os quais destacam-se localidades nos municípios de Viana, Serra, Linhares, Cariacica, Domingos Martins, Iúna e Ibatiba (FALQUETO *et al.*, 1986; FALQUETO *et al.*, 2003; PINTO *et al.*, 2009; SESSA; FALQUETO; VAREJÃO, 1994; SESA, 2015). Em maio de 2017, a prefeitura de Ibatiba, município da região sul do Espírito Santo (ES), decretou situação de emergência na cidade em função de um surto de leishmaniose em humanos (IBATIBA, 2017).

A busca por alternativas terapêuticas para o tratamento das leishmanioses em geral, inclusive da LCC, é de fundamental importância no contexto mundial. No Brasil não existe um medicamento disponível para a farmacoterapia da LCC, que pode ser considerada insatisfatória. Ainda, existem relatos de ineficácia e do surgimento de efeitos tóxicos graves aos fármacos de uso *off label* usualmente empregados, além de custos elevados relacionados ao uso destes. Por outro lado, a eutanásia de animais não é mais aceita como medida de controle de infecções. Além disso, o uso de fármacos empregados para tratar a mesma patologia em humanos não é encorajado, já que pode contribuir para o surgimento de casos de resistência (BĂNULS *et al.*, 2011; PASSOS *et al.*, 2014). Neste sentido, a possibilidade de desenvolver um medicamento específico para o tratamento da LCC desperta a atenção da comunidade farmacêutica e veterinária.

Inúmeras pesquisas apontam para o uso promissor da furazolidona (FZD) como agente leishmanicida (NEAL *et al.*, 1998; REIMÃO *et al.*, 2010; TEMPONE *et al.*, 2010; PASSOS *et al.*, 2014). Trabalhos disponíveis na literatura mostram que a FZD, sozinha ou associada, administrada por diferentes vias, apresenta atividade leishmanicida contra diferentes formas de *Leishmania*. Tempone e colaboradores (2010) administraram FZD na forma lipossomal e livre em animais infectados pela *Leishmania (Leishmania) chagasi* e observaram que ambas as formas do fármaco foram efetivas em reduzir os parasitos, sendo o fármaco considerado uma alternativa eficaz e barata para o tratamento da leishmaniose visceral. Passos e colaboradores (2014) trataram cães naturalmente infectados pela *Leishmania (Viannia) braziliensis* com uma associação entre FZD e domperidona e observaram que a terapêutica foi efetiva para o tratamento das lesões, que foram re-epitalizadas em cerca de 45 dias.

Os principais problemas relatados pelo uso da FZD em animais é o surgimento de reações de nefro, cardio e hepatotoxicidade, acompanhadas ou não por anorexia, perda de peso, fadiga e perda da coordenação motora (HUNDER *et al.*, 1987). Uma vez que a FZD é rapidamente absorvida e metabolizada após administração oral, o emprego de altas doses com vistas à obtenção do efeito farmacológico pretendido é requerido, o que pode limitar seu uso (ALAM *et al.*, 2016). Neste contexto, desenvolver formulações farmacêuticas preparadas a partir do emprego de excipientes capazes de melhorar a solubilidade e a biodisponibilidade da furazolidona, com vistas a reduzir sua toxicidade e otimizar o efeito farmacológico, mostra-se como alternativa viável a ser pesquisada. Assim, o objetivo do presente trabalho foi preparar uma suspensão oral reconstituída, adequadamente flavorizada, contendo furazolidona complexada com a β -ciclodextrina, para uso em ensaios pré-clínicos visando o tratamento da leishmaniose cutânea em cães. O complexo foi preparado no Laboratório de Produção Farmacêutica da UFES e foi usado com o intuito de melhorar a solubilidade aparente da FZD e permitir a redução da dose a ser administrada bem como da toxicidade associada ao seu uso. Após o desenvolvimento farmacotécnico da formulação, a estabilidade física da suspensão foi avaliada mediante a realização de ensaios físico-químicos. O teor do fármaco foi medido por espectrofotometria na região do ultravioleta, após validação da metodologia de análise.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Leishmaniose cutânea canina (LCC)

2.1.1 Aspectos gerais e epidemiologia

A leishmaniose figura em terceiro lugar no ranking das doenças negligenciadas (DN), sendo a segunda causa de mortes em humanos causadas por parasitos (FEASEAY *et al.*, 2010). A parasitose é causada por parasitos pertencentes ao gênero *Leishmania*, subgênero *Leishmania* (*Leishmania*) e *Leishmania* (*Viannia*), dependendo da localização do desenvolvimento do parasito no trato digestório do vetor (GONTIJO; CARVALHO, 2003; VELEZ *et al.*, 2012). A doença apresenta ampla distribuição mundial, sendo considerada um problema de saúde pública em 98 países. A Organização Mundial da Saúde (OMS) estima que o registro aproximado de novos casos anuais das diferentes formas clínicas da doença seja de dois milhões, podendo os dados serem subestimados em função da sub-notificação (BRASIL, 2013; SARAIVA *et al.*, 2017). Na América Latina, os países responsáveis pelos casos registrados são o Brasil (26.008 casos/ano), a Colômbia (17.420 casos/ano), o Peru (6.405 casos/ano), a Bolívia (2.647 casos/ano) e a Argentina (261 casos/ano) (ALVAR *et al.*, 2012)

Os protozoários causadores da leishmaniose vivem, alternadamente, em hospedeiros vertebrados e flebotomíneos, sendo estes últimos os responsáveis pela transmissão da doença. Todas as espécies são transmitidas através de repasto sanguíneo de fêmeas infectadas de flebotomíneos (sub-família *Phlebotominae*). Ao realizarem o repasto no animal parasitado, podem sugar formas amastigotas, que no interior de seu tubo digestório, diferenciam-se em formas promastigotas, multiplicando-se. As formas promastigotas, por sua vez, migram para as partes anteriores do tubo digestório dos flebotomíneos e são inoculadas em um novo animal. Nos hospedeiros, os parasitos assumem a forma amastigota, multiplicando-se em células do sistema monocítico fagocitário (SMF). À medida que se multiplicam, rompem os macrófagos e liberam parasitos que são fagocitados por outros macrófagos (GONTIJO; CARVALHO, 2003). O ciclo de vida do parasito é

apresentado na Figura 1.

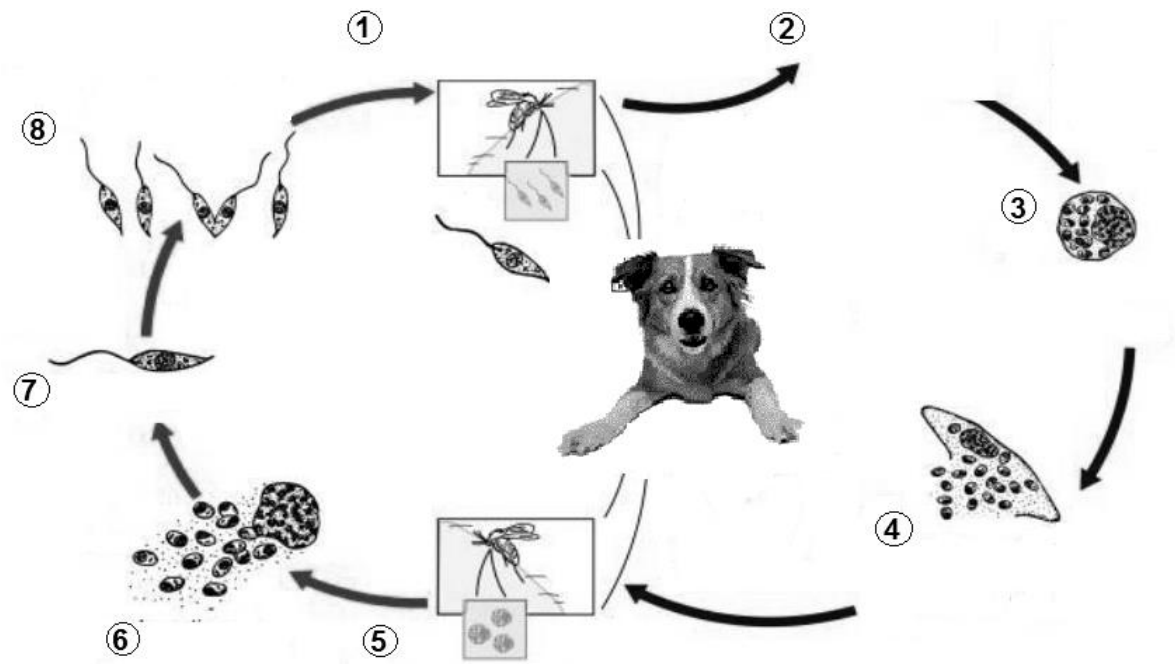


Figura 1. Ciclo de vida dos parasitos do gênero *Leishmania*: 1. Flebotomíneo ingere sangue de um indivíduo saudável (injetando com sua saliva protozoários na forma de promastigota); 2. No organismo os promastigotas são fagocitados por macrófagos; 3. Promastigotas se transformam em amastigotas dentro de macrófagos; 4. Amastigotas se multiplicam dentro da células por divisão binária (incluindo macrófagos) em vários tecidos; 5. Flebotomíneos ingere sangue com macrófagos infectados com amastigotas; 6. Injeção de células parasitadas; 7. amastigotas se transformam em promastigotas; 8. Promastigotas dividem-se no intestino e migram para a faringe do inseto.

FONTE: <https://www.clinicaveterinariasantanna.com/malattieparassitariecaniegatti/leishmaniosi-cane-guida-definitiva/attachment/leishmaniosi/>.

As formas de leishmaniose que podem acometer os cães são a visceral e a cutânea. A leishmaniose cutânea canina é também conhecida como leishmaniose tegumentar americana (LTA). Na LCC, a inoculação do parasito leva à formação de lesões cutâneas localizadas no pavilhão auricular, no focinho, na bolsa escrotal ou na face dos cães. As lesões apresentam aspecto pápulo-vesiculoso ou impetigóide, podendo evoluir para a formação de lesões disseminadas, com invasão da mucosa nasofaríngea. Os sinais e sintomas variam com base nas espécies infectantes e no estado imunológico do hospedeiro. A forma cutânea é o tipo mais comum e menos

severo de leishmaniose (GONTIJO; CARVALHO, 2003; HEUSSER JÚNIOR *et al.*, 2010). A lesão na LCC surge diretamente no local do repasto sanguíneo realizado pelo flebotomíneo. Apresenta-se, inicialmente, como uma lesão eritêmato-papulosa, única ou múltipla, evoluindo para pápulo-pustulosa, úlcero-crostosa e, finalmente, com aspecto característico de úlcera, com contornos circulares, bordas infiltradas, em forma de moldura, indolor e fundo com aspecto de granulações grosseiras (SANTOS *et al.*, 2014). Na forma mucocutânea da doença, na qual ocorre disseminação das lesões do tecido da pele para a mucosa, especialmente, da boca, nariz e focinho, não ocorre a cicatrização espontânea (ROIKO *et al.*, 2015). A forma difusa da LCC é considerada rara e grave da LCC, podendo ser originada, geralmente, da falta de tratamento das formas anteriores (JESUS, 2006).

Entre os países do continente sul-americano, o Brasil possui as mais elevadas taxas de notificação da LCC (LAURENTI, 2010). No país, diferentes espécies foram relacionadas à doença, sendo as principais: *Leishmania (Viannia) braziliensis*, *Leishmania (Leishmania) amazonensis* e *Leishmania (Viannia) guyanensis* (BRASIL, 2005; HEUSSER JÚNIOR *et al.*, 2010). No estado do Espírito Santo, os casos descritos de LCC devem-se, principalmente, à achados de *Leishmania (Viannia) braziliensis* nos diagnósticos parasitológicos da doença (FALQUETO *et al.*, 2003; PINTO *et al.*, 2009).

2.1.2 Controle e tratamento da LCC

Uma das formas de controle da leishmaniose em cães, inclusive da LCC, é evitar que os flebotomíneos realizem o repasto sanguíneo nos cães, mediante o uso de coleiras contendo inseticidas, uso de xampus ou o emprego de produtos contendo agentes químicos eficazes na manutenção dos flebotomíneos afastados dos cães. O controle do vetor é outro aspecto a ser considerado, uma vez que o mesmo é vulnerável ao uso de inseticidas, que podem ser pulverizados nas casas e abrigos dos animais. A manutenção da limpeza do habitat do animal, com a retirada de material orgânico como folhas, fezes e lixo, onde o flebotomíneo possa se reproduzir, também é de fundamental importância. Porém, cabe ressaltar que o vetor nem sempre é restrito às áreas domiciliares (GONTIJO *et al.*, 2011).

Do ponto de vista farmacológico, o tratamento da leishmaniose em animais no

Brasil, vem sendo discutido na esfera judicial. A ausência de um medicamento de uso exclusivo em veterinária levou a Advocacia Geral da União, em 2004, mediante Parecer Técnico (Nº 299/2004), a proibir o emprego do antimoniato de meglumina distribuído pelo Ministério da Saúde no tratamento da leishmaniose canina. Em 2008, a Portaria Interministerial (MS/MAPA Nº1426/2008) proibiu, em todo o território nacional, o tratamento da leishmaniose em cães infectados ou doentes, com produtos de uso humano ou produtos não-registrados no MAPA. Em setembro de 2016, por meio da Nota Técnica Conjunta nº001/2016 MAPA/MS, foi autorizado o registro do produto Milteforan® (contendo miltefosina a 2%) no Brasil, para uso no tratamento da forma visceral da leishmaniose em cães. A miltefosina é um fármaco que não era utilizado no Brasil para o tratamento da leishmaniose em humanos e, até aquele momento, não existiam evidências científicas que sustentavam sua inclusão em protocolos terapêuticos da leishmaniose em humanos.

Tendo em vista a importância da LCC e das dificuldades envolvidas com o tratamento dos animais, a busca contínua por fármacos e de formas farmacêuticas alternativas, se faz necessária. De acordo com Rai e Kon (2015) o uso de fármacos não aprovados para o tratamento da leishmaniose, tais como, a furazolidona, a buparvaquona e o bisnaftal-imidopropil-diamino-octano vem sendo proposto e os mesmos apresentaram eficácia anti-*leishmania* aumentada depois de incorporados em formas farmacêuticas baseadas em sistemas micro e nanoparticulados, como lipossomas e nanopartículas poliméricas de poli (ácido-lático-co-ácido-glicólico). Pesquisas que avaliam o uso de outros fármacos como a paromicina, imiquimod e sitamiquina, no tratamento de diferentes formas de leishmaniose se encontram disponíveis na literatura para consulta (CROFT; SEIFERT; YARDLEY, 2006).

A FZD teve seu uso proibido no Brasil em animais destinados à produção de alimentos, pela Portaria nº 448 de 1998 do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA, 1998). No entanto, existem relatos acerca da efetividade do seu uso contra diferentes formas de leishmaniose, mediante a realização de testes *in vitro* e *in vivo*. Assim, fundamentado em resultados promissores apresentados e, em função do baixo custo do fármaco, propôs-se, no presente trabalho, o desenvolvimento de uma formulação farmacêutica líquida contendo furazolidona, para uso oral, com vistas a contribuir para o sucesso do tratamento da LCC. A partir da complexação com ciclodextrinas é possível reduzir a dose oral requerida para a eficácia terapêutica e, como consequência, é possível obter redução da toxicidade

do fármaco, que é dose-dependente.

2.2 Furazolidona

A furazolidona ($C_8H_7N_3O_5$) é um quimioterápico sintético, de amplo espectro, com atividade antimicrobiana e antiprotozoária, pertencente a um grupo de compostos denominados nitrofuranos. Estes últimos caracterizam-se pela presença do anel furânico em sua estrutura química, no qual existe um grupo nitro ligado (Figura 2) (BOSQUESI *et al.*, 2008).

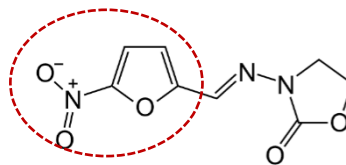


Figura 2. Estrutura química da furazolidona, com destaque para o anel furânico contendo grupo nitro. FONTE: <https://www.indice.eu/pt/medicamentos/DCI/furazolidona/informacao-cientifica>.

Fisicamente a FZD caracteriza-se como pó cristalino, de cor amarela intensa, inodora, com sabor inicialmente insípido, porém, de residual amargo. Apresenta fotossensibilidade, podendo sofrer degradação alcalina sob ação da luz, devendo ser armazenada em recipiente hermético, protegido da luz. Seu peso molecular é de 225,16 g/mol e seu ponto de fusão é 275°C. Sua solubilidade em água (pH 6,0) é de 40 mg/L, 90 mg/L em álcool etílico e de 200 mg/L em clorofórmio, sendo o fármaco insolúvel em éter, ligeiramente solúvel em dimetilsulfóxido e dimetilformamida e, solúvel no ácido fórmico (USP, 2011).

Na terapêutica veterinária, a FZD é indicada como endoparasiticida para uso no tratamento da giardíase, tricomoníase e histomoníase, em cães e gatos, na dose usual de 4 mg/Kg não sendo, contudo, o fármaco de primeira escolha. Apesar do mecanismo de ação da FZD não ter sido totalmente elucidado, a ação do fármaco sobre os parasitos parece estar relacionada à inibição de reações oxidativas, incluindo a descarboxilação do piruvato à acetil coenzima A, com redução do fornecimento de energia para as células. A redução do grupo nitro com formação de 3-amino-2-oxazolidinona e β -hidroxietilhidrazina, principalmente, e dióxido de carbono e etileno também parecem estar associados à ação da FZD, uma vez que

estes metabólitos reativos se ligam ao DNA dos parasitos, danificando-os e bloqueando a replicação e transcrição (MADDISON, 2010).

A furazolidona é bem absorvida no intestino de suínos e humanos, sendo rapidamente e extensivamente metabolizada, com concentração máxima alcançada em 3 horas e meia-vida de eliminação de 5 horas, determinadas em humanos e suínos. O fármaco é amplamente distribuído e extensivamente metabolizado, com excreção predominante na urina, com pequena quantidade do fármaco encontrado na forma inalterada (MADDISON, 2010). A eliminação do fármaco ocorre após metabolização por associação com a glutatona. O principal problema associado ao uso da FZD em animais é a toxicidade renal, cardíaca e hepática relatadas, acompanhadas ou não de irritação, perda de peso e fadiga, sendo a toxicidade dose-dependente (MADDISON, 2010; ALAM *et al.*, 2016). A presença dos metabólitos responsáveis pelo efeito farmacológico parece estar associada à toxicidade do fármaco. Carcinotoxicidade e genotoxicidade também são relatadas (SHITANDI *et al.*, 2008; BOSQUESI, 2008).

O uso da FZD tem sido proposto para diferentes finalidades terapêuticas. Jiang e colaboradores (2013) avaliaram a ação do fármaco sobre linhagens de células AML e observaram que o fármaco apresentou propriedade antiproliferativa potente em concentrações submicromolares, induzindo apoptose e morte das células, sugerindo a existência de atividade do fármaco contra a leucemia mieloide aguda. Eisig e colaboradores (2005) avaliaram o sucesso de um tratamento de pacientes re-infectados por *Helicobacter pylori* partir de uma associação de quatro fármacos, e observaram que o uso da FZD na concentração de 400 mg diários foi bem tolerado e eficaz, sendo o fármaco uma boa opção de re-tratamento da infecção pelo *Helicobacter pylori*. Alam, Paget e Elkordy (2016) prepararam sistemas de liberação de furazolidona baseados em lipossomas com vistas ao uso no tratamento da infecção por *Helicobacter pylori*, cuja eficiência de encapsulação, liberação do fármaco e capacidade mucoadesiva foram afetadas pelo pH.

Resultados de pesquisas disponíveis na literatura sugerem que a FZD é um agente leishmanicida eficaz, podendo ser útil no tratamento de diferentes formas da leishmaniose. Berman e Lee (1983) testaram a atividade leishmanicida de diferentes agentes antimicrobianos, dentre os quais, a furazolidona, sobre cepas de *Leishmania tropica*. Os autores observaram que o fármaco foi capaz de eliminar 92% dos parasitos quando testado na concentração de 1,0 µg/mL. Neal e colaboradores

(1988) estudaram a atividade da furazolidona e da nitrofurazona contra diferentes formas de *Leishmania* e observaram que a FZD apresentou atividade superior contra a forma *Leishmania donovani*. Tempone e colaboradores (2010) administraram FZD na forma lipossomal e livre em hamsters infectados pela *Leishmania chagasi* e observaram que a FZD lipossomada foi cerca de 100 vezes mais efetiva que o fármaco livre na morte das formas amastigotas dos parasitos, quando administrada intraperitonealmente, na dose de $0,5 \text{ mgKg}^{-1}$, por um período de 12 dias consecutivos. Reimão e colaboradores (2010) avaliaram a atividade leishmanicida da FZD sobre formas promastigotas de *Leishmania infantum*, *Leishmania braziliensis*, *Leishmania major* e *Leishmania amazonensis*, que mostraram-se suscetíveis ao fármaco livre, com valores de IC_{50} que variaram de 0,47 a 0,73 $\mu\text{g/mL}$. Passos e colaboradores (2014) trataram 8 cães infectados por *Leishmania braziliensis* com uma associação entre FZD (35 mg/kg/dia) e domperidona (1 mg/kg/12h) e observaram que a terapêutica foi efetiva para o tratamento das lesões, que foram re-epitalizadas em 93 dias.

Não existe, na literatura, informação acerca da classificação da FZD no Sistema de Classificação Biofarmacêutico (SCB). Estudos disponíveis, realizados em porcos e ratos, indicam que o fármaco é rapidamente metabolizado e eliminado, permanecendo por um curto período de tempo na corrente circulatória, o que requer o uso de doses elevadas (ALAM *et al.*, 2016). Uma vez que o fármaco é de natureza lipofílica e, portanto, apresenta baixa solubilidade em água, sua biodisponibilidade será limitada, assim como a dos demais fármacos que pertencem aos grupos nos quais a dissolução é o fator limitante da biodisponibilidade (Classes II e IV) (LOBENBERG; AMIDON, 2000). Em ambos os casos, o uso de excipientes farmacêuticos além de outras técnicas capazes de incrementar a solubilidade do fármaco, podem ser úteis para o alcance de uma maior disponibilidade biológica a partir de uma menor dose (HEJAZ; KARAMAN, 2015).

Diferentes tecnologias e excipientes farmacêuticos podem ser empregados com o intuito de aumentar a solubilidade de fármacos e melhorar sua biodisponibilidade, permitindo a minimização ou supressão de problemas de toxicidade. Tais artifícios farmacotécnicos podem ser úteis no desenvolvimento de uma forma farmacêutica contendo furazolidona para uso no tratamento da LCC. Dentre estas, destaca-se o uso de excipientes disponíveis tais como as ciclodextrinas (CDs) (PRAKASH *et al.*, 2014).

2.3 Complexos de inclusão com ciclodextrinas

Entre as tecnologias disponíveis com finalidade de melhorar a biodisponibilidade de fármacos, destaca-se o emprego das ciclodextrinas (CDs). As ciclodextrinas são oligossacarídeos cíclicos, formados por unidades deglicopiranoses, unidas por ligações α -1,4. As CDs naturais são obtidas a partir da degradação enzimática do amido, sob ação da enzima glicosiltransferase (CGTase do *Bacillus macerans*) e caracterizam como carboidratos complexos formados por, pelo menos, 6 unidades de glicose (RAO; STELLA, 2003). Alguns exemplos de medicamentos comercialmente disponíveis baseados na complexão com CDs são apresentados no Quadro 1.

As principais CDs naturais estudadas são a α , a β e a γ -ciclodextrina (Figura 3). Derivados semissintéticos também têm sido explorados, tais como a 2-hidroxiropil- β -ciclodextrina, o sal sódico de sulfobutiléter- β -ciclodextrina, a β -ciclodextrina metilada randômica e a 2-hidroxiropil- γ -ciclodextrina (RAJPUT, PATEL, TRIVEDI, 2016). As moléculas das CDs possuem estrutura tridimensional semelhante a um anel cônico truncado (Figura 3). Cada unidade de glicopiranosose possui 3 grupos hidroxila (OH) livres posicionados nas extremidades da estrutura, tornando-as solúveis em água devido à formação de ligações de hidrogênio com o solvente. Por outro lado, o interior da cavidade é delimitado pelo alinhamento dos hidrogênios e pelo oxigênio da ligação éter das cadeias carbônicas, o que lhes confere caráter hidrofóbico. Tal distribuição confere às CDs uma superfície hidrofílica e uma cavidade interna hidrofóbica, peculiaridade que as torna potencialmente útil na formação de complexos de inclusão com finalidades diversas (LOFTSSON *et al.*, 2005; BREWSTER; LOFTSSON, 2007).

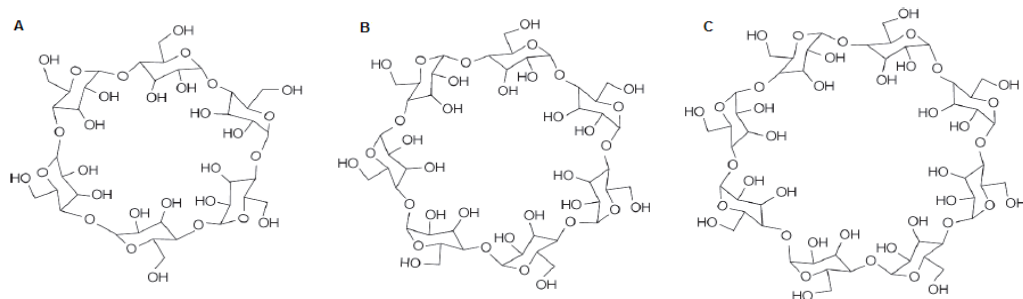


Figura 3. Representação esquemática da estrutura das ciclodextrinas: (A) α -ciclodextrina, (B) β -ciclodextrina e (C) γ -ciclodextrina. Fonte: (DAVIS; BREWSTER, 2004).

Quadro 1. Medicamentos disponíveis no mercado nacional e internacional preparados a partir de fármacos complexados com ciclodextrinas (CUNHA-FILHO & SÁ-BARRETO, 2007; GUEDES *et al.*, 2008; OLIVEIRA, SANTOS, COELHO, 2009).

Fármaco	Nome comercial	Forma farmacêutica	Laboratório	Indicação
β-ciclodextrina (βCD)				
dexametasona	Glymesason [®]	Creme	Fujinaga	Analgésico
omeprazol	Omebeta [®]	Comprimido	Betapharm	Antiulceroso
piroxicam	Brexin [®]	Comprimido	Masterpharma	Anti-inflamatório
	Cicladol [®]	Grânulo		
	Flofene [®]	Supositório		
	Flogene [®]	Cápsula	Aché	
prostaglandina E2	Prostarmon E [®]	Comprimido sublingual	Ono	Indução do parto
2-hidroxiopropil-β-ciclodextrina (HPβCD)				
cisaprida	Propulsid [®]	Supositório	Janssen	Estimulante TGI
indometacina	Indocid [®]	Solução oral	Chauvin	Anti-inflamatório
itraconazol	Sporanox [®]	Solução IV	Janssen	Antifúngico
Metil-β-ciclodextrina randomizada (RMβCD)				
cloranfenicol	Clorocil [®]	Solução oftálmica	Oftalder	Antibiótico
17 β -estradiol	Aerodiol [®]	Spray nasal	Servier	Terapia hormonal
Sulfobutiléter-β-ciclodextrina (SBEβCD)				
voriconazol	VFend [®]	Solução IV	Pfizer	Antimicótico
ziprasidona	Geodon [®]	Solução IM	Pfizer	Antipsicótico
2-hidroxiopropil-γ-CD (HPγCD)				
diclofenaco de sódio	Voltarem [®]	Solução oftálmica	Nonertis	Anti-inflamatório e analgésico

As propriedades físico-químicas e algumas características de interesse das ciclodextrinas naturais e sintéticas de interesse farmacêutico são apresentadas no Quadro 2.

Quadro 2. Propriedades físico-químicas e características das principais ciclodextrinas empregadas pela indústria farmacêutica (GUEDES *et al.*, 2008; MIRANDA *et al.*, 2011).

	α CD	β CD	γ CD	HP β CD	SBE β CD	RM β CD
Propriedades físico-químicas						
Unidades de glicose	6	7	8	7	7	7
Diâmetro da cavidade (A)	14,6	15,4	17,5	-	-	-
Massa molar (g/mol)	972	1135	1297	1136	1135	1134
Solubilidade em água (25°C) (mg/mL)	14,5	1,85	23,2	>600	>500	>500
Solubilidade (etanol) (g/100 mL)	Ins.	Ins.	>0,1	-	-	-
Solubilidade (glicerina) (g/100 mL)	Ins.	4,3	-	-	-	-
Características de interesse						
Preço	++	+++	+	+	+	+
Capacidade de inclusão	+	+++	+	+++	+++	+++
Restrições toxicológicas	+++	+++	++	+++	+++	+++

Ins. = insolúvel. +++ Excelente; ++ boa; + má.

Uma das principais características das ciclodextrinas que determina a formação do complexo de inclusão é a presença de uma cavidade hidrofóbica, cujo diâmetro varia conforme o tipo de ciclodextrina. Tal parâmetro, juntamente com a constante de associação, governa a estequiometria da complexação, dada pela relação entre o número de moléculas hóspedes e hospedeiras. Conforme Veiga e colaboradores (2006), as relações estequiométricas mais usuais para os complexos são 1:1 e 1:2 e, a maioria das moléculas hóspedes complexadas com β -CD deve possuir massa molar compreendida entre 100 e 400 Daltons. Devido à versatilidade e propriedades únicas, esta classe de açúcares possui aplicações nas mais distintas áreas tais como química, agroquímica, têxtil, farmacêutica, cosmética, saneante, alimentícia e de materiais. Dentre as principais finalidades do uso nas Ciências

Farmacêuticas destacam-se: (1) aumento da solubilidade aparente de fármacos pouco solúveis; (2) incremento da dissolução e biodisponibilidade dos mesmos; (3) redução do efeito irritante das substâncias complexadas; (4) melhoria da estabilidade das moléculas, tanto no ambiente externo como no organismo; (5) mascaramento de sabor e odor desagradáveis; (6) controle da liberação das moléculas complexadas; (7) prevenção de interações em formulações (LOFTSSON *et al.*, 2005; BREWSTER; LOFTSSON, 2007).

Os complexos fármaco:ciclodextrinas podem ser obtidos a partir do emprego de inúmeras técnicas, de acordo com a solubilidade do fármaco, do complexante ou do estado físico dos materiais de partida. Assim, complexos podem ser obtido pelos métodos: *malaxagem, coprecipitação, atomização, fluidização supercrítica e liofilização*. Finalizada a complexação, o sucesso na formação dos complexos deve ser avaliado mediante o uso de técnicas variadas e complementares, que são sumarizadas no Quadro 3.

Quadro 3. Técnicas utilizadas na caracterização de complexos de inclusão (LYRA *et al.*, 2010).

Técnica	Parâmetros pesquisados
Microscopia eletrônica de varredura (MEV)	Qualitativo. Avalia alterações na morfologia das partículas (amorfização).
Diagramas de solubilidade de fases	Quantitativo. Analisa os efeitos da adição do agente complexante sobre o composto a ser solubilizado, permitindo obter a constante de estabilidade (K_c) e a estequiometria de formação do complexo.
Ressonância Magnética Nuclear (RMN)	Qualitativo e quantitativo. Permite visualizar as interações que ocorrem entre as moléculas hóspedes e as CDs, sendo capaz de diferenciar qual parte da estrutura química do fármaco está sendo complexada.
Espectroscopia no ultravioleta	Quantitativo e qualitativo. É baseado na propriedade das espécies absorverem determinados comprimentos de onda da radiação.

(Continuação)

Modelagem molecular	Qualitativo. Analisa como se procede a formação dos complexos de inclusão e a orientação dos fármacos nas cavidades das CDs
Análise termogravimétrica (TG/DTG)	Quantitativo e qualitativo. Avalia a variação da perda de massa referente aos eventos térmicos, especialmente, desidratação e fusão.
Calorimetria exploratória diferencial (DSC)	Quantitativo e qualitativo. Acompanha a variação de entalpia dos eventos térmicos que ocorrem na amostra em relação a um material de referência termicamente inerte.
Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FT-IR)	Qualitativo. Detecta mudanças significativas na intensidade e região da bandas nos espectros vibracionais dos grupos funcionais das moléculas envolvidas na complexação.
Difração de raios-X (DRX)	Qualitativo. Compara os difratogramas das substâncias puras e do complexo formado, onde o difratograma do complexo formado é claramente diferente daqueles dos componentes individuais.

2.4 Suspensões farmacêuticas

2.4.1 Aspectos gerais

Suspensão farmacêutica é um sistema sólido-líquido heterogêneo e bifásico, obtido pela dispersão uniforme de fármacos finamente divididos em veículos nos quais permanecerão dispersos (NASH, 2006). Ao contrário da solução, na suspensão o fármaco é minimamente solúvel no veículo, sendo a forma farmacêutica útil para a veiculação de fármacos hidrofóbicos em preparações

líquidas. As suspensões são ditas dispersões particuladas e apresentam duas fases denominadas contínua (dispersante) e descontínua (dispersa), formando um sistema termodinamicamente instável. As suspensões, consoante o tamanho das partículas dispersas, podem ser classificadas em coloidais (partículas menores que 1 μm) ou grosseiras (partículas com tamanho de 1 μm a 50 μm), sendo destinadas ao uso externo e interno e, administradas, usualmente, pelas vias oral, parenteral (intramuscular), oftálmica e tópica (NASH, 2006; ALLEN, ANSEL, POPOVICH, 2013; SHUSMA *et al.*, 2013; PIMPLE *et al.*, 2017).

Suspensões são as formas farmacêuticas de escolha para a administração de fármacos insolúveis em água e outros veículos na dose requerida para administração e, quando o preparo de uma solução compromete a estabilidade do fármaco e da formulação (NASH, 2006). As suspensões orais são especialmente úteis para administração de fármacos para pacientes que têm dificuldade de deglutição, como idosos, crianças e animais. A escolha das mesmas pode melhorar a adesão ao tratamento, uma vez que a fase contínua pode ser edulcorada e flavorizada, promovendo mascaramento do sabor e odor desagradáveis. De maneira geral, as formas farmacêuticas líquidas permitem flexibilidade de doses, que podem ser controladas pelo volume a ser administrado. Outra vantagem das suspensões é que a biodisponibilidade do fármaco pode ser melhorada quando comparada a administração de um mesmo fármaco a partir de outras formas farmacêuticas, como comprimidos e cápsulas. Ainda, a liberação do fármaco pode ser modificada pelo uso de polímeros, pelo controle da viscosidade do veículo ou pela formação de depósitos nos tecidos (ALLEN, ANSEL, POPOVICH, 2013; THOMPSON, 2013).

As suspensões farmacêuticas devem apresentar algumas características ideais, a saber: (i) aspecto elegante; (ii) estabilidade química, física e microbiológica; (iii) velocidade de sedimentação lenta; (iv) redispersão fácil e rápida, após agitação gentil do frasco; (v) escoamento uniforme a partir da embalagem; (vi) floculação controlada, com formação de aglomerados frouxos; e, (vii) ausência de sedimento rígido e compacto no fundo do frasco (NASH, 2006; SHUSMA *et al.*, 2013; PIMPLE *et al.*, 2017).

As suspensões orais apresentam, geralmente, alta viscosidade e podem conter doses consideravelmente altas de fármaco a serem administradas (25 a 100 mg/mL), ao contrário das soluções. Xarope simples, água com espessantes e sorbitol em solução, são veículos adequados para prepará-las. Além de edulcorantes,

as suspensões orais podem conter flavorizantes, antioxidantes, complexantes, conservantes, tensoativos, eletrólitos, viscosantes, modificadores de pH, formadores de colóides hidrofílicos e agentes suspensores. No Quadro 4 são apresentados exemplos de excipientes usualmente empregados como espessantes, suspensores e floculantes em suspensões orais.

Quadro 4. Principais excipientes empregados no preparo de suspensões orais com suas respectivas funções farmacotécnicas e concentrações usuais.

Excipiente	Concentração usual (% p/v)
Viscosantes (espessantes)	
Carboximetilcelulose sódica	1-2
Goma arábica	5-15
Goma acácia	5-10
Goma adraganta	0,5-2,0
Celulose microcristalina	0,6-1,5
Hidroxipropilmetilcelulose	1-2
Pectina	1,0-3,0
Carbopol	0,5-1,0
Tensoativos (suspensores)	
Cloreto de Benzalcônio	0,004-0,02
Polissorbato 80	0,1-3,0
Monooleato de sorbitano	0,1-3,0
Lauril sulfato de sódio	0,5-1,0
Lecitina	0,25-1,0
Floculantes (eletrólitos)	
Ácido cítrico	0,1
Hidróxido de alumínio	0,1
Fosfato de sódio	0,1
Acetato de sódio	0,1-2,0

As suspensões orais devem possuir características organolépticas agradáveis, proporcionando boa aceitação ao paciente e, permitir administração de doses uniformes e terapeuticamente ativas. Para que seja garantida a uniformidade de dose nas suspensões é necessário que a mesma seja agitada imediatamente antes

da administração e que a fase descontínua esteja floclada e homogeneamente dispersa na fase contínua. Em casos nos quais a estabilidade do fármaco no veículo da suspensão é baixa, podem ser preparados grânulos secos para ressuspensão, que serão reconstituídos com água antes do uso frasco (NASH, 2006; SHUSMA *et al.*, 2013; PIMPLE *et al.*, 2017).

2.4.2 Estabilidade e desenvolvimento farmacotécnico

O desenvolvimento farmacotécnico de suspensões é mais complexo quando comparado aos das soluções, pois, sistemas dispersos estão sujeitos à problemas de instabilidade de ordem físico-química, relacionados à fatores termodinâmicos, eletrocinéticos, interfaciais e reológicos (ZATZ, 1985).

Idealmente, a fase interna das suspensões deve se manter dispersa no meio sem a formação de sedimento rígido durante a estocagem. Contudo, tal estado é difícil de ser alcançado em função da instabilidade termodinâmica observada nas mesmas. As partículas finas quando em suspensão possuem uma energia superficial livre que torna o sistema instável e favorece a adesão das partículas com vistas a formar aglomerados e reduzir a energia interna livre. De acordo com o equilíbrio de forças de atração e repulsão no sistema, pode ocorrer a formação de flocos (floculação) ou de agregados (defloculação) na suspensão (NUTAN, REDDY, 2010; DOYE, MENAS, DAS, 2017).

A floculação é uma arquitetura do sistema resultante da diminuição das forças de repulsão entre as partículas dispersas no sistema, que tendem a atraírem-se, porém, fracamente. Sob essa condição, ocorre a formação de uma estrutura frouxamente agregada, conhecida como floco. Em uma suspensão floclada, as partículas estão conectadas umas às outras por interações fracas de longo alcance (Van der Waals) ou por adsorção. Como o floco é composto de muitas partículas individuais, a velocidade de sedimentação é sempre rápida. Os flocos têm estrutura porosa solta e o meio de dispersão pode fluir através deles durante a sedimentação. Embora os flocos se estabeleçam mais rapidamente do que as partículas discretas individuais, as partículas flocladas formam uma estrutura tipo treliça que resiste ao assentamento completo e, portanto, são menos propensas à compactação. Nas suspensões flocladas, a ressuspensão será favorecida e ocorrerá sobre agitação

gentil. Os flocos também retêm uma grande quantidade da fase líquida. Portanto, o volume do sedimento final será alto. A floculação é uma condição altamente desejável em uma suspensão farmacêutica, já que garante a uniformidade de dose (NASH, 2006; MANOHARAN, BASAKAR, SINGH, 2010; DOYE, MENAS, DAS, 2017).

Por outro lado, na suspensão defloculada as forças repulsivas superam as atrativas e as partículas permanecem como unidades separadas, permanecendo suspensas por um longo período, com sedimentação de pequena porção das partículas, devido a ação da gravidade. Durante a sedimentação, as partículas menores preenchem o vazio entre as maiores, comprimindo as partículas das camadas inferiores. Com o aumento da proximidade das partículas, há uma grande densidade de ligação de Van der Waals que levam à formação de sedimento rígido denominado *cake*, de difícil ressuspensão. Nas suspensões defloculadas a velocidade de sedimentação das partículas é lenta e a ressuspensão é difícil, requerendo agitação forte para que a barreira de energia seja rompida. Outra característica desta suspensão é que o sobrenadante permanece turvo por mais tempo, fato atribuído à sedimentação lenta das partículas (NASH, 2006; MANOHARAN, BASAKAR, SINGH, 2010; DOYE, MENAS, DAS, 2017). Um resumo comparativo das características dos sistemas floculados e defloculados é dado no Quadro 5. A relação que existe entre a floculação e as propriedades do sistema é representada na Figura 4.

Quadro 5. Resumo comparativo das propriedades das suspensões floculadas e defloculadas (Adaptado de NUTAN & REDDY, 2010)

Propriedade	Sistema floculado	Sistema defloculado
Partículas	Formam flocos	Permanecem separadas
Velocidade de sedimentação	Rápida	Lenta
Volume do sedimento	Alto	Baixo
Estrutura do sedimento	Frouxo	Rígido
Reconstituição	Fácil	Difícil
Sobrenadante	Límpido	Turvo

Neste contexto, quatro parâmetros importantes devem ser considerados no desenvolvimento farmacotécnico das suspensões com o objetivo de obter sistemas

floculados: 1. a granulometria e a distribuição granulométrica das partículas dispersas; 2. a viscosidade do meio dispersante; 3. a tensão superficial entre as partículas dispersas e o meio dispersante; e, 4. o potencial de superfície (NASH, 2006; MANOHARAN, BASAKAR, SINGH, 2010; NUTAN, READDY, 2010; DOYE, MENAS, DAS, 2017).

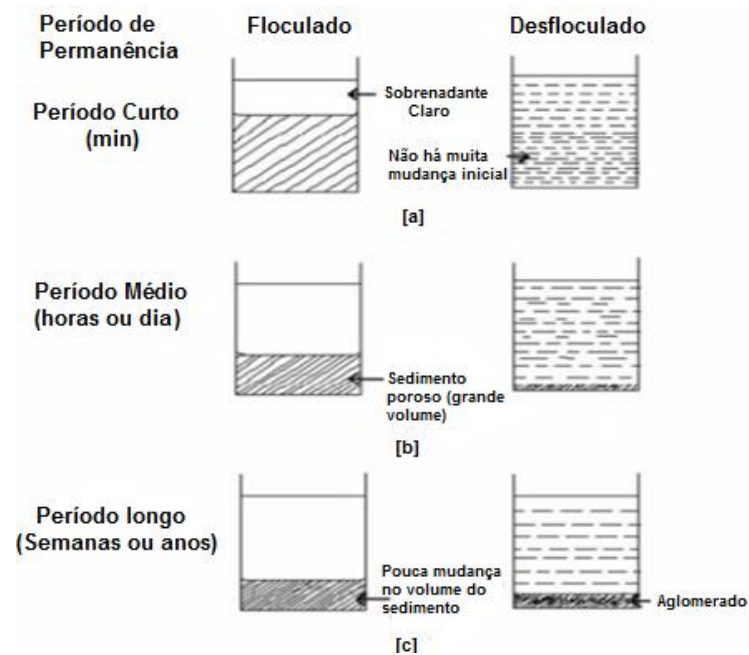


Figura 4. Características dos sistemas floculado e defloculado (Fonte: NASH *et al.*, 2006).

Granulometria:

Em suspensões com partículas de tamanho submicrométrico, o movimento Browniano mantém as mesmas dispersas. Todavia, partículas maiores sofrem o efeito da gravidade, especialmente se a diferença entre as densidades das partículas e do meio for alta. Contudo, quando as partículas são reduzidas excessivamente, a formação do *cake* pode ser favorecida em função do aumento da área superficial. Em suspensões mais concentradas, as interações partícula-partícula podem ser mais significativas, assim como presença de grande proporção de partículas menores, que podem ser mais solúveis e causarem aumento da viscosidade do meio. Assim, é importante também que a faixa de distribuição granulométrica das partículas seja estreita de forma a garantir uma sedimentação também mais uniforme. Cabe destacar a importância do tamanho das partículas

também para a biodisponibilidade dos fármacos: quanto menor o tamanho das partículas maior a velocidade de dissolução e melhor a biodisponibilidade dos fármacos (SAKUDA, 1992; NUTAN, READDY, 2010).

Outro fator a ser considerado acerca do tamanho das partículas é o fenômeno do crescimento de cristais, também conhecido como fenômeno de Ostwald. O tamanho das partículas em uma suspensão pode não permanecer constante ao longo do prazo de validade do produto, especialmente porque as partículas são, geralmente, polidispersas. Uma vez que a energia livre da superfície das partículas menores é maior, estas são mais solúveis no veículo, o que é afetado pela variação de temperatura no sistema: o aumento da temperatura promove maior solubilização enquanto a diminuição vai favorecer a recristalização e o crescimento dos cristais. Assim, flutuações na temperatura de armazenagem podem fazer com que ocorra aumento no tamanho das partículas e/ou alargamento das faixas de dispersão. O uso de colóides hidrofílicos pode impedir o crescimento de cristais (NUTAN, READDY, 2010; DOYE, MENAS, DAS, 2017).

Viscosidade do veículo:

A viscosidade do meio dispersante apresenta relação inversamente proporcional à velocidade de sedimentação: quanto maior a viscosidade do meio, mais lentamente as partículas se depositarão. Meios dispersantes não-Newtonianos oferecem estrutura resistente à sedimentação das partículas, ao contrário de veículos de comportamento Newtoniano. Assim, veículos com comportamento de fluxo pseudoplástico e plástico, para os quais é necessária aplicação de certa força para que o fluxo ocorra, são os mais adequados para o preparo das suspensões floculadas. O emprego de glicerina, xarope simples e solução de sorbitol oferece resistência ao fluxo. Contudo, veículos estruturados podem ser obtidos pela adição de agentes viscosantes (espessantes) na água, entre os quais se destacam as gomas, a gelatina e os derivados da celulose. Todavia, meios dispersantes muito viscosos podem comprometer o fluxo de saída do produto dos frascos ou comprometer a seringabilidade do produto, caso a suspensão seja de uso parenteral (ZATZ, 1985; NUTAN, REDDY, 2010; DOYE, MENAS, DAS, 2017).

Tensão interfacial:

Por último, partículas com elevada tensão superficial tendem a não se molhar adequadamente pelo meio dispersante, formando aglomerados porosos grandes no veículo ou permanecendo flutuando na superfície do veículo, apesar de sua alta

densidade, desfavorecendo a floculação controlada. Nestes casos, a adição de um agente tensoativo com valor de equilíbrio hidrófilo-lipófilo (EHL) adequado (preferencialmente entre 7 e 9), pode reduzir a tensão superficial existente entre as partículas e a fase dispersante, promovendo melhor molhabilidade e evitando a formação de agregados, facilitando a redispersão. Os principais tensoativos empregados são os polissorbitos e os ésteres de sorbitano, na concentração usual de 0,1 %p/V. Polímeros hidrofílicos, usados em baixas concentrações são capazes de formar uma camada em torno das partículas melhorando a molhabilidade das mesmas (MANOHARAN, BASAKAR, SINGH, 2010; NUTAN, REDDY, 2010; DOYE, MENAS, DAS, 2017).

Potencial de superfície:

Outro aspecto a ser considerado no delineamento das formulações das suspensões é o potencial de superfície que existe quando partículas sólidas dispersas em suspensão possuem carga em relação ao meio dispersante. Assim, se a suspensão contém eletrólitos, pode ocorrer adsorção seletiva de uma determinada espécie iônica nas partículas, que se tornarão carregadas, devendo as forças de atração e repulsão serem consideradas. Quando da presença de íons na superfície das partículas, existirão, na suspensão, os íons de determinação do potencial e seus contra-íons, abundantes na fase dispersante que circunda as partículas. Para tal, forma-se na suspensão uma dupla camada de íons, com a intenção de neutralizar as partículas carregadas e evitar a sedimentação e formação do *cake* (NUTAN, REDDY, 2010). O potencial zeta (ζ) fornece uma medida da magnitude das forças de repulsão existente entre partículas dispersas adjacentes, carregadas de forma semelhante. Se o potencial zeta é reduzido abaixo de um certo valor, que depende do sistema específico sob investigação, as forças de atração superarão as forças de repulsão e as partículas se juntarão para formar aglomerados frouxamente ligados (flocos), levando à floculação controlada do sistema. Partículas com alto potencial zeta e mesmo sinal de carga, seja positivo ou negativo, irão se repelir. Para corrigir o potencial zeta e favorecer a floculação, podem ser adicionados agentes eletrolíticos na suspensão, tais como os sais de sódio, cloretos, acetatos, fosfatos e citratos (ZATZ, 1985; NUTAN, REDDY, 2010).

Pelo exposto, a floculação controlada de um sistema pode ser alcançada pela combinação dos seguintes fatores: controle do tamanho das partículas, ajuste da viscosidade do veículo e adição de agentes promotores da floculação, que são os

eletrólitos, os tensoativos e os polímeros viscosantes. Exemplos destes excipientes já foram apresentados no Quadro 4. Portanto, durante o desenvolvimento farmacotécnico das suspensões, os seguintes ensaios devem ser realizados para avaliação da estabilidade e adequabilidade das mesmas: pH, tamanho de partícula, potencial zeta, viscosidade do veículo, volume de sedimentação e tempo de reconstituição.

2.5 Palatabilidade das formulações veterinárias

A via oral é a preferida para a administração de medicamentos em animais de companhia, especialmente cães e gatos, quando comparadas a outras rotas, em função da conveniência e comodidade para os animais e tratadores (YI, 2007). Entretanto, um dos principais fatores associados ao sucesso da farmacoterapia oral em animais é a adesão ao tratamento, o que pode ser conseguido quando o animal aceita voluntariamente o medicamento oferecido e seu tratador consegue administrar o mesmo com facilidade, uma vez que esta tarefa pode ser desafiadora, especialmente se o produto tem cheiro e sabor desagradáveis (PAYNE-JHONSON *et al.*, 2007; GOSSELIN *et al.*, 2010; PETRY *et al.*, 2014).

Um dos métodos de administração de formas farmacêuticas sólidas pela via oral é o chamado *poke-down* (puxão para baixo), no qual a medicação é colocada no dorso da língua do animal e sua garganta é massageada até que a forma farmacêutica seja engolida. Outra alternativa é esconder a medicação na comida do animal ou misturá-la com a comida ou bebida, práticas nem sempre eficazes, já que o animal pode comer a comida e deixar o produto, pode não aceitar o alimento ou bebida em função da alteração do sabor ou, pode não ingerir todo o conteúdo administrado. Portanto, a palatabilidade é um dos principais fatores a serem considerados no desenvolvimento de formulações orais para Pets (AHMED; KASRAIAN, 2002; THOMBRE, 2004; GOSSELIN *et al.*, 2010; PETRY *et al.*, 2014). Formulações orais que são voluntariamente aceitas por cães têm importância reconhecida na farmacoterapia veterinária, particularmente, no tratamento de condições crônicas (PAYNE-JHONSON *et al.*, 2007; HALOS *et al.*, 2015).

Em farmacotécnica, o termo “palatabilidade” relaciona-se à aceitação voluntária (livre escolha) de uma forma farmacêutica por parte dos pacientes

humanos ou animais. Na farmacotécnica veterinária, o termo é associado tanto à aceitação quanto à preferência do animal por determinado sabor e odor, que o leva a aceitar espontaneamente a medicação oferecida, sendo objeto de inúmeros estudos (PAYNE-JHONSON *et al.*, 2007; GOSSELIN *et al.*, 2010; HALOS *et al.*, 2015; PETRY *et al.*, 2014). Diferentes técnicas podem ser empregadas para mascarar o sabor e o odor desagradáveis das formulações farmacêuticas, tais como o revestimento do fármaco ou da forma farmacêutica com polímeros adequados, a complexação dos fármacos com ciclodextrinas, o encapsulamento em lipídios, a inibição temporária das papilas gustativas dos animais por excipientes especiais, tais como a cânfora e o mentol, ou a diminuição temporária da sensibilidade das papilas gustativas pelo resfriamento (SOHI *et al.*, 2004). Todavia, a alternativa mais simples para o desenvolvimento de uma formulação palatável é a adição de um agente flavorizante preferido pelo animal (THOMBRE, 2004; PETRY *et al.*, 2014; HALOS *et al.*, 2015).

Flavorizante pode ser definido como um excipiente que fornece sabor e odor característico a determinado produto, sendo que, em alguns casos, confere também alguma sensação física. A presença dos flavorizantes pode ser identificada pelos sentidos – paladar, olfato e tato (THOMBRE, 2004). Os processos de percepção do sabor, odor e textura envolvem estímulos químicos e físicos de receptores específicos, situados nos órgãos sensoriais envolvidos (língua e nariz). Sabe-se que existem cinco sabores primários, que são o doce, o azedo, o salgado, o amargo e o umami, sendo os mesmos característicos dos açúcares, dos ácidos, dos sais inorgânicos, de compostos nitrogenados, alcalóides e peptídeos, e, do glutamato monossódico e guanilato dissódico, respectivamente. Assim como os humanos, as diferentes espécies animais apresentam diferentes sensibilidades frente ao sabor e odor das preparações farmacêuticas, sendo que os cães são mais intolerantes ao odor desagradável do que ao sabor amargo, por exemplo. A seleção de um flavorizante adequado torna a preparação do sabor mais agradável ao paladar, pois, permite a imediata identificação de um sabor aceito e uma curta duração de um sabor residual desagradável (*aftertaste*) (AHMED; KASRAIAN, 2002; SOHI *et al.*, 2004).

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Materiais

- Complexo furazolidona: β -ciclodextrina; Laboratório de Produção Farmacêutica, UFES;
- Carboximetilcelulose sódica, Mapric;
- Metilparabeno, Mapric;
- Propilparabeno, Êxodo;
- Ácido etilenodiaminotetracético - EDTA, Dinâmica;
- Metabissulfito de sódio, Mapric;
- Tween[®] 80, Mapric;
- Propilenoglicol, Mapric;
- Flavorizante veterinário de bacon, Fragon;
- Dimetilformamida P.A, Neon.

3.2 Equipamentos

- Espectrofotômetro UV-VIS THERMO SCIENTIFIC, modelo Evolution 60S;
- Espectrofotômetro UV-VIS FEMTO, modelo 700PLUS;
- pHmetro MS TECNOPON, modelo mPA 210;
- Analisador de partículas e potencial zeta MALVERN INSTRUMENT, modelo Zetasizer HSA3000;
- Microscópio eletrônico de varredura JEOL, modelo JEM6610 LV;
- Viscosímetro rotacional BROOKFIELD, modelo LV-DVII + Pro.

3.3 Complexo furazolidona: β -CD (FZD: β -CD)

Para a realização do presente trabalho foi utilizado o complexo de inclusão furazolidona: β -ciclodextrina (FZD: β -CD) cedido pelo Laboratório de Produção Farmacêutica do CCENS/UFES. O complexo de inclusão foi preparado no referido Laboratório, empregando o método de malaxagem, na razão de massa 1:2

(CARVALHO *et al.*, 2018). A técnica de malaxagem é usualmente empregada na preparação de complexos no estado sólido, especialmente quando o fármaco é pouco solúvel ou praticamente insolúvel em água, como é caso da furazolidona. O método foi escolhido por ser simples, de fácil execução e apresentar rendimento elevado (CHEIRSILP; RAKMAI, 2016).

O sucesso da complexação foi confirmado pelos métodos de microscopia eletrônica de varredura, espectrofotometria na região do infravermelho por transformada de Fourier, calorimetria exploratória diferencial, análises termogravimétricas e ressonância magnética nuclear de carbono e hidrogênio. Em seguida, a atividade leishmanicida foi avaliada medindo a redução de corante de resazurina após incubação das formas promastigotas de *Leishmania amazonensis* com FZD livre e complexos sob diferentes concentrações e a toxicidade foi avaliada por ensaio MTT empregando linhagens de macrófagos. O complexo mostrou ser atóxico e a quantidade necessária para matar 50% das formas promastigotas (IC₅₀) de *Leishmania amazonensis* foi de 6,16 µg/mL, o equivalente a 2,053 µg/mL de fármaco puro. O incremento da solubilidade da FZD pela associação com a β-CD, determinado mediante método da isoterma de solubilidade, foi de 1,68 vezes, com eficiência de complexação inferior a 100% (CARVALHO *et al.*, 2018).

3.4 Abrangência dos experimentos e resultados

As seguintes etapas foram definidas para a execução da presente pesquisa: 1. Delineamento e preparados veículos para obtenção das suspensões reconstituídas; 2. Estudo da viscosidade e do comportamento reológico dos veículos; 3. Obtenção da suspensão; 4. Avaliação da estabilidade física da formulação; 5. Validação da metodologia de análise e doseamento do fármaco.

3.5 Métodos

3.5.1 Delineamento e manipulação dos veículos

Inicialmente, foram preparados os veículos puros. Foram selecionados para inclusão na formulação os excipientes usualmente empregados no preparo de suspensões reconstituídas. Para o preparo, o EDTA e o metabissulfito de sódio foram dissolvidos em cerca de 70% do volume total de água purificada da formulação e, à esta mistura, foram adicionados os conservantes previamente dissolvidos em cerca de 3,0 mL de propilenoglicol, sob ligeiro aquecimento. Em seguida, a carboximetilcelulose sódica foi dispersa sobre o veículo, sob agitação constante, até completa dispersão. O tensoativo foi disperso na mistura e o volume foi completado com água purificada. Foram preparados veículos com 4 concentrações diferentes de CMC-Na: 0,3% p/v, 0,4% p/v, 0,5% p/v e 0,6% p/v. Os veículos foram denominados SUSP1, SUSP2, SUSP3 e SUSP4.

Para o preparo da suspensão medicamentosa, o complexo FZD: β -CD (60 mg/mL) foi incorporado no veículo puro escolhido, mediante levigação prévia com parte do veículo, utilizando gral e pistilo. A pasta assim obtida foi transferida para o cálice de vidro e o restante do veículo puro foi adicionado. Quantidade suficiente do flavorizante de bacon foi adicionado e o volume foi completado para com água purificada. A suspensão foi homogeneizada, envasada em frasco âmbar de boca larga e armazenada sob refrigeração.

3.5.2 Avaliação da estabilidade física da suspensão

3.5.2.1 Determinação do pH

O pH dos veículos puros e da suspensão reconstituída foi determinado por potenciometria, mediante inserção do eletrodo diretamente nas amostras. Foi empregado potenciômetro digital com eletrodo de vidro (MS TECNOPON, modelo mPA 210). As medidas foram feitas em triplicata e o resultado foi expresso como a média e o desvio padrão.

3.5.2.2 Avaliação da viscosidade e do comportamento reológico do veículo

A viscosidade aparente dos veículos foi determinada empregado viscosímetro rotacional digital (BROOKFIELD, modelo LV-DVII + Pro, USA). As análises foram realizadas utilizando o adaptador para pequenas quantidades de amostra (Sample Adapter, modelo 13R), a 25° C. A leitura foi efetuada a 20 rpm, com torque de aproximadamente 60%. O resultado é a média de 12 determinações tomadas a cada 10 segundos, com períodos de equilíbrio de 120 segundos. A avaliação do comportamento reológico do veículo foi realizada mediante plotagem do gráfico da viscosidade (cP) em função da taxa de cisalhamento (s^{-1}), com intervalos de 30 segundos para estabilização da amostra, tomadas no intervalo de 2 a 100 rpm.

3.5.2.3 Estudo da morfologia das partículas do complexo

A morfologia das partículas do complexo foi pesquisada empregando a técnica de microscopia eletrônica de varredura (MEV) em microscópio eletrônico de varredura (JEOL, modelo JEM6610 LV), utilizando filamento de tungstênio sob aceleração de 20keV. O material foi metalizado com ouro (20 mPA, 120s), em metalizador DESK V (modelo Denton Vacuum). As análises foram realizadas no Laboratório de Ultraestrutura Celular Carlos Alberto Redins do Departamento de Morfologia da Universidade Federal do Espírito Santo - UFES.

3.5.2.4 Estudo da granulometria das partículas

O diâmetro das partículas, a dispersão granulométrica e o índice de polidispersão foram determinados por espalhamento dinâmico de luz, após diluição das amostras cerca de 10 vezes em água purificada, em equipamento Zetasizer (MALVERN, modelo HSA 3000, UK), em varredura realizada entre 0,375 μm e 2000 μm . As medidas foram executadas a temperatura de 25° C, e os resultados, apresentados como média de 3 repetições. Foram calculados, pelo software do equipamento, os valores da frequência da distribuição de tamanho ($d_{25\%}$, $d_{50\%}$, $d_{75\%}$ e

d_{90%}). Os ensaios de granulometria foram realizados no Laboratório de Tecnologia Farmacêutica da Universidade Federal de Minas Gerais – UFMG.

A partir destes dados, o índice de polidispersão (IP) para o tamanho das partículas foi definido, empregando a Equação 1 onde, IP = índice de polidispersão, d_{90%} = frequência de tamanho de 90% das partículas (µm), d_{50%} = frequência de tamanho de 50% das partículas (µm), e d_{10%} = frequência de tamanho de 10% das partículas (µm).

$$IP = \frac{d_{90\%} - d_{10\%}}{d_{50\%}} \quad [\text{Equação 1}]$$

3.5.2.5 Medida do potencial zeta

O potencial zeta foi determinado através do princípio de mobilidade eletroforética em equipamento Zetasizer (HSA 3000, MALVERN INSTRUMENT, UK), em triplicata, com alíquotas diluídas 10 vezes em água destilada, empregando banho ultrassônico. A técnica foi executada a temperatura de 25° C em ângulo de 90°. Os ensaios foram realizados no Laboratório de Tecnologia Farmacêutica da Universidade Federal de Minas Gerais – UFMG.

3.5.2.6 Pesquisa do tempo de redispersão

Para determinação do tempo de redispersão foi utilizada a metodologia descrita por Kulshreshtha e colaboradores (2006). A formulação foi mantida em repouso, em proveta graduada, até completa sedimentação. Em seguida, a proveta foi agitada, através de movimentos verticais de 180°, até a completa redispersão. O tempo de redispersão foi cronometrado, sendo expresso em segundos. O resultado foi expresso como a média de três determinações.

3.5.2.7 Análise do volume de sedimentação

Para avaliação do volume de sedimentação, foram utilizadas provetas graduadas de 50 mL, para as quais a suspensão foi transferida e mantida em repouso. O volume do sedimento formado foi medido diretamente na proveta, nos tempos de 2, 4, 8, 24 e 48 horas. O volume de sedimentação (F) em porcentagem foi calculado de acordo com a Equação 2, onde, V_f é volume final do sedimento e V_0 é o volume inicial da suspensão (RAJ; ANGELA, 2011).

$$F = \frac{100 \times V_f}{V_0} \quad \text{[Equação 2]}$$

3.5.3 Desenvolvimento e validação de metodologia para doseamento do fármaco

A metodologia analítica foi validada de acordo com RDC nº 166, de 24 de julho de 2017 e consistiu na avaliação das seguintes figuras de mérito: seletividade, linearidade, sensibilidade, precisão, exatidão e robustez (BRASIL, 2017).

3.5.3.1 Seletividade

Para a avaliação da seletividade foram preparadas soluções padrão de furazolidona (8,0 µg/mL) e de β-ciclodextrina (0,001 M), utilizando dimetilformamida como diluente. Além dos materiais de partida foram analisados o veículo da suspensão e dimetilformamida. Os Espectros de varredura das amostras foram obtidos entre 200 e 600 nm, em espectrofotômetro UV-Vis THERMO (modelo EVO 300 PC).

3.5.3.2 Linearidade

Para a determinação da linearidade do método, pesou-se o equivalente a 0,10 g de furazolidona e dissolveu-se em 250 mL de dimetilformamida (DMF). Posteriormente, 5 mL desta solução foi diluída em 250 mL de água (solução estoque). Alíquotas da solução estoque foram diluídas em água para obter concentrações correspondentes a 2,6; 3,2; 4,5; 5,1; 5,8; 6,4; 8,0 µg/mL. As soluções resultantes foram lidas em espectrofotômetro a 362 nm e as absorvâncias correspondentes registradas. A curva de calibração foi elaborada empregando-se Software Excell (Microsoft, 2007). Os critérios de linearidade para aceitação da curva foram os coeficientes de correlação e a equação da reta ($y = ax + b$).

3.5.3.3 Sensibilidade

A sensibilidade do método foi expressa a partir da determinação do Limite de Detecção (LD) e Limite de Quantificação (LQ). Estes foram calculados a partir da curva analítica da seguinte forma:

$$LD = 3,3 \times (\sigma/S) \quad [\text{Equação 3}]$$

$$LQ = 10 \times (\sigma/S) \quad [\text{Equação 4}]$$

onde, σ é o desvio padrão do intercepto com o eixo y; e, S é a inclinação da curva analítica.

3.5.3.4 Precisão

A precisão foi avaliada através do estudo dos parâmetros repetibilidade, precisão intermediária e reprodutibilidade. Para o estudo de repetibilidade, nove concentrações foram escolhidas, contemplando o intervalo linear do método, ou seja, três concentrações, baixa, média e alta, avaliados com 3 repetições cada. O ensaio foi realizado em curto período de tempo, com o mesmo analista e empregando o mesmo espectrofotômetro utilizado para obtenção da curva analítica (THERMO, 60S Evolution). No estudo da precisão intermediária, as mesmas determinações realizadas no estudo da repetibilidade foram tomadas, empregando o

mesmo espectrofotômetro. Todavia, as leituras foram realizadas em dias distintos e por analistas diferentes. Para estudo da reprodutibilidade, foram mantidos os parâmetros analisados anteriormente, empregando-se outro espectrofotômetro (FEMTO, modelo 700 Plus). O ensaio foi realizado em triplicata e os resultados expressam a média dos valores obtidos e o desvio padrão relativo (coeficiente de variação).

3.5.3.5 Exatidão

O estudo de exatidão foi realizado empregando nove concentrações do fármaco (três concentrações baixas, médias e altas, no intervalo linear do método), que foram dissolvidas em Dimetilformamida. As concentrações foram lidas em espectrofotômetro THERMO (modelo 60S Evolution) a 362 nm. As determinações foram feitas em triplicata. A exatidão é expressa pela relação entre a concentração experimental e a concentração teórica, como apresentado na Equação 5.

$$\text{Exatidão} = \frac{\text{Concentração média experimental} \times 100}{\text{Concentração teórica}} \quad [\text{Equação 5}]$$

3.5.3.6 Robustez

Para avaliação da robustez, procedeu-se como descrito para avaliação da exatidão, porém, utilizou-se lotes diferentes de FZD e alterou-se o pH do meio por meio da adição de NaOH 0,01 M.

3.5.3.7 Doseamento da furazolidona

Para o doseamento do fármaco na suspensão, após homogeneização da formulação, tomou-se, exatamente, 5,0 mL da preparação (equivalente a 300 mg de complexo e a 100 mg de FZD), que foram dispersos em 5,0 mL de água destilada. Em seguida, 500 mL de dimetilformamida foram adicionados e a solução foi agitada

por 10 minutos (agitador magnético DiagTech, modelo DT3120H). A solução foi então transferida para balão volumétrico de 1000 mL e volume foi completado com o mesmo solvente. Em seguida, 5,0 mL da solução recém-preparada foram transferidos para balão volumétrico de 100,0 mL e o volume foi completado com água destilada. A leitura foi realizada em espectrofotômetro UV-Vis (THERMO, 60s Evolution), a 362 nm. O experimento foi feito em triplicata e foram realizadas três repetições de leituras. Os resultados foram expressos como a média e desvio padrão.

3.5.3.7 Análise estatística

O ensaio de linearidade foi realizado através da análise de regressão linear utilizando método dos mínimos quadrados dos pontos médios de três cruvas. Através da análise de variância (ANOVA) o modelo linear da curva foi testado, utilizando o programa estatístico SISVAR®, considerando-se o nível de significância de 0,05.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Obtenção do veículo

Um dos desafios para os farmacêuticos que atuam no setor de desenvolvimento farmacotécnico é idealizar formas farmacêuticas adequadas às necessidades terapêuticas de cada paciente, inclusive, dos animais (ALLEN, 2002; THOMPSON, 2013). Suspensões são formas farmacêuticas de escolha para a veiculação de fármacos insolúveis ou parcialmente solúveis no veículo, quando as doses requeridas para administração são usualmente elevadas (25 a 100 mg/mL) (NASH, 2006; YARNYKH *et al.*, 2017). A composição qualitativa e quantitativa dos veículos testados é dada na Tabela 1.

Tabela 1. Composição qualitativa e quantitativa dos veículos e função farmacotécnica dos excipientes.

Componentes	Quantidade (%p/V)	Função farmacotécnica
Carboximetilcelulose sódica	0,3 a 0,6	Espessante
Metilparabeno	0,15	Conservante
Propilparabeno	0,05	Conservante
EDTA	0,15	Complexante
Metabissulfito de sódio	0,15	Antioxidante
Polissorbato 80	0,0 e 0,5	Tensoativo
Propilenoglicol	3,0	Cossolvente
Flavorizante de bacon	QS	Flavorizante
Água purificada	QSP 100,0	Veículo

Os veículos foram preparados em pequena escala, empregando excipientes reconhecidos como seguros (GRAS - *Generally Recognized as Safe*), cujas monografias se encontram devidamente inscritas no *Handbook of Pharmaceutical Excipients* e, têm seus empregos aprovados para uso em formulações farmacêuticas veterinárias pelas agências *Food and Drug Administration* (FDA) e *European Medicines Agency* (EMA) (FAHMY & MATINEZ, 2017). As quantidades empregadas

de cada excipiente foram aquelas sugeridas no *Handbook of Pharmaceutical Excipients* (ROWE, SHESKEY & QUINN, 2001).

Como mencionado anteriormente, o incremento na solubilidade do fármaco pela sua associação com a β -CD foi considerado baixo (1,68 vezes), o que justifica a incorporação do complexo na suspensão. Ainda, justificam a escolha da forma farmacêutica suspensão, a possibilidade de flexibilização de doses de acordo com o volume a ser administrado, além da possibilidade de flavorização do veículo, o que pode favorecer a aceitação do medicamento pelo animal e contribuir para o sucesso da farmacoterapia da LCC, uma vez que a FZD possui sabor amargo (THOMBRE, 2004; ALLEN, ANSEL, POPOVICH, 2013; YARNYKH *et al.*, 2017).

Há relatos na literatura acerca do preparo de suspensões a partir de fármacos complexados com ciclodextrinas. Munkaew e colaboradores (2016) prepararam suspensões de uso oftálmico contendo complexos formados entre o telmisartan e a γ -ciclodextrina, utilizando hidroxipropilmetilcelulose como agente espessante e relataram o sucesso na obtenção de suspensões estáveis. Pamudji e colaboradores (2014) prepararam suspensões a partir da cefixima complexada com a β -ciclodextrina (1:2) com o intuito de inibir a hidrólise do fármaco e permitir a preparação de uma suspensão reconstituída empregando tampão como veículo. Apesar de obterem suspensões fisicamente estáveis, a complexação não foi eficaz na proteção do fármaco contra a hidrólise. Anjana e colaboradores (2014) prepararam suspensões contendo o complexo albendazol:hidroxipropil- β -ciclodextrina, utilizando um veículo preparado a partir da CMC-Na (0,75 a 1,0% p/V) e o polissorbato 80 (1% p/V) e obtiveram suspensões mais estáveis na presença de complexos preparados na proporção 1:1,5.

No presente trabalho, além da complexação, que pode mascarar o sabor desagradável de fármacos, foi empregado flavorizante de uso veterinário sabor bacon na tentativa de melhorar a palatabilidade da formulação e assegurar a aceitação da suspensão pelos animais. Cães preferem os sabores associados à carnes, doces, óleos fixos e queijos, sendo os flavorizantesbacon, bacon, frango, calabresa, fígado, manteiga de amendoim, óleo de fígado de bacalhau, melaço, mel, caramelo, marshmellow e queijo, os preferidos destes animais (ALLEN, 2002).

4.2 Avaliação da viscosidade e do comportamento reológico do veículo

Em formulações de suspensões consideradas ideais, as partículas sólidas devem permanecer dispersas de maneira uniforme no veículo na forma de aglomerados frouxos (flocos) e, quando em repouso, não deve haver a formação de agregado rígido, devendo a redispersão ocorrer rapidamente. Assim, uma suspensão bem formulada deve se redispersar uniformemente na fase contínua sob agitação moderada e permanecer floclada por um período de tempo suficiente, de forma a garantir a retirada da quantidade correta do produto do frasco, com vistas a garantir a uniformidade de dose (NASH, 2006; NUTAN, REDDY, 2010; DOYE, MENAS, DAS, 2017). Entre os parâmetros que podem promover a floclação controlada e a sedimentação no sistema, destaca-se o controle da viscosidade por meio da adição de agentes viscosantes (ou espessantes), também denominado agente suspensor. No entanto, produtos que são muito viscosos não escoam facilmente dos frascos e têm sua retirada e administração dificultadas (AULTON; TAYLOR, 2016). Portanto, apresenta-se como um desafio para o formulador, encontrar um agente viscosante adequado à obtenção de uma suspensão com taxa de sedimentação e facilidade de redispersão apropriadas (YARNYKH *et al.*, 2017). Entre os excipientes usualmente utilizados para tal finalidade destacam-se os derivados da celulose, como a metilcelulose, a hidroxietilcelulose, a hidroxipropilcelulose, a hidroxipropilmetilcelulose, a celulose microcristalina, a carboximetilcelulose e a carboximetilcelulose sódica (CMC-Na).

No presente trabalho, foram preparados veículos com 4 concentrações diferentes do espessante: 0,3% p/V, 0,4% p/V, 0,5% p/V e 0,6% p/V. Os veículos foram denominados SUSP1, SUSP2, SUSP3 e SUSP4. Pode-se observar que o aumento da concentração do espessante provocou elevação da viscosidade dos veículos, o que era esperado. Todavia, não foi possível determinar a viscosidade do veículo SUSP4, preparado a partir de 0,6% p/V de CMC-Na, empregando o *spindle* escolhido para o teste, na velocidade proposta, sugerindo uma viscosidade muito elevada para o sistema, o que não é interessante, já que produtos com viscosidade muito elevadas podem ter sua retirada dos frascos prejudicada e a velocidade de sedimentação e ressuspensão comprometidas, o que é indesejável. Os valores da viscosidade e do comportamento reológico dos mesmos podem ser vistos na Tabela 2.

Tabela 2. Valores da viscosidade (cP) das amostras dos veículos medidas à 30 rpm, empregando *spindle* 34, determinados à temperatura ambiente

	SUSP 1	SUSP 2	SUSP 3	SUSP 4
Viscosidade (cP)	403,91	909,81	1.643,65	ND

ND = não determinado.

Após análise dos resultados da viscosidade, o comportamento reológico dos veículos SUSP1, SUSP2 e SUSP3 empregando *spindle* 34, foi pesquisado, no intervalo de 10 a 120 rpm. Os reogramas dos veículos estudados podem ser vistos na Figura 5.

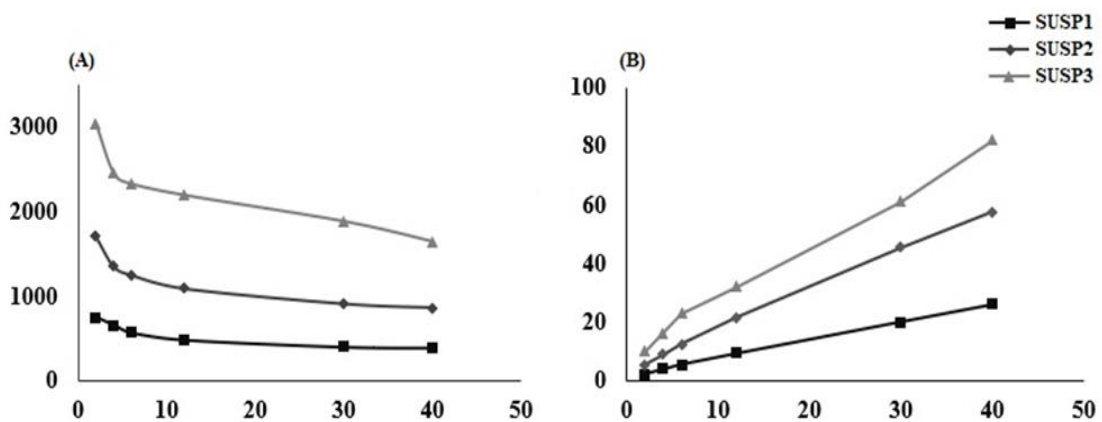


Figura 5. Curva de viscosidade (A) e reogramas (B) de suspensões de veículos obtidas utilizando splinder 34, à 25°C.

O comportamento reológico característico dos sistemas dispersos é o não-Newtoniano, que pode ser classificado em dois grupos: independente do tempo e dependente do tempo. São dependentes do tempo, os sistemas fluidos com comportamento plástico e, são independentes do tempo, os fluidos pseudoplásticos e os dilatantes (ALLEN, ANSEL, POPOVICH, 2013; AULTON; TAYLOR, 2016). Segundo KULSHRESHTHA e colaboradores (2006), suspensões floculadas tendem a apresentar comportamento não-Newtoniano pseudoplástico, ou seja, possuem viscosidade elevada quando em repouso e uma baixa tensão de cisalhamento para vencer essa atração, com redução da viscosidade após a aplicação de uma força. A análise dos reogramas dos veículos estudados indica que os mesmos possuem comportamento pseudoplástico, uma vez que a viscosidade diminuiu com o aumento da velocidade de cisalhamento, o que é desejável para as suspensões farmacêuticas. Moghimipour e colaboradores (2013) prepararam suspensões de

acetaminofeno empregando CMC-Na como espessante e encontraram resultados semelhantes bem como Kurjii e Gawhari (2017), que empregaram CMC-Na a 0,5% p/V sozinha ou associada com HPMC, no preparo de suspensões de prednisolona e obtiveram comportamentos reológicos similares ao observado no presente trabalho.

O veículo denominado SUSP3, preparado a partir de 0,5% p/V de CMC-Na, foi o que apresentou característica mais apropriada ao objetivo pretendido, uma vez que a viscosidade encontrada foi a mais elevada entre as 3 analisadas, o que pode favorecer a sedimentação. Suspensões preparadas a partir de um veículo com viscosidade aparente alta e baixa tensão de cisalhamento são mais propensas a apresentarem sedimentação adequada, uma vez que as partículas tendem a permanecer suspensas durante o armazenamento ao mesmo tempo que a agitação do frasco promoverá diminuição da viscosidade o suficiente para garantir seu escoamento (AULTON; TAYLOR, 2016). A CMC-Na é um agente viscosante útil em uma variedade de aplicações industriais, incluindo os setores de alimentos, medicamentos e cosméticos, em função da sua boa capacidade espessante mesmo em baixas concentrações. O excipiente origina veículos estruturados nos quais as partículas permanecem dispersas e com a formação de flocos (YANG *et al.*, 2007; MASTROPIETRO, NIMROOZI, OMIDIAN, 2013).

Um dos problemas encontrados no preparo das suspensões farmacêuticas é a baixa molhabilidade das partículas do fármaco no veículo, o que é dificultado pela sua natureza hidrofóbica e pela presença de partículas muitas pequenas, uma vez que estas apresentam energialivre de superfície mais elevada (ALLEN, ANSEL, POPOVICH, 2013; AULTON; TAYLOR, 2016). Assim, quando não ocorre uma molhagem adequada das partículas as mesmas tendem a flutuar, o que compromete a estabilidade física e a uniformidade de dose. Nestes casos, a adição de tensoativos no sistema pode reduzir a tensão interfacial sólido-líquido e melhorar a molhabilidade (YARNYKH *et al.*, 2017). Para melhorar a molhabilidade do complexo no veículo, o polissorbato 80 foi empregado como tensotativo.

4.3 Manipulação da suspensão e pesquisa da estabilidade física

As suspensões podem ser apresentadas na forma de pó para reconstituição mediante adição de água ou já reconstituídas no veículo, como proposto. A suspensão medicamentosa contendo o complexo FZD:β-CD na concentração de 60

mg/mL, o equivalente à presença de 20 mg/mL de furazolidona na formulação, foi obtida mediante incorporação do complexo no veículo SUSP3. A suspensão assim obtida apresentou cor amarelo-intensa, característica do fármaco (Figura 6).



Figura 6. Fotografia representativa da suspensão reconstituída em veículo SUSP3, contendo o complexo na concentração de 60 mg/mL.

Na análise visual da suspensão reconstituída, não foi observada a formação de grumos ou material flutuando no sobrenadante, que se mostrou límpido após 24 horas. A redispersão foi fácil não ocorrendo a formação de *cake*.

Além da compatibilidade química com os demais componentes da formulação e da concentração a ser utilizada, um fator que determina o sucesso do uso do viscosante é o pH do veículo, uma vez que cada um apresenta estabilidade e viscosidade máxima em dado valor de pH (ROWE, SHESKEY; QUINN, 2001). Para a CMC-Na, a concentração usualmente empregada é de 0,1 a 5,0% p/V e a faixa de pH desejável é entre 5,0 e 10,0 (YARNYKH *et al.*, 2017). Os valores de pH do veículo puro e da suspensão, determinados no dia seguinte após o preparo de ambos, foram 5,60 ($\pm 0,04$) e 6,00 ($\pm 0,02$), respectivamente. Pode-se observar que o valor do pH encontrado para o veículo puro está em conformidade com a faixa de pH desejável para o uso da CMC-Na na formulação e, ainda, que a incorporação do complexo no veículo não alterou o pH significativamente, o que é desejável. Apesar de não haver relatos na literatura acerca do preparo e uso de complexos FZD: β -CD, o fármaco puro pode ser encontrado nas formas farmacêuticas comprimido e

suspensão, com uso recomendado para o tratamento da giardíase e diarreia infecciosa, tanto em humanos como em animais. Mesmo descontinuados no Brasil e nos Estados Unidos, os produtos ainda são comercializados em países como Chile, Argentina, México e Espanha, entre outros. Segundo monografia da furazolidona suspensão, disponível na Farmacopeia Americana 29ª edição (2012), o pH do produto deve-se compreender entre 6,0 e 8,5. No presente trabalho, o valor do pH encontrado para a suspensão está em conformidade com o esperado.

Outro importante fator que exerce influência na estabilidade física das suspensões farmacêuticas e, conseqüentemente, na uniformidade de doses, é o tamanho das partículas dispersas. Tal parâmetro apresenta relação diretamente proporcional à velocidade de sedimentação: quanto menor o tamanho das partículas menor será a velocidade de sedimentação das mesmas (NUTAN, READDY, 2010; DOYE, MENAS, DAS, 2017; YARNYKH *et al.*, 2017). Dados da frequência de distribuição granulométrica das partículas podem ser vistos na Tabela 3.

Tabela 3. Frequência de distribuição do diâmetro das partículas do complexo na suspensão.

	< 10%	< 25%	< 50%	< 75%	< 90%
Diâmetro (μm) (\pm DP)	1,70 (\pm 0,07)	3,69 (\pm 0,30)	7,92 (\pm 0,55)	17,27 (\pm 2,15)	30,86 (\pm 4,82)

As suspensões farmacêuticas são consideradas dispersões grosseiras, nas quais as partículas têm diâmetro compreendido entre 1 μm e 50 μm e devem se distribuir em uma estreita faixa granulométrica, de forma a garantir uma sedimentação uniforme (NASH, 2016; PIMPLE *et al.*, 2017). O valor do diâmetro médio encontrado para as partículas foi de 12,12 μm (\pm 11,18 μm). Já os valores da dispersão granulométrica encontrados se referem à média dos diâmetros de partículas nos intervalos abaixo de 10%, 25%, 50%, 75% e 90% na curva de distribuição de tamanho, permitindo observar que 90% das partículas apresentaram diâmetro inferior a 30,86 μm enquanto 50% apresentaram diâmetro inferior a 7,92 μm . Os resultados encontrados estão em conformidade com o esperado. Segundo Yarnykh e colaboradores (2017), a maior parte das partículas nas suspensões farmacêuticas não deve ter diâmetro superior a 40 μm .

O valor do índice de dispersão calculado foi 3,68, indicando a existência de uma ampla faixa de distribuição de tamanho das partículas, caracterizando o sistema como polidisperso, o que é comprovado pelas fotomicrografias por microscopia eletrônica de varredura obtidas do complexo (Figura 7), que evidenciam a presença de partículas de morfologia irregular de tamanho heterogêneo. Costa e colaboradores (2015) prepararam suspensões de sulfasalazina na concentração de 50 mg/mL em veículo contendo CMC-Na a 0,3% p/V e polissorbatato 80 a 0,5% p/V e obtiveram valores de IP que variaram de 2,38 a 3,87, considerados altos pelos autores.

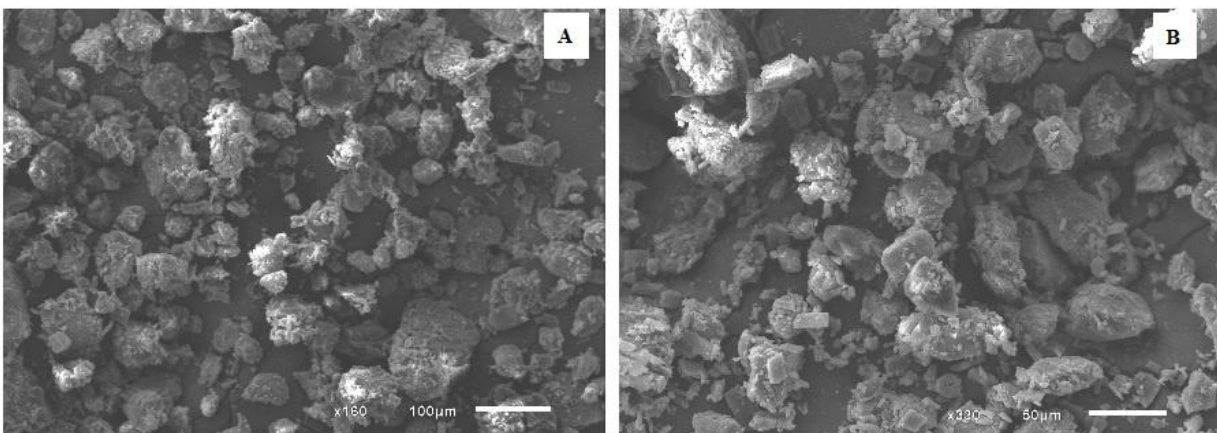


Figura 7. Fotomicrografias representativas do complexo FZD:β-CD obtidas por microscopia eletrônica de varredura com magnificação de 160 vezes (A) e 330 vezes (B), sob aceleração de 20 keV.

Outro parâmetro que afeta a estabilidade física das suspensões é potencial de superfície ou potencial zeta (ζ), que pode ser entendido como a medida da carga superficial das partículas sólidas em relação ao meio (veículo) (BERG *et al.*, 2009). Partículas pequenas em valores mais baixos de ζ as partículas terão menor tendência à repulsão e formação de agregados rígidos, pois, em sistemas adequadamente floculados, as forças de atração predominam e as mesmas tendem a formar aglomerados frouxos de fácil redispersão (NUTAN; REDDY, 2010). Segundo Cai e colaboradores (2006) suspensões com valores de potencial zeta superiores a +30 mV ou inferiores a -30 mV são estáveis, enquanto que aquelas cujos valores de ζ se situam entre de -30 mV e +30 mV são instáveis, podendo flocular. O valor ζ encontrado para a suspensão foi -59 mV ($\pm 8,10$ mV) (Figura 8), considerado adequado. Raj e Angela (2011) compararam a estabilidade de diferentes suspensões de albendazol disponíveis comercialmente e observaram que os valores de potencial zeta variaram de -64 mV a -38 mV para partículas com

diâmetro médio de 13,3 μm e 27 μm , respectivamente, e, que as suspensões mais estáveis foram aquelas que apresentaram maiores valores de ζ . Para Costa e colaboradores (2015) valores de ζ entre -39 e -48 mV encontrados para suspensões de sulfassalazina em veículo semelhante ao do presente estudo foram considerados adequados.

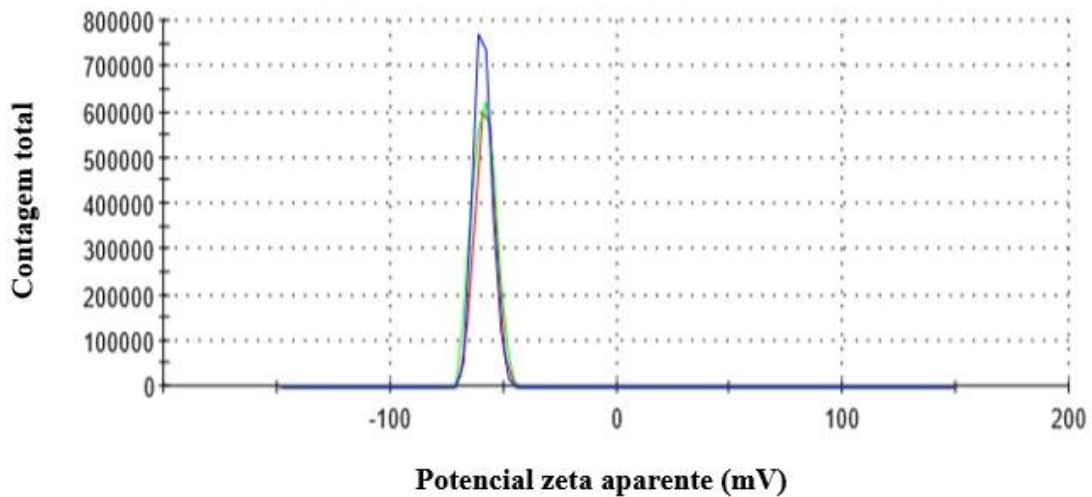


Figura 8. Curvas do potencial zeta obtidas para a suspensão preparada no veículo SUSP3, determinadas em pH 6,0.

Os ensaios para determinação do volume de sedimentação e do tempo de redispersão são os mais importantes na avaliação da estabilidade física de suspensões, já que indicam se no momento da administração produto será fornecida uma dose precisa do medicamento ao paciente.

O volume de sedimento formado foi determinado em função do tempo e os resultados são apresentados na Tabela 4. Pode-se observar que, nas 4 primeiras horas de avaliação, não houve formação de sedimento e a suspensão permaneceu reconstituída. Após 8 horas, um alto volume de sedimento ainda foi observado ($F=98\%$) e, somente após 24 horas de estudo, ocorreu diminuição no volume do sedimento formado, que passou a ser baixo ($F=24\%$), sendo a sedimentação considerada lenta. Ao final do ensaio de sedimentação, o tempo de redispersão foi medido e o valor encontrado foi de 14 segundos, sendo a suspensão de fácil redispersão e isenta de aglomerado rígido, não requerendo agitação intensa para que a reconstituição ocorresse. Observou-se a formação de um sobrenadante límpido, isento de partículas isoladas em suspensão ou flutuando e de cor amarelo

clara, sugerindo que parte do fármaco pode ter se dissolvido no veículo (Figura 9).

Tabela 4. Volume de sedimento (F%) formado na suspensão durante 48 horas

Tempo (horas)	2	4	8	24	48
F	100	100	98	24	28



Figura 9. Imagem representativa da suspensão durante o ensaio para determinação do volume de sedimentação: (A) após 2 horas; e, (B) ao final de 48 horas.

Rao e colaboradores (2004), prepararam suspensões contendo complexos celocoxibe: β -ciclodextrina, obtidos nas proporções 1:1 e 1:2 a partir de diferentes métodos, incorporados em veículo baseado na CMC-Na (1,0% p/V) e no polissorbat 80 (0,1% p/V). As formulações foram comparadas com aquela obtida a partir do fármaco puro e os autores observaram que aquelas contendo complexos apresentaram maior estabilidade física e maior porcentagem de fármaco liberada. Panda e colaboradores (2010), prepararam suspensões contendo nimesulida complexada com diferentes proporções de β -CD pelo método de malaxagem, empregando veículo contendo concentrações variadas de CMC-Na (0,25, 0,50, 0,75 e 1,0% p/V) e polissorbat 80. Segundo os autores, a formulação preparada a partir de 0,75 do espessante foi a que apresentou melhor estabilidade física, com volume de sedimentação de 0,46 após 48 horas e o menor número de ciclos até a completa reconstituição. Os autores também observaram que as suspensões preparadas com complexos contendo maior proporção de β -CD (1:1,5) originaram as suspensões mais estáveis. Panda e colaboradores (2011), realizaram um estudo semelhante a

partir de complexos norfloxacina: β -CD e obtiveram resultados também semelhantes, com maior estabilidade para as suspensões contendo o complexo preparado na proporção 1:1,5. Para Costa e colaboradores (2015), suspensões de sulfassalazina contendo CMC-Na a 0,3% p/V e polissorbato 80 a 0,5% p/V apresentaram volume de sedimento de 1 nas primeiras 12 horas de ensaio e de 0,35 após 8 dias, sendo a sedimentação considerada lenta. Os autores encontraram tempo de reconstituição inferior a 60 segundos.

4.4 Validação de metodologia analítica para doseamento da furazolidona na formulação

No presente trabalho foi o emprego da espectrometria na região do ultravioleta foi proposto para realizar o doseamento do fármaco complexado na formulação. No entanto, não há descrição de tal metodologia na literatura o que requer a necessidade de validá-lo. A validação de métodos se constitui como etapa essencial para assegurar que o método analítico escolhido seja preciso, específico e exato, eliminando eventuais variáveis. Um determinado método é considerado validado quando suas características apresentam conformidade com requerimentos pré-estabelecidos, demonstrando que o método analítico é adequado ao proposto, especialmente, no caso de adaptação de metodologias (BRITO *et al.*, 2003). Assim, os seguintes atributos do método foram pesquisados: seletividade, linearidade, limite de quantificação, limite de detecção, precisão, exatidão e robustez.

De acordo com a BRASIL (2017), a seletividade é a capacidade do método em detectar o analito de interesse mesmo na presença de outros componentes que podem estar presentes na amostra, como impurezas, diluentes ou componentes da matriz. No presente trabalho foi avaliado somente a influência dos componentes da matriz. Para a realização do ensaio, foram obtidos espectros de varredura do fármaco, da β -ciclodextrina, bem como do veículo SUSP3, todos solubilizados na dimetilformamida (DMF), solvente definido na Farmacopeia Americana 29ª edição para doseamento da FZD pura em suspensões. Como pode ser observado na análise dos espectros (Figura 10), o método espectrofotométrico apresentou seletividade no comprimento de onda de leitura da furazolidona ($\lambda = 362$ nm), demonstrando não haver interferência da β -ciclodextrina e dos demais componentes

do veículo no comprimento de onda máxima de absorção do fármaco, comprovando a seletividade do método.

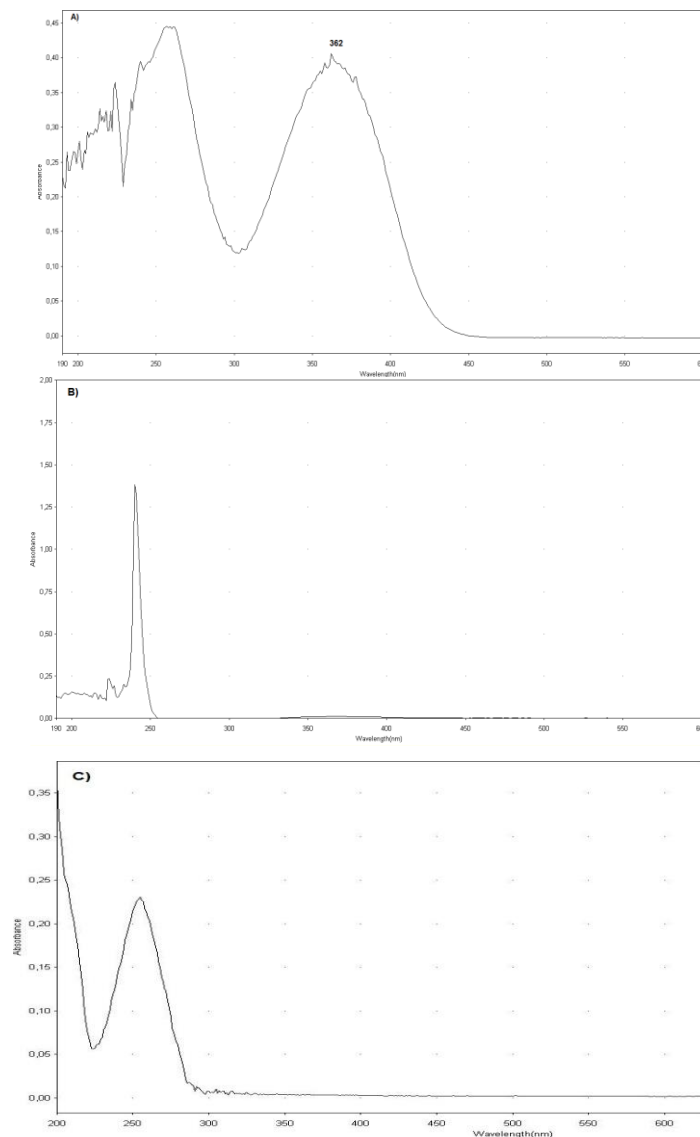


Figura 10. Espectros na região do UV-Vis entre 200 e 600 nm da furazolidona (A), do veículo SUSP3 puro (B) e da β -ciclodextrina (C) em dimetilformamida.

A linearidade de um método deve ser demonstrada por meio da sua capacidade de gerar resultados linearmente proporcionais à concentração do analito em uma amostra, dentro de um intervalo definido (BRASIL, 2017). O coeficiente de correlação (r) é frequentemente usado para indicar o grau de variação linear entre duas variáveis quantitativas. Este coeficiente varia entre valores de -1 e 1 sendo quanto mais próximo destes valores, maior a associação entre duas variáveis. Por outro lado, quando mais próximo de zero, menor a correlação (BRITO *et al.*, 2003). Os resultados dos pontos das três curvas de linearidade foram plotados em um único gráfico (linearidade final), apresentado na Figura 11.

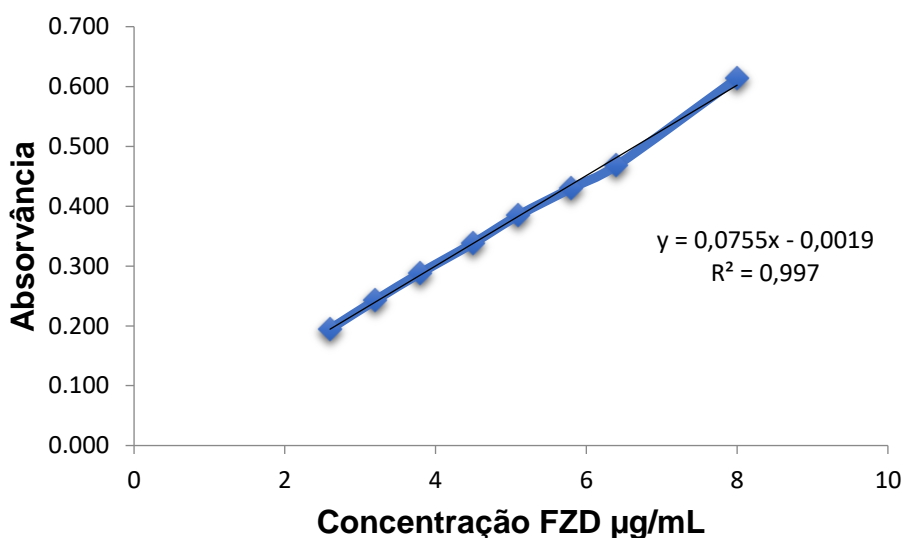


Figura 11. Curva analítica da furazolidona em dimetilformamida, determinada a 362 nm, na concentração de 2,6 a 8,0 µg/mL.

A equação da reta obtida foi $y = 0,0755x - 0,0019$ e o coeficiente de correlação foi 0,997, podendo-se inferir que existência uma correlação fortíssima entre a absorvância e a concentração do analito (BRITO *et al.*, 2003). Os dados obtidos da análise da variância das curvas de calibração, estão mostrados na Tabela 5.

Tabela 5. Confirmação da linearidade pelo método espectrofotométrico por ANOVA.

Fonte	SQ	GL	QM	F	F-Crítico
Modelo(reg)	0,380689	1	0,380689	5966,91	4,30
Residual(res)	0,001405	22	0,0000638	Curva Linear	
Falta deajuste(faj)	0,001085	6	0,000181	90,390	2,66
Erro	0,00032	16	0,000002	Não há falta deajuste	
Total	0,3818	23			

A análise da variância (ANOVA) permite avaliar a linearidade do método e a validade da regressão (POLONINI *et al.*, 2011). O teste F considera a relação de variâncias de amostras, ou seja, a relação dos quadrados dos desvios padrão (GIL, 2010). Através do teste F é possível confirmar o modelo linear da curva, considerando a hipótese de que o coeficiente angular da curva seja diferente de zero, o valor de F calculado deve ser maior que o F crítico ou de significação. Nesse

caso, o valor encontrado para F calculado foi de 5966,91 e o F de significação ou crítico igual 4,30, confirmando assim, a regressão nas três curvas de calibração. Neste caso, pode-se afirmar, com 95% de confiança, que o modelo é linear e que a inclinação da reta não é nula.

Uma vez determinada a linearidade do método, os limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) podem ser mensurados. A menor concentração do analito que pode ser detectada na amostra, mas não necessariamente quantificada, constitui o limite de detecção. Por outro lado, o limite de quantificação é demonstrado pela menor quantidade do analito em uma amostra que pode ser determinada com precisão e exatidão aceitáveis (BRASIL, 2017; BRITO *et al.*, 2003). Para a determinação de LD e LQ, pode-se utilizar os valores dos coeficientes angular e linear das curvas analíticas obtidas nas três análises realizadas e, para realização do cálculo. Os valores encontrados no presente trabalho para LD e LQ foram 0,059 µg/mL e 0,176 µg/mL, respectivamente. Na Tabela 6 podem ser vistos os resultados obtidos no ensaio de repetibilidade.

Tabela 6. Resultados do teste de precisão (repetibilidade).

Concentração FZD µg/mL	Absorvância 1	Absorvância 2	Absorvância 3	Média	Desvio Padrão
2,6	0,162	0,166	0,163	0,164	0,002
3,0	0,171	0,170	0,172	0,171	0,001
3,5	0,253	0,254	0,252	0,253	0,001
4,5	0,338	0,342	0,348	0,345	0,005
5,0	0,391	0,377	0,376	0,381	0,008
5,5	0,425	0,432	0,429	0,429	0,004
6,5	0,523	0,519	0,526	0,523	0,004
7,5	0,560	0,568	0,562	0,563	0,004
8,0	0,608	0,613	0,608	0,610	0,003
				Média	0,382
				DPM	0,004
				DPR (%)	1,20

A proximidade entre várias medidas efetuadas em uma mesma amostra é definida como a precisão do processo analítico, sendo usualmente expressa, como o desvio-padrão relativo (DPR) ou como o coeficiente de variação (CV) existente entre as diversas medidas (BRITO *et al.*, 2003). O estudo de precisão é feito através da avaliação da proximidade dos resultados obtidos em uma série de medidas de uma

mesma amostra, podendo ser considerada no nível de repetibilidade, precisão intermediária e reprodutibilidade (BRASIL, 2017).

A repetibilidade expressa a precisão existente sob mesmas condições de análise, no que diz respeito ao equipamento usado, ao analista que executa as análises, aos reagentes utilizados, e, as condições ambientais de execução do ensaio, considerando um pequeno espaço de tempo entre as análises. Para a precisão intermediária, o DPR calculado foi de 0,89% e 0,85% para os analistas 1 e 2 (Tabela 7). Já no ensaio de reprodutibilidade, o DPR calculado foi de 1,2% (Tabela 8).

Tabela 7. Resultado de precisão intermediária obtidos pelos analistas 1 e 2.

Concentração FZD µg/mL	Absorvância 1	Absorvância 2	Absorvância 3	Média	Desvio Padrão
Analista 1					
2,6	0,147	0,152	0,153	0,151	0,003
3,0	0,167	0,164	0,167	0,166	0,002
3,5	0,198	0,197	0,201	0,199	0,002
4,5	0,254	0,262	0,264	0,260	0,005
5,0	0,286	0,286	0,288	0,287	0,001
5,5	0,345	0,346	0,345	0,345	0,001
6,5	0,449	0,453	0,453	0,452	0,002
7,5	0,477	0,486	0,486	0,483	0,005
8,0	0,501	0,507	0,508	0,505	0,004
				Média	0,316
				DPM	0,003
				DPR (%)	0,89
Concentração FZD µg/mL	Absorvância 1	Absorvância 2	Absorvância 3	Média	Desvio Padrão
Analista 2					
2,6	0,187	0,185	0,188	0,187	0,002
3,0	0,215	0,215	0,216	0,215	0,001
3,5	0,253	0,249	0,257	0,253	0,004
4,5	0,329	0,339	0,330	0,333	0,006
5,0	0,372	0,375	0,372	0,373	0,002
5,5	0,411	0,423	0,412	0,415	0,007
6,5	0,475	0,472	0,481	0,476	0,005
7,5	0,575	0,578	0,576	0,576	0,002
8,0	0,602	0,605	0,599	0,602	0,003
				Média	0,381
				DPM	0,003
				DPR (%)	0,85

DPM= Desvio Padrão Médio

DPR= Desvio Padrão Relativo

Tabela 8. Resultados do ensaio de precisão (reprodutividade)

Concentração FZD µg/mL	Absorvância 1	Absorvância 2	Absorvância 3	Média	Desvio Padrão
2,6	0,206	0,208	0,201	0,205	0,004
3,0	0,223	0,234	0,238	0,232	0,008
3,5	0,262	0,266	0,268	0,265	0,003
4,5	0,339	0,328	0,323	0,330	0,008
5,0	0,372	0,375	0,372	0,373	0,002
5,5	0,407	0,412	0,406	0,408	0,003
6,5	0,501	0,508	0,497	0,502	0,006
7,5	0,554	0,551	0,548	0,551	0,003
8,0	0,612	0,601	0,608	0,607	0,006
				Média	0,386
				DPM	0,005
				DPR (%)	1,20

DPM= Desvio Padrão Médio DPR= Desvio Padrão Relativo

No resultado do ensaio de repetibilidade, o DPR calculado foi de 0,92%. A precisão intermediária expressa, por sua vez, as variações no mesmo laboratório que envolvem diferentes dias, diferentes analistas e diferentes equipamentos, principalmente. Já a reprodutibilidade se refere aos resultados obtidos quando a análise é feita sob condições diferentes, especialmente, no que diz respeito ao equipamento empregado.

De acordo com a RDC 166/2017 (BRASIL, 2017) o valor de DPR obtido nos parâmetros definidos para a precisão não pode ultrapassar 2%. No presente trabalho, o maior valor de DPR observado foi 1,2%, o que permite concluir que o método proposto pode ser considerado preciso para a análise quantitativa da furazolidona complexada na suspensão e, que o método não sofre influências do analista que o executa, do equipamento utilizado ou do período no qual é realizado.

O método escolhido para determinação da exatidão foi o teste de recuperação e os resultados encontrados podem ser vistos na Tabela 9.

Tabela 9. Porcentagens recuperadas (RC%) de FZD complexada obtidas no ensaio de exatidão.

Concentração teórica(µg/mL)	Concentração determinada (µg/mL)	RC(%)
2,6	2,5	103,9
3,0	2,9	104,0

			(Continuação)
3,5	3,4		103,4
4,5	4,4		101,2
5,0	5,0		100,3
5,5	5,6		99,1
6,5	6,4		102,2
7,5	7,7		97,4
8,0	8,0		99,5

RC= Recuperação

A exatidão é definida como a concordância entre o valor real do analito na amostra e o valor estimado pelo processo analítico. Os resultados obtidos demonstram que o método em estudo pode ser considerado exato para a análise quantitativa de FZD, pois o limite estabelecido pela RDC 166/2017 é de (80-120%) para todos os níveis de concentração e os valores encontrados mantiveram-se entre 99,0% e 104,0%.

A robustez de um método analítico é a medida de sua capacidade em resistir a pequenas e determinadas variações dos parâmetros analíticos mensurados, em função de parâmetros como pH, temperatura, lotes, entre outros. O atributo indica a confiança durante o uso do método e sua avaliação deve ser sempre levada em consideração (BRASIL, 2017). Os resultados encontrados no ensaio de robustez podem ser vistos nas Tabelas de 10 a 12.

Tabela 10. Resultados obtidos no do ensaio de robustez em pH 8,54, utilizando o fármaco do lote (MKCB2249V).

Concentração FZD µg/mL	Absorvância 1	Absorvância 2	Absorvância 3	Média	Desvio Padrão
2,6	0,192	0,192	0,193	0,192	0,001
3,0	0,234	0,235	0,236	0,235	0,001
3,5	0,284	0,284	0,284	0,284	0,000
4,5	0,327	0,326	0,326	0,326	0,001
5,0	0,378	0,379	0,378	0,378	0,001
5,5	0,406	0,406	0,407	0,406	0,001
6,5	0,480	0,480	0,479	0,480	0,001
7,5	0,546	0,548	0,546	0,547	0,001
8,0	0,602	0,604	0,603	0,603	0,001
				Média	0,381
				DPM	0,005
				DPR (%)	0,18

Tabela 11. Resultados obtidos no do ensaio de robustez em pH 9,22, utilizando o fármaco do lote (MKCG7803).

Concentração FZD µg/mL	Absorvância 1	Absorvância 2	Absorvância 3	Média	Desvio Padrão
2,6	0,195	0,195	0,194	0,195	0,001
3,0	0,254	0,253	0,254	0,254	0,001
3,5	0,286	0,288	0,287	0,287	0,001
4,5	0,325	0,326	0,328	0,326	0,002
5,0	0,383	0,384	0,383	0,383	0,001
5,5	0,415	0,417	0,416	0,416	0,001
6,5	0,504	0,509	0,502	0,505	0,004
7,5	0,552	0,552	0,554	0,553	0,001
8,0	0,612	0,612	0,615	0,613	0,002
				Média	0,392
				DPM	0,001
				DPR (%)	0,33

DPM= Desvio Padrão Médio

DPR= Desvio Padrão Relativo

Para avaliação da robustez, faz-se necessário realizar as análises sob condições variadas de estudo. No presente trabalho, variou-se tanto o pH da suspensão e o lote do fármaco em estudo (lote MKCB2249V e lote MKCG7803). O pH medido para a furazolidona solubilizada na solução utilizada no doseamento (DMF e água purificada) foi de 8,54 e o valor foi ajustado para 9,22, a fim de investigar a influência desta variação nos resultados. Após execução das quantificações, os DPR encontrados foram de 0,18% e 0,33% respectivamente, como demonstrado nas Tabelas 10 e 11, o que indica que a variação de pH não acarretou mudanças significativas no teor da amostra. Para o lote diferente do fármaco analisado também não foi observado mudanças no teor da amostra, visto que o DPR encontrado foi de 0,46% (Tabela 12). Sendo que os DPR obtidos foram inferiores a 1%.

Tabela 12. Resultados obtidos no do ensaio de robustez utilizando o fármaco com número de lote (MKCG7803).

Concentração FZD µg/mL	Absorvância 1	Absorvância 2	Absorvância 3	Média	Desvio Padrão
2,6	0,211	0,211	0,214	0,212	0,002
3,0	0,230	0,235	0,235	0,233	0,003
3,5	0,281	0,282	0,282	0,284	0,001
4,5	0,318	0,319	0,320	0,319	0,001

(Continuação)

5,0	0,333	0,337	0,336	0,336	0,002	
5,5	0,393	0,397	0,398	0,396	0,003	
6,5	0,446	0,460	0,457	0,458	0,002	
7,5	0,532	0,534	0,533	0,533	0,001	
8,0	0,595	0,594	0,596	0,595	0,001	
					Média	0,374
					DPM	0,002
					DPR (%)	0,46

DPM= Desvio Padrão Médio

DPR= Desvio Padrão Relativo

4.5 Doseamento do fármaco complexado na suspensão

Para que um medicamento seja considerado quimicamente estável, o fármaco nele contido deve manter sua integridade e o teor declarado deve permanecer dentro de limites especificados (FORMULÁRIO NACIONAL, 2011). A perda da estabilidade química pode ser determinada tanto por fatores intrínsecos e extrínsecos e levar à alteração na concentração do fármaco, acarretando prejuízos para a uniformidade de dose. Adicionalmente, produtos de decomposição podem ser tóxicos, trazendo riscos para o paciente (ANSEL, ALLEN, POPOVICH, 2013; AULTON, 2016).

O limite geralmente aceito para a decomposição química dos fármacos nos produtos farmacêuticos é de, no máximo, 10%, sendo que os produtos de decomposição devem ser identificados e seus efeitos sejam previamente conhecidos (FORMULÁRIO NACIONAL, 2011). Ainda, de acordo com a Farmacopeia Americana 29ª edição (2011), o teor de furazolidona em suspensões deve compreender-se entre 90 e 110%. Por outro lado, o teor do analito presente na forma farmacêutica deve ficar entre 80% e 120%. Após análise pelo método proposto para quantificação do fármaco, o teor médio encontrado, após 3 determinações, foi de 5,2 µg/mL (DP ± 0,015), o que representa um valor de 104,7% do total de fármaco esperado, estando, portanto, em conformidade com o preconizado em ambas as literaturas consultadas.

5. CONCLUSÕES

No presente trabalho, foi obtida uma suspensão contendo o complexo FZD: β -CD na concentração de 60 mg/mL disperso em veículo estruturado, preparado a partir da CMC-Na na concentração a 0,5% p/v e contendo 0,5% p/v de polissorbato 80. A suspensão reconstituída apresentou estabilidade física adequada: a formulação apresentou aspecto elegante, se mostrou isenta de aglomerados rígidos, de partículas flutuando e com sobrenadante límpido após 24 horas de sedimentação. O volume de sedimento nas primeiras 8 horas de estudo foi de 98% e o tempo para a completa reconstituição da suspensão, após agitação leve, foi de 14 s. A suspensão apresentou valor de potencial zeta de -59 mV e as partículas apresentaram tamanho médio inferior a 40 μ m. Ambas as condições são consideradas desejáveis para as suspensões farmacêuticas.

No que diz respeito ao doseamento do fármaco complexado na suspensão, o método proposto no presente estudo se mostrou válido por apresentar seletividade, limite de detecção e quantificação, precisão, exatidão e robustez em conformidade com o estabelecido. O teor de fármaco encontrado na suspensão foi de, aproximadamente, 105%.

Como perspectiva, os estudos da estabilidade química tanto do complexo quanto da suspensão serão delineados. Testes de estabilidade intrínseca do fármaco complexado, estudo da estabilidade da formulação em diferentes condições de armazenagem, e o teste de dissolução na suspensão serão realizados, com vistas a obter um produto com qualidade assegurada para a realização de ensaios pré-clínicos e clínicos em animais.

6. REFERÊNCIAS

AHMED, I.; KASRAIAN, K. Pharmaceutical challenges in veterinary product development. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v.54, p.871–882, 2002.

ALAM, M., PAGET, T.; ELKORDY, A.A. Formulation and advantages of furazolidone in liposomal drug delivery systems. **European Journal of Pharmaceutical Science**, v.10, n.84, p.139-145,2016.

ALVAR, J.; YACTAYO, S.; BERN, C. Leishmaniasis and poverty. **Trends Parasitology**, v.22, n.12 p.7-552, 2006.

ALLEN J.R.; ANSEL, H. C.; POPOVICH, N.G. **Formas Farmacêuticas e Sistemas de Liberação de Fármacos**. 9ªed., São Paulo: Artmed, 2013.

ANJANA, M.N.; JIPNOMON, J.; NAIR, S.C.; Solubility and bioavailability enhancement of albendazole by complexing with hydroxy propyl β cyclodextrin. **Journal of Chemical and Pharmaceutical Research**, v. 7, n.4, p.1131-1141, 2015.

AULTON, M.E.; TAYLOR, K.M.G. **Delineamento de formas farmaceuticas**. 4ª ed. Rio de Janeiro: Elsevier. 2016.

BAÑULS, A.L.; BASTIEN, P.; POMARES, C.; AREVALO, J.; FISA, R.; HIDE, M.Clinical pleiomorphism in human leishmaniasis, with special mention of asymptomatic infection. **Clinical Microbiology and Infection**, v.17, n.10, p.1451–1461, 2011.

BERG, J.M.; ROMOSER, A.; BANERJEE, N.; ZEBDA, R.; SAYES,C. Therelationship between pH and zeta potential of ~ 30 nm metal oxide nanoparticle suspensions relevant to in vitro toxicological evaluations. **Nanotoxicology**, v.3, n.4, p.276–283, 2009.

BERMAN, J.D.; LEE, L.S. Activity of oral drugs against Leishmania Tropica in human macrophages in vitro. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v.32,p.947-951, 1983.

BOSQUESI, P.L.; ALMEIDA, A.E.; BLAU, L.; MENEGON, R.F.; SANTOS, J.L.;CHUNG, M.C. Toxicidadede fármacos nitrofurânicos. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 29, n.3, p. 231-238, 2008.

BRASIL, M. Guia de Vigilância epidemiológica / Ministério da Saúde, Secretária de Vigilância em Saúde. 6.ed. Brasília: Ministério da Saúde, 2005.

BRASIL, Ministério da Saúde. Secretária de Vigilância em Saúde. Manual de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar Americana / Ministério da Saúde, Secretária de Vigilância em Saúde. – 2. Ed. Atual. – Brasília: Editora do Ministério da Saúde,

2013.

BRASIL ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução da Diretoria Colegiada - RDC Nº 166, 24/07/2017 . Guia para validação de métodos analíticos Julho, 2017.

BREWSTER, M.E.; LOFTSSON, T. Cyclodextrins as pharmaceutical solubilizers. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v.59, n.7, p.645-66, 2007.

BRITO, N.M. AMARANTE JUNIOR, O.P.; POLESE, L.; RIBEIRO, M.L. Validação de Métodos Analíticos: Estratégia e Discussão. **Revista de Ecotoxicologia e Meio Ambiente**, v.13, 2003.

CAI, K.; ODE, M.; MURAKAMI, H. Influence of polyelectrolyte dispersants on the surface chemical properties of aluminum in aqueous suspension. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, p.284–285 458–463, 2006.

CARVALHO, S.G.; SIQUEIRA, L.A.; ZANINI, M.S.; MATOS, A.P.S.; QUARESMA, C.H.; SILVA, L.M.; ANDRADE, S.F.; SEVERI, J.A.; VILANNOVA, J.C.O. Physicochemical and *in vitro* biological evaluations of furazolidone-based β -cyclodextrin complexes *in Leishmania amazonensis*. **Research in Veterinary Science**, v.119, p.143-153, 2018.

CHEIRSILP, B.; RAKMAI, J. Inclusion complex formation of cyclodextrin with its guest and their applications. **Biology Engineering Medicine**, v.2, n.1 p.1-6, 2016.

COSTA FILHO, A.V.; LUCAS, I.C.;SAMPAIO, R.N.R. Estudo comparativo entre miltefosina oral e antimoniato de N-metil glucamina parenteral no tratamento da leishmaniose experimental causada por *Leishmania (Leishmania) amazonensis*. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.4, n.4, p.424-427, 2008.

COSTA, M.A.B., VILLA, A.L.V.; BARROS, R.C.S.A., RICCI-JÚNIOR, E., SANTOS, E.P. Development, characterization and evaluation of the dissolution profile of sulfasalazine suspensions. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v.51, n.2, 2015.

CROFT, S.L.; SEIFERT, K.; YARDLEY, V. Current scenario of drug development for leishmaniasis. **Indian Journal of Medical Research**, v.123, n.3, p. 399-410, 2006.

CUNHA-FILHO, M.S.S.; BARRETO, L.C.L.S. Utilização de ciclodextrinas na formação de complexos de inclusão de interesse farmacêutico. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v.28, n.1, p.1-9, 2007.

DANTAS-TORRES, F. Canine vector-borne diseases in Brazil. **Parasites & Vector**, v.1, n.25, p.1-17, 2008.

DAVIDSON, G. Veterinary Compounding: Regulation, Challenges, and Resources. **Pharmaceutics**, v.9, n.5, p.1-11, 2017.

DAVIS, M.E.; BREWSTER, M.E. Cyclodextrin-based pharmaceuticals: past, present and future. **Nature Reviews Drug Discov**, v.3, n.12, p.35-1023, 2004.

DORLO, T.P.C.; BALASEGARAM, M.; BEIJNEN, J.H.; VRIES, P.J. Miltefosine: a review of its pharmacology and therapeutic efficacy in the treatment of leishmaniasis. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v.67, n.11, p.2576–2597, 2012.

DOYE, P.; MENAS, T.; DAS, N. Formulation and bio-availability parameters of pharmaceutical suspension. **International Journal of Current Pharmaceutical Research**, v.9, n.3, p.8-14, 2017.

EISIG, J.N.; SILVA, F.M.; RODRIGUEZ, T.N.; HASHIMOTO, C.L.; CORREA BARBUTI, R.C. A furazolidone-based quadruple therapy for helicobacter pylori retreatment in patients with peptic ulcer disease. **Clinics**, v.60, n.6, p.485-8, 2005.

Espírito Santo. **Secretaria de Estado da Saúde (SESA-ES)**. Plano Estadual de Saúde 2012/2015. Disponível em: <<http://saude.es.gov.br/Media/sesa/NEVE/LLEISHMANIOSES.pdf>>. Acesso em: 18 de Maio. 2018.

FAHMY, R.M.; MATINEZ, M. **Principles of Pharmaceuticals and Veterinary Dosage Forms**. In: Veterinary Pharmacology and Therapeutics, 10th Edition. CRC Press. 2017.87p.

FALQUETO, A.; SESSA, P.A.; FERREIRA, A.L.; VIEIRA, V.P.; SANTOS, C.B.; VAREJÃO, F.B.; CUPPLILLO, E.; PORROZZI, R.; CARVALHO-PAES, L.E.; GRIMALDI JÚNIOR, G. Epidemiological and Clinical Features of *Leishmania (Viannia) braziliensis* American Cutaneous and Mucocutaneous Leishmaniasis in the State of Espírito Santo, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v.98, n.8, p.1003-1010, 2003.

FALQUETO, A.; COURA, J.R.; BARROS, G.C.; GRIMALDI FILHO, G.; SESSA, P.A.; CARIAS, V.R.D. Participaton of the dog in the cicle of transmission of cutaneous leishmaniasis in the Municipality of Viana, State of Espírito Santo, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.81, p.155-163, 1986.

FIGUEREDO, L.A.; PAIVA-CAVALCANTI, M.; ALMEIDA, E.L.; BRANDÃO-FILHO, S.P.; DANTAS-TORRES, F. Clinical and hematological findings in *Leishmania braziliensis*- infected dogs from Pernambuco, Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinaria**, v.21, n.4, p.418-420, 2012.

FORMULÁRIO Nacional da Farmacopeia Brasileira. 2ª ed. Brasília: ANVISA. 2011.
GIL, E. S. **Controle Físico-Químico de Qualidade de Medicamentos**. São Paulo: Editora Phamabooks, 2010. 511 p.

GONTIJO, B.; CARVALHO, M.L.R. Leishmaniose tegumentar americana. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.36, n.1, p.71-80, 2003.

GOSSELIN, J.; MAITLAND, T.P.; CIVIL, J. Relative preference of dogs for two

commercial oral tablet formulations of carprofen. **Revue de Médecine Vétérinaire**, v.161, n.2, p.67-71, 2010.

GUEDES, F.L.; ALVES, G.M.C.; SANTOS, F.L.A.; LIMA, L.F.; ROLIM, L.A.; ROLIM NETO, P. Ciclodextrinas: como adjuvante tecnológico para melhorar a biodisponibilidade de fármacos. **Revista Brasileira de Farmácia**, v.89, n.3, p.220-225, 2008.

HALOS, L.; CARITHERS, D.S.; SOLANKI, R.; STANFORD, H.; GROSS, S.J. Preference of Dogs between Two Commercially Available Oral Formulations of Ectoparasiticide Containing Isoxazolines, Afoxolaner or Fluralaner. **Open Journal of Veterinary Medicine**, v.5, p.25-29, 2015.

HEUSSER JÚNIOR, A.; BELLATO, V.; SOUZA, A.P.; MOURA, A.B.; SARTOR A.A.; SANTOS, E.G.O.B.; SILVA V.L. Leishmaniose tegumentar canina no município de Balneário Camboriú, Estado de Santa Catarina. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.43, n.6, p.713-718, 2010.

HUNDER, G.; SCHMID, A.; MAYRING, L. Investigation on the metabolic degradation of the side chain of furazolidone. **Archives of Toxicology**, v.61, n.2, p.161-3, 1987.

IBATIBA. Decreto Municipal nº. 65, de 09 de Maio de 2017. Declara Situação de Emergência em Saúde Pública Municipal em razão de surto de Doença Infecciosa (Casos Confirmados de Leishmaniose). 2017.

JECFA. **Evaluations of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives**. Disponível em: <http://www.fao.org/fileadmin/user_upload/vetdrug/docs/41-5-furazolidone.pdf> Acesso em: 28set.2018.

JESUS, J.R. **Avaliação sorológica de anticorpos para *Leishmania spp.* através da reação de imunofluorescência indireta em população canina da região da Lomba do Pinheiro, cidade de Porto Alegre, RS, Brasil, a partir de casos autóctones humanos de Leishmaniose tegumentar**. 2006. 80f. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) – Faculdade de Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2006.

JIANG, X.; SUN, L.; QIU, J.J.; SUN, X.; LI, S.; WANG, X.; SO, C.W.; DONG, S. A Novel Application of Furazolidone: Anti-Leukemic Activity in Acute Myeloid Leukemia. **Plos One**, v.8, p.8, 2013.

KULSHRESHTHA, A. K.; MAITI, A. K.; CHOUDHARY, M. S.; RAO, K. V. Nano-Addition of Raw Bentonite Enhances Polypropylene (PP) Properties. **Journal Applied Polymer Science**, v.99, p.1004-1009, 2005.

KURJI, A.S., GAWHAR, A. Characterization and formulation of prednisolone acetate reconstituted suspension. **Journal of Pharmacy Research**, v.11, n.7, p.815-822, 2017.

LAINSON, R.; SHAW, J.J. Leishmaniasis in Brazil: V. Studies on the epidemiology of

cutaneous leishmaniasis in Mato Grosso state, and observations on two distinct strains of *Leishmania* isolated from man and forest animals. **Transactions Royal Society Tropical Medicine Hygiene**, v.64, n.5, p.654-667, 1970.

LAURENTI, M.D. **Patologia e patogenia das leishmanioses**. 2010. 85f. Tese. (Doutorado em Patologia) – Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.

LE PONT, F.; MOLLINEDO, S.; MOUCHET, J.; DESJEUX, P. Leishmaniose em Bolívia. IV – Le Chien dans les cycles des leishmanioses on Bolívia. **Memórias Instituto Oswaldo Cruz**, v.84, p.391-392, 1989.

LOFTSSON, T.; JARHO, P.; MÁSSON, M.; JÄRVINEN, T. Cyclodextrins in drug delivery. **Expert Opinion on Drug Delivery**, v.2 n.2, p.335-351, 2005.

LOBENBERG, R.; AMIDON, G.L. Modern bioavailability, bioequivalence and biopharmaceutics classification system. New scientific approaches to international regulatory standards. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v.50, b.1, p.3-12, 2000.

LYRA, M.A.M.; ALVES, L.D.S.; FONTES, D. A. F.; SOARES-SOBRINHO, J. L.; ROLIM-NETO, P.J. Ferramentas analíticas aplicadas à caracterização de complexos de inclusão fármaco-ciclodextrina. **Revista Ciências Farmacêutica Básica Aplicada**, v.31, n.2, p.117-124, 2010.

MADEIRA, M.F.; SCHUBACH, A.O.; SCHUBACH, T.M.; PEREIRA S.A.; FIGUEIREDO, F.B.; BAPTISTA, C.; LEAL, C.A.; MELO, C.X.; CONFORTI, E.M.; MARZOCHI, M.C. Post mortem parasitological evaluation of dogs seroreactive for *Leishmania* from Rio de Janeiro, Brazil. **Veterinary Parasitology**, v.138 n.3-4, p.366- 370, 2006.

MADDISON, J.E.; PAGE, S.W.; CHURCH, D.B. **Farmacologia clínica de pequenos animais**. Rio de Janeiro: Elsevier, – 2. ed. Rio de Janeiro, 2010.

MASTROPIETRO, D.; NIMROOZI, R.; OMIDIAN, H. Rheology in Pharmaceutical Formulations-A Perspective. **Journal Developing Drugs**, v.2, n.2, p.1-6, 2013.

MAPA (MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO). Nota Técnica nº11/2016. **Coordenação de Fiscalização de Produtos Veterinários**. Bairro Zona Cívico-Administrativa - DF, 2016.

MIRANDA, J.C.; MARTINS, T.E.A.; VEIGA, F.; FERRAZ, H.G. Cyclodextrins and ternary complexes: technology to improve solubility of poorly soluble drugs. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 47, n.4, p.665- 681, 2011.

MUANKAEWA, C.; JANSOOKC, P.; SIGURPSSONA, H.H.; THORSTEINN, L. Cyclodextrin-based telmisartan ophthalmic suspension: Formulation development for water-insoluble drugs. **International Journal of Pharmaceutics**, v.507, p. 21–31, 2016.

MURRAY, H.W. Leishmaniasis in the United States: treatment in 2012. **American Journal Tropical Medicine Hygiene**, v.86, p. 434 – 440, 2012.

MANOHARAN, C.; BASARKAR, A.; SINGH, J. **Various Pharmaceutical Disperse Systems**. In: Pharmaceutical suspensions. Editora Springer. 2010.1-18p.

MOGHIMIPOUR, E., KOUCHA, M., SALIMI, A., HANDALI, S., BHRAMPOUR, S. The effect of polymer content on the nonnewtonian behavior of acetaminophen suspension. **Journal of Drug Delivery**, p-1-5, 2013.

MOGHIMIPOUR, E.; REZAEI, S.; SALIMI, A.; ASADI, E.; HANDALI, S. Rheological behavior and stability of ciprofloxacin suspension: Impact of structural vehicles and flocculating agents. **Journal Advanced Pharmaceutical Technology Research**, v.4, n.3, p.141–145, 2013.

NASH, G.L.; WOKINGHAM, BERKSHIRE, UNITED, K. Inter particle interactions in concentrated suspensions and their bulk (Rheological) properties. **Advances in Colloid and Interface Science**, v.168, p.263–277, 2011.

NEAL, R.A.; VANBUEREN, J.; HOOPER, G. The activity of nitrofurazone and furazolidone against leishmania-donovani, l-major and leishmania-enriettii in vitro and in vivo. **Annals of Tropical Medicine and Parasitology**, v.82, n.5, p.453-456, 1988

NUTAN, M.T.H.; REDDY, K. **General principles of suspensions**. In: Pharmaceutical suspensions. Editora Springer. 2010.39p.

OLIVEIRA, R.; SANTOS, D.; COELHO, P. Cyclodextrinas : formação de complexos e sua aplicação farmacêutica. **Revista da Faculdade de Ciências da Saúde**, v.6, p.70–83, 2009.

PANDA, M.; GANESH, P.; AMOL, M.; SUNIL, M.; RAO, B.M.E Effect Of Cyclodextrin On Physical Stability Of Nimesulide Suspension. **Int. Journal Drug Development & Research**, v. 2, n.4, p.669-675, 2010.

PASSOS, S.R.; RODRIGUES, T.A.; MADUREIRA, A.P.; GIUNCHETTI, R.C.; ZANINI, M.S. Clinical treatment of cutaneous leishmaniasis in dogs with furazolidone and domperidone. **International journal of antimicrobial agents**, v. 44, n. 5, p. 463-465, 2014.

PAYNE-JOHNSON, M.; MAITLAND, T. P.; TILT, N.; GOSSELLIN, J. An evaluation of the relative palatability of two commercial oral tablet formulations of carprofen and meloxicam in dogs using acceptance and preference tests. **Revue Médecine Vétérinaire**, v.158, n.10, p.519-524, 2007.

PETRY, G.; FOURIE, J.; WOLKEN, S. Comparison of the palatability of a new flavoured Drontal® Plus tablet (Drontal® Plus Treat 10 kg) and Milbemax® Chewable tablets when presented to privately owned dogs. **Open Journal of Veterinary**

Medicine, v.4, p.163-169, 2014.

PIMPLE, A.; SHAHI, S.; KHAN, S.; SHAIKH, S.; CHATE, R.; DUBE, A. Oral Suspension: A Review. **Journal of Medical and Pharmaceutical Innovation**, v.4n.20, p.49-52, 2017.

PINTO, I.S.; LOSS, A.C.C.; FALQUETO, A.; LEITE, Y.L.R. Pequenos mamíferos nãovoadores em fragmentos de mata atlântica e áreas agrícolas em Viana, Espírito Santo, Brasil. **Biota Neotropica**, v.9, n.3, p.355–360, 2009.

PINK, R.; HUDSON, A.; MOURIES, M.A.; BENDIG, M. Opportunities and challenges in antiparasitic drug discovery. **Nature Reviews Drug Discovery**, v.4, n.9, p.727-40, 2005.

POLONINI, H.C.; SANTOS, F.C.; VAZ, U. P.; BRANDÃO, M.A.F.; RAPOSO, N.R.B.; FERREIRA, A.O. Desenvolvimento e validação de método analítico para determinação de teor de Sinvastatina em cápsulas magistrais. **Química Nova**, v.34, n.3, p. 516-519, 2011.

POURMOHAMMADI, B.; MOTAZEDIAN, M.H.; HATAM, M.; KALANTARI, M.; HABIBI, P.; SARKARI, B. Comparasion of three methods for diagnosis of cutaneous leishmaniasis. **Iranian Journal Parasitology**, v.5, n.4, p.1-18, 2010.

PRAKASH, K.; RADHAMANI, J.; PANDEY, A.; YADAV, S. A preliminary investigation of cultivated and wild species of Luffa for oil and protein contents. **Plant Genetic Resources**, v.12, v.1, p.103–111, 2014.

RAI, M.; KON, K. **Nanomediical Therapeutic and Prophylaxis Strategies Against Intracellular Protozoa** in the Americas. In: Nanotechnology in Diagnosis, Treatment and Prophylaxis of Infectious Disease. 2015. Editora Elsevier.

RAJ, S.P.; ANGELA, L.S. Stability of marketed albendazole suspensions and correlation between zeta potential and sedimentation. **International Research Journal of Pharmacy**, v.2, n.3, p.154-156, 2011.

RAJPUT, K.N.; PATEL, K.C.; TRIVEDI, U.B. β -Cyclodextrin Production by Cyclodextrin Glucanotransferase from an Alkaliphile Microbacterium terrae KNR 9 Using Different Starch Substrates. **Biotechnology Research International**, p.7, 2016.

RAO, V.M.; STELLA V.J. When Can Cyclodextrins Be Considered for Solubilization Purposes?. **Journal of pharmaceutical sciences**, v.92, n.5, p. 927- 932, 2003.

RAO, G.C.S.; KUMAR, M.S.; MATHIVANAN, N.; RAO, M.E.B. Improvement of physical stability and dissolution rate of celecoxib suspensions by complexation with β -cyclodextrins. **Pharmazie**, v. 59, p. 627–630, 2004.

REIMÃO, J.Q.; TANIWAKI, N.N.; TEMPONE, A.G. Furazolidone is a selective in vitro candidate against Leishmania (L.) chagasi: an ultrastructural study. **Parasitology**

Research, v.106, p.1465-1469, 2010.

RIBEIRO L.A, SANTOS G, MITTMAN J. **Leishmania tegumentar americana (LTA) em Teófilo Otoni, Minas Gerais: uma visão sócio-econômica**. XI Encontro Latino americano de Iniciação Científica e VII Encontro Latino Americano de PósGraduação – Universidade do Vale do Paraíba.2006.

ROIKO, M.S.; SCHMITT, B.H.; RELICH, R.F.; MEYER, T.L.; ZHANG.S.; DAVISTE.E.An unusual presentation of leishmaniasis in a human immunodeficiency virus- positive individual. **JMM Case Reports**, p.1-4,2015

ROWE, R.; SHESKEY, P.J.; QUINN, M.E. **Handbook of Pharmaceutical Excipients**. 6th ed. London: Pharmaceutical Press, 2001.

SANTOS, J.L.C.; MELO, M.B.; FERREIRA, R.A.; FONSECA, A.F.Q.; VARGAS,M.L.;GONTIJO, C.M. Leishmaniose tegumentar americana entre os indígenas Xakriabá: imagens, ideias, concepções e estratégias de prevenção e controle. **Saúde Sociedade São Paulo**, v.23, n.3, p.1033-1048, 2014.

SARAIVA, L.; LEITE, C.G.; LIMA, A.C.V.M.R.; CARVALHO, L.O.A.C.; PEREIRA,A.A.S .; RUGANI,J.M.N.; REGO,F.D.; GONTIJO,C.M.F.; ANDRADE FILHO,J.D. Seasonality of sand flies (Diptera: Psychodidae) and *Leishmania* DNA detection in vector species in an area with endemic visceral leishmaniasis. **Memórias Instituto Oswaldo Cruz**, v.112, n.4, p.309-318, 2017.

SHITANDI, A.A.; AILA, O.; OTTARO, S.; ALIONG'O, L.; MWANGI, G.; KUMAR-SHARMA, H.; JOSEPH, M. Effect of deep frying on furazolidone anticoccidial drug residues in liver and muscle tissues of chicken. **African Journal of Food Science**, v.2, p. 144-148, 2008.

SOHI, H.; SULTANA, Y.; KHAR, R.K. Taste masking technologies in oral pharmaceuticals: recent developments and approaches. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, v.30, n.5, p.429, 2004.

STELLA, V.J.; RAJEWSKI R. Cyclodextrins: Their future in drug formulation and delivery. **Pharmaceutical Research**, v.14, n.5, p.556-567, 1997.

SUNDAR S, OLLIARO, P.L. Miltefosine in the treatment of leishmaniasis: clinical evidence for informed clinical risk management. **Therapeutics Clinical Risk Management**, v.3, p.733-740, 2007.

SUSHMA, G.; KUMAR, K.M.; AJAY, B.; RUCHI, T. Advancements and patents in pharmaceutical suspension technologies. **Journal of Biological & Scientific Opinion**, v. 1, n.4, p.1-9, 2013.

TEMPONE, A.G.; MORTARA, R.A.; ANDRADE JUNIOR, H.F.;REIMÃO, J.Q.Therapeutic evaluation of free and liposome-loaded furazolidone in experimental visceral leishmaniasis. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v.36, n.2, p.159-163, 2010.

THOMPSON, D.O. Cyclodextrins – Enabling excipients: Their present and future use in pharmaceuticals. **Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems**, v.14, n.1, p.1-104, 1997.

THOMBRE, A. G. Oral delivery of medications to companion animals: palatability considerations. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v.56, n.10, p.1399-1413, 2004. USP – NF. United State Pharmacopoeia 29 – National Formulary 34. V III. 2011.

VEIGA, F.J.B., PECORELLI, C.C.M.F., RIBEIRO, S.S.L. **As ciclodextrinas e a tecnologia farmacêutica**. Coimbra: Minerva. p. 21-26, 140-143, 2006.

VÉLEZ, I.D.; CARRILLO, L.M.; LÓPEZ, L.; RODRÍGUEZ, E.; ROBLEDO, S.M. An Epidemic Outbreak of Canine Cutaneous Leishmaniasis in Colombia Caused by *Leishmania braziliensis* and *Leishmania panamensis*. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v.86, n.5, p.807-811, 2012.

WHO Model List of Essential Medicines 17th List 2011. Disponível Em:<http://whqlibdoc.who.int/hq/2011/a95053_eng.pdf>. Acesso em: 21 abr.2018.

ZATAZ, J.L. Physical stability of suspensions. **Journal Society Cosmetic Chemists**, v.36, p.393-411, 1985.

YANG,X.H.; ZHU, W.L. Viscosity properties of sodium carboxymethylcellulose solutions, **Cellulose**, v.14, p. 409-417, 2007.

YARNYKH, T.G.;TYKHONOV, O.I.; MELNYK, G.M.; YURYEVA,G.B. Pharmacopoeian. Aspects of suspensions preparation in pharmacy conditions. **Asian Journal of Pharmaceutics**, v.11, n.4, p. 859-864, 2017.

YI, T. The application prospects and development trends of orally disintegrating tablets to dogs. **Ciência Rural**, v.47, n.4, p.1-6, 2017.