UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Programa de Pós-graduação em Fármaco e Medicamentos
Área de Produção e Controle Farmacêuticos

Nanocristais de furosemida: preparação, caracterização físico-química e avaliação *in silico* de absorção oral e pulmonar

Sávio Fujita Barbosa

Tese para obtenção do grau de
DOUTOR

Orientadora:
Profa. Dra. Nádia Araci Bou-Chacra

São Paulo
2014

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Programa de Pós-graduação em Fármaco e Medicamentos
Área de Produção e Controle Farmacêuticos

Nanocristais de furosemida: preparação, caracterização físico-química e avaliação *in silico* de absorção oral e pulmonar

Versão corrigida da tese conforme Resolução CoPGr 5890.
O original encontra-se disponível no serviço de Pós-graduação da FCF/USP

Sávio Fujita Barbosa

Tese para obtenção do grau de
DOUTOR

Orientadora:
Profa. Dra. Nádia Araci Bou-Chacra

São Paulo
2014

Ficha Catalográfica
Elaborada pela Divisão de Biblioteca e
Documentação do Conjunto das Químicas da USP.

Barbosa, Sávio Fujita
B238n Nanocristais de furosemida : preparação, caracterização físico-química e avaliação *in silico* de absorção oral e pulmonar / Sávio Fujita Barbosa. -- São Paulo, 2014.
155p.

Tese (doutorado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo. Departamento de Farmácia.
Orientador: Bou-Chacra, Nádia Araci

1. Tecnologia farmacêutica 2. Nanotecnologia 3. Formulações farmacêuticas I. T. II. Bou-Chacra, Nádia Araci, orientador.

615.4 CDD

Sávio Fujita Barbosa

Nanocristais de furosemida: preparação, caracterização físico-química e avaliação *in silico* de absorção oral e pulmonar

Comissão Julgadora da Tese para obtenção grau de Doutor

Profa. Dra. Nádia Araci Bou Chacra
(orientadora)

1° Examinador

2° Examinador

3° Examinador

4° Examinador

São Paulo, ____ de _____ de 2014.

Para Bruna, minha esposa, que me mostrou o verdadeiro poder do amor.

AGRADECIMENTOS

À Profa. Dra. Nádia Araci Bou-Chacra, pela orientação rica, segura e próxima.

Obrigado por sua exímia atuação, motivação e carinho. Mais que orientadora uma grande professora, por quem cultivo verdadeira admiração.

Ao Prof. Dr. Raimar Löbenberg, que me recebeu calorosamente em seu magnífico laboratório.

Ao amigo Muhamad, pelas madrugadas de discussão e aconselhamentos.

Ao grande amigo Orlando responsável pelas primorosas imagens presentes nesse trabalho.

Aos colegas Takatsuka e Prof. Dr. Reinhard Vehring pelo apoio científico.

Aos Meus pais, Ancila e Barbosa, por todo esforço e dedicação em criar e modelar o homem que sou hoje.

À minha querida irmã Lívea, que me inspirou a estudar e ser uma pessoa melhor.

À minha Vó Mema, por sua pureza e espiritualidade que sempre abençoou minha vida.

À empresa Dp Union, pelo apoio técnico.

À coordenação, professores e funcionários do Programa de Pós Graduação em Fármacos e Medicamentos.

“Está aberta a qualquer homem a possibilidade de escolher a direção da sua luta”.

*“Cada um pode se consolar com a bela máxima que diz: a procura da verdade é mais preciosa
que a posse desta.”*

Albert Einstein

RESUMO

BARBOSA, S. F. **Nanocristais de furosemida: preparação, caracterização físico-química e avaliação *in silico* de absorção oral e pulmonar.** 2014. f. 171. Tese (doutorado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2014.

Segundo a Organização Mundial de Saúde, a hipertensão arterial é responsável por uma crise global de saúde pública, sendo as doenças cardiovasculares implicadas em aproximadamente 17 milhões de mortes/ano, das quais, 9,4 milhões ocasionadas por complicações provocadas pela hipertensão, como edema pulmonar. Quanto ao arsenal terapêutico disponível, a furosemida, potente diurético de alça, é amplamente utilizada em situações de controle e emergência relacionadas à hipertensão e ao edema pulmonar cardiogênico. Apesar do elevado índice de sua prescrição, esse fármaco pertence à classe IV do Sistema de Classificação Biofarmacêutica (SCB), apresentando absorções intestinais erráticas e variáveis. Tais características representam desafio para o desenvolvimento de formas farmacêuticas orais. Assim, adoção de tecnologias inovadoras associadas à via de administração pulmonar pode permitir abordagem terapêutica alternativa, com elevado potencial de aplicação. Entre as tecnologias inovadoras, a obtenção de nanocristais de fármacos classes II e IV tem sido promissora. Nanocristais podem exibir desempenho *in vivo* superior quando comparados aos seus homólogos, na forma micronizada. Portanto, estratégias que permitam o desenvolvimento de medicamentos contendo furosemida, com maior eficácia e segurança, são de fundamental importância. Nesse sentido, a aplicação de tecnologia *in silico*, com propriedade preditiva, contribui para a racionalização de ensaios na pesquisa e no desenvolvimento de novas formas farmacêuticas. Objetivou-se, desse modo, a preparação e a caracterização físico-química de nanocristais de furosemida e sua avaliação *in silico* na absorção oral e pulmonar empregando ferramenta computacional. Os nanocristais foram obtidos por moagem à alta energia, utilizando movimentos simultâneos de revolução/rotação. A determinação da distribuição do tamanho e a morfologia foram realizadas por difração de raios *laser* e microscopia eletrônica de varredura, respectivamente. As possíveis interações e/ou alterações do estado cristalino do fármaco foram investigadas por calorimetria exploratória diferencial, termogravimetria diferencial, difração de raio X e espectroscopia Raman de baixo deslocamento. Quanto à solubilidade do nanocristal, foram realizados ensaios para a determinação do aumento na solubilidade de equilíbrio e da velocidade de dissolução, utilizando os métodos *shake flask* e velocidade de dissolução intrínseca (VDI), respectivamente. A moagem à alta energia permitiu a obtenção de nanocristais com tamanho médio trinta vezes menor (231nm) do que o tamanho inicial, na escala micrométrica (7,1 μm). Os nanocristais apresentaram estabilidade térmica. Não foram observadas interações entre os excipientes e os nanocristais, que, entretanto, exibiram estrutura cristalina menos definida, o que indica parcial amorfização do nanocristal. A solubilidade de saturação dos nanocristais aumentou aproximadamente três vezes; como consequência, houve aumento na VDI em 2,2 vezes, 1,8 vezes e 3,8 vezes, quando comparado à VDI da furosemida micronizada em meio SGF, tampão 4,5 e SIF, respectivamente. Quanto às avaliações *in silico* dos nanocristais, sua absorção oral revelou moderada alteração no perfil farmacocinético. Quando foi utilizada a via de administração pulmonar, os nanocristais apresentaram maior desempenho quando comparada a via de administração oral; destacando-se o aumento na Fa% e na $C_{\text{máx}}$ e a acentuada diminuição no $T_{\text{máx}}$. Em conclusão, a plataforma tecnológica obtida tem potencial aplicação no desenvolvimento de formas farmacêuticas inovadoras para administração pulmonar de furosemida.

Palavras-chaves: nanocristais, furosemida, moagem à alta energia, ensaios *in silico*, administração pulmonar.

ABSTRACT

BARBOSA, S. F. **Furosemide nanocrystals: preparation, physical-chemical characterization and *in silico* evaluation of oral and lung absorption.** 2014. f. 171. Tese (doutorado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2014.

According to the World Health Organization, hypertension is responsible for global public health crisis, being the cardiovascular diseases involved in approximately 17 million deaths a year, of these, 9.4 million occasioned by hypertension complications such as pulmonary edema. Regarding therapeutic arsenal available, Furosemide is a potent loop diuretic widely used in control and emergency situations related to hypertension and cardiogenic pulmonary edema. Despite the high level of prescribing, this drug belongs a class IV drug, according to Biopharmaceutics Classification System (BCS), exposing erratic and variable intestinal absorption. These characteristics represent a challenge for the development of oral dosage forms. Thus, adoption of innovative technologies associated with pulmonary route of administration may allow an alternative therapeutic approach, with high potential for application. Among the new technologies, those for obtaining nanocrystals of classes II and IV drugs have been a promising approach. Nanocrystals can exhibit *in vivo* higher performance when compared to their counterparts in micronized form. Therefore, strategies to develop medicines containing Furosemide, with greater efficacy and safety, are of critical importance. In this sense, the application of technology *in silico*, with predictive property, contributes to the rationalization of testing in research and development of new dosage forms. The objectives, as a result, were the preparation and the physicochemical characterization of Furosemide nanocrystals, and its *in silico* evaluation on oral and pulmonary absorption using a computational tool. The nanocrystals were obtained using a high-energy milling technology under simultaneous revolution/rotation motion. The determination of the size distribution and morphology was performed using laser diffraction and scanning electron microscopy, respectively. Furthermore, differential scanning calorimetry, differential thermogravimetry, X-ray diffraction and Low Shift Raman spectroscopy were performed to investigate possible interactions and changes in the crystalline state of the nanocrystals. To measure the increase in the equilibrium solubility and dissolution rate, the shake flask and intrinsic dissolution rate (IDR) methods were used respectively. The nanocrystals size appeared thirty times lower (231 nm) compared to the initial size (7,1 μm). The nanocrystals were stable with concern to its thermal characteristic not showing interactions between the excipients and the nanocrystals; however, they exhibited less defined crystal structure, indicating partial amorphization. The nanocrystals saturation solubility increased approximately three times. Consequently, 2.2, 1.8 and 3.8 folds increase were observed in IDR when compared to the Furosemide raw material in SGF, buffer 4.5 and SIF, respectively. The *in silico* nanocrystal studies revealed moderate changes in its oral absorption and pharmacokinetic profile. When the pulmonary route of administration was used, the nanocrystals showed higher performance compared to oral route administration; highlighting the increase in F_a % and C_{max} and a significant decrease in T_{max} . In conclusion, the technology platform obtained has potential application in the development of innovative dosage forms for Furosemide pulmonary delivery.

Keywords: nanocrystals, furosemide, high-energy milling, *in silico* tests, pulmonary administration.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Estrutura molecular da furosemida.....	6
Figura 2 – Ilustração da ação farmacológica da furosemida	8
Figura 3 – Ligações intermoleculares de ponte de hidrogênio entre moléculas de furosemida.....	10
Figura 4 – Ilustração do processo de solvatação de compostos cristalinos	15
Figura 5 – Modelo físico que representa o processo de dissolução.....	18
Figura 6 – Representação esquemática dos três processos envolvidos na dissolução de um soluto cristalino. A expressão para o trabalho envolvido é $w_{22}+w_{11}-xw_{12}$	26
Figura 7 – Influência da camada de difusão (h) na velocidade de dissolução (dc/dt) de microcristais (A) e nanocristais (B). Abreviações: CSM, solubilidade de saturação do fármaco na superfície aquosa; M, micropartícula; N, nanopartícula; Cx, concentração do fármaco nos líquidos intersticiais. $dc/dt \approx (C_s - C_x)/h$	30
Figura 8 – Influência no tamanho de partícula no ângulo de curvatura e, conseqüentemente, na pressão de dissolução (p)	31
Figura 9 – Evolução do número de publicações de artigo sobre nanocristais entre 1995 e 2013	34
Figura 10 – Número de publicações entre os países no período de 1995 a 2013	34
Figura 11 – Número de publicações sobre nanocristais em relação aos pesquisadores.....	35
Figura 12 – Características dos nanocristais.....	38
Figura 13 – Ilustração sobre o contato, a interpenetração e o aprisionamento de macropartículas e nanopartículas na superfície dos enterócitos.....	39
Figura 14 – Diferentes sistemas nanoestruturados de liberação de fármaco.....	40
Figura 15 – A absorção oral de macropartículas em geral é um processo limitado pela velocidade de dissolução em ambos os estados (pré/pós-prandial)	42
Figura 16 – Bifurcações e sistemas de deposição no trato respiratório	45
Figura 17 – Representação do trato respiratório dividido em vias aéreas superiores (extratorácica) e vias aéreas inferiores (intratorácica).....	47
Figura 18 – a) Ilustração dos movimentos simultâneos de Rotação (ω)/Revolução (Ω), b) as posições assumidas pelas esferas de zircônio durante a homogeneização e c) visão externa e interna do equipamento.....	52
Figura 19 – Tela inicial do sistema computadorizado de previsão in silico Gastroplus®	55

Figura 20 – Ilustração do modelo de ACAT (<i>advanced compartmental absorption and transit</i>) ou absorção compartimental e trânsito avançado	56
Figura 21 – Divisão dos 5 compartimentos do pulmão, conforme o modelo proposto pela ICRP 66.....	58
Figura 22 – Distribuição de tamanho de partícula, por DL, antes e após nanopulverização	84
Figura 23 – Cristais de furosemida antes da nanopulverização (a) e (b), utilizando MEV e celas unitárias nas formas triclinica (c) e monoclinica (d)	86
Figura 24 – (a) Furosemida antes da nanopulverização e (b) nanocristais de furosemida, por MEV.....	87
Figura 25 – a) curvas de DSC das misturas binárias; b) curvas DSC/DDSC dos nanocristais de furosemida; c) curvas TG/DTG dos nanocristais de furosemida. 90	
Figura 26 – Difratoograma do nanocristal, da furosemida matéria-prima e da mistura física (furosemida e metilcelulose)	91
Figura 27 – Espectro de deslocamento Raman da furosemida e seus nanocristais.93	
Figura 28 – Solubilidade de equilíbrio da furosemida matéria-prima e dos nanocristais e mistura física em água e soluções tampões de valores de pH 1,2; 2,0; e 4,5	95
Figura 29 – Solubilidade de equilíbrio da furosemida matéria-prima e dos nanocristais e mistura física em soluções tampões de valores de pH 6,0; 6,8; e 7,2. 95	
Figura 30 – Dissolução intrínseca dos nanocristais de furosemida nos meios SGF (pH 1,2), tampão acetato 4,5 e SIF (6,8).....	97
Figura 31 – Dissolução intrínseca da furosemida matéria-prima e nanocristal no meio SGF (pH 1,2).....	98
Figura 32 – Dissolução intrínseca da furosemida matéria-prima e nanocristal no meio tampão acetato pH 4,5	99
Figura 33 – Dissolução intrínseca da furosemida matéria-prima e nanocristal no meio SIF (pH 6,8).....	99
Figura 34 – Distribuição dos resíduos de dissolução intrínseca dos nanocristais, em meio SIF (a), tampão acetato (b), SGF (c) e furosemida matéria-prima em meio SIF (d).....	101
Figura 35 – Distribuição dos resíduos de dissolução intrínseca da furosemida matéria-prima e dos nanocristais, em meio SGI (a), tampão acetato (b) e SIF (c).....	101
Figura 36 – As quatro diferentes microespécies de furosemida e suas distribuições em relação ao pH	103

Figura 37 – Ponto isoelétrico da furosemida	103
Figura 38 – Incremento do clogP de cada átomo da furosemida e potencial molecular de lipofilicidade ilustrado na superfície da molécula.....	105
Figura 39 – logD da furosemida em relação aos diferentes valores de pH	106
Figura 40 – pontos doadores (D) e aceptores (A) de H na molécula de furosemida.....	107
Figura 41 – Fração absorvida (%) de furosemida nos diferentes compartimentos com relação às diferentes formas farmacêuticas e vias de administração	109

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Caracterização do tamanho de partícula antes e depois da nanopulverização por DL e MEV.....	85
Tabela 2 – Ângulos de difração de raios X (2θ), intensidade (I) e intensidade relativa (I/I ₀) dos principais picos observados nos difratogramas da matéria-prima furosemida, da mistura física (furosemida, metilcelulose e glicose) e nanocristal de furosemida.....	92
Tabela 3 – Solubilidade de saturação da furosemida matéria-prima, da mistura física e dos nanocristais (mg/mL, n=3, $\pm$ desvio padrão) e número de vezes no aumento da solubilidade observado nos nanocristais (dados entre parênteses)	94
Tabela 4 – Furosemida matéria-prima e nanocristal VDI (mg/min/cm ²), equação da reta e R ² nos três diferentes meios: SGF (pH 1,2), tampão acetato (pH 4,5) e SIF (pH 6,8)	98
Tabela 5 – logD da furosemida em diferentes valores de pH.....	105
Tabela 6 – Fração absorvida (Fa%), área sob a curva (AUC), concentração máxima (C _{máx}), tempo para atingir a concentração máxima (T _{máx}), número de dose (D ₀), número de absorção (A _n) e número de dissolução (D _n) após simulação da absorção oral e pulmonar de comprimidos e pó inalável contendo 40mg de furosemida e seu nanocristal.....	108

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 – Medicamentos disponíveis no mercado utilizando as tecnologias NanoCrystal [®] e Dissocube [®] . Descrição da tecnologia, nome do produto, fármaco, classificação no SCB, indicação terapêutica, via de administração, empresa fabricante, vendas mundiais em 2011 e ano do lançamento no mercado.....	33
Quadro 2 – Vantagens da administração de fármacos por via pulmonar no tratamento de doenças respiratórias e sistêmicas	44
Quadro 3 – Alterações nas propriedades farmacocinéticas das formulações de nanocristais de administração pulmonar em relação aos seus homólogos.....	48
Quadro 4 – Tecnologias de obtenção de nanocristais. Descrição dos processos, designações comerciais registradas, princípios e referências.....	50

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO.....	1
2.	REVISÃO DA LITERATURA	5
2.1	Furosemida.....	6
2.2	Considerações gerais sobre a solubilidade, a dissolução e a permeabilidade dos fármacos	12
2.2.1	Solubilidade	13
2.2.2	Permeabilidade.....	22
2.2.3	Fatores que influenciam a solubilidade, a velocidade de dissolução e a permeabilidade dos fármacos	24
2.3	Estado da arte dos nanocristais	31
2.3.1	Propriedades biofarmacêuticas dos nanocristais	35
2.3.2	Principais tecnologias de obtenção de nanocristais	49
2.4	Ensaio <i>in silico</i>	54
3.	OBJETIVOS	60
3.1	Objetivos gerais	61
3.2	Objetivos específicos.....	61
4.	MATERIAL E MÉTODOS	62
4.1	Material.....	63
4.1.1	Obtenção dos nanocristais de furosemida.....	63
4.1.2	Liofilização das nanossuspensões	63
4.1.3	Quantificação de furosemida	64
4.1.4	Distribuição e tamanho médio de partícula.....	65
4.1.5	Microscopia eletrônica de varredura.....	65
4.1.6	Calorimetria exploratória diferencial e termogravimetria/ termogravimetria derivada	66
4.1.7	Difração de raio X.....	67
4.1.8	Espectroscopia Raman de baixo deslocamento	67
4.1.9	Solubilidade de saturação	68
4.1.10	Dissolução intrínseca.....	69
4.2	Métodos.....	70
4.2.1	Preparação dos nanocristais por moagem à alta energia.....	70
4.2.2	Liofilização das nanosuspensões	70
4.2.3	Quantificação de furosemida	71
4.2.4	Distribuição e tamanho médio de partícula.....	71
4.2.5	Microscopia eletrônica de varredura.....	72

4.2.6	Calorimetria exploratória diferencial e termogravimetria/ termogravimetria derivada	73
4.2.7	Difração de raio X	73
4.2.8	Espectroscopia Raman de baixo deslocamento	73
4.2.9	Solubilidade de saturação	74
4.2.10	Dissolução intrínseca	75
4.2.11	Avaliação <i>in silico</i> das características físico-químicas da furosemida	76
4.2.12	Avaliação <i>in silico</i> da absorção dos nanocristais	76
4.2.13	Análise estatística dos dados	77
5.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	79
5.1	Preparação dos nanocristais por moagem à alta energia	80
5.2	Liofilização das nanossuspensões	82
5.3	Distribuição e tamanho médio de partícula dos nanocristais de furosemida	84
5.4	Análise morfológica e tamanho do cristal	86
5.5	Calorimetria exploratória diferencial (DSC), termogravimetria (TG)/ termogravimetria derivada (DTG) dos nanocristais de furosemida	87
5.6	Difração de raio x dos cristais de furosemida	91
5.7	Espectroscopia Raman de baixo deslocamento	92
5.8	Solubilidade de saturação	94
5.9	Velocidade de dissolução intrínseca	96
5.10	Avaliação <i>in silico</i> das características físico-químicas da furosemida	102
5.10.1	<i>pka</i> , microespécies e ponto isoelétrico (pI)	102
5.10.2	Coeficiente de partição (<i>clog P</i>) e coeficiente de distribuição (<i>logD</i>)	104
5.10.3	Área de superfície molecular, área de superfície polar e doadores e aceptores de H	106
5.11	Avaliação <i>in silico</i> da absorção oral e pulmonar dos nanocristais ..	108
6.	CONCLUSÃO	114
7.	REFERÊNCIAS	116
8.	APÊNDICES	143

1. INTRODUÇÃO

Segundo a Organização Mundial de Saúde (2013), a hipertensão arterial é responsável por uma crise global de saúde pública. Internacionalmente, as doenças cardiovasculares são responsáveis por aproximadamente 17 milhões de mortes ao ano. Dessas, 9,4 milhões são ocasionadas por complicações provocadas pela hipertensão, como o edema pulmonar cardiogênico, responsável por elevados índices de morbidade e mortalidade entre os pacientes (THORNELOE et al., 2012).

Dentre os fármacos disponíveis, a furosemida é um potente diurético de alça, amplamente utilizado em situações de controle e emergência relacionadas à hipertensão e ao edema pulmonar cardiogênico agudo ou crônico. A furosemida faz parte da lista de medicamentos essenciais da OMS, nas seguintes formas farmacêuticas: solução oral 20 mg/5 mL; comprimidos com 10, 20, 40 mg; e solução injetável intravenosa de 10mg/mL.

Sua dose terapêutica habitual é de 40 a 120mg/dia, administrados geralmente por via oral ou parenteral. Recentes pesquisas também indicam a administração pulmonar de furosemida no tratamento de edema pulmonar cardiogênico e na prevenção e no tratamento da broncoconstrição e da dispneia (BHURE et al., 2009; KALLET, 2007; SAHNI; PHELPS 2011; SWEETMAN, 2004; SOLYMOSI et al., 2013).

Apesar de amplamente utilizado no atual arsenal terapêutico, esse fármaco pertence à classe IV, segundo o Sistema de Classificação Biofarmacêutica (SCB), exibindo reduzida solubilidade aquosa e baixa permeabilidade intestinal. Tais propriedades são responsáveis por absorções intestinais variáveis e erráticas, ocasionando biodisponibilidades entre 50 e 70%. Tal fato estabelece verdadeiro desafio para os formuladores, especialmente no desenvolvimento de formas farmacêuticas orais.

A solubilidade, a velocidade de dissolução e a permeabilidade dos fármacos são os principais fatores que influenciam na biodisponibilidade de formulações farmacêuticas para administração oral (LIPKA; AMIDON, 1999). A eficácia e a segurança dos medicamentos são avaliadas pela sua resposta clínica ou terapêutica. Essa resposta está diretamente relacionada à biodisponibilidade do fármaco, que pode ser interpretada como medida de seu desempenho (CONSIGLIERE; STORPIRTIS; FERRAZ, 2000).

Nesse contexto, a nanotecnologia apresenta abordagem alternativa e promissora para melhorar as características de solubilidade dos fármacos

pertencentes às classes II e IV. Essa tecnologia baseia-se na obtenção de nanocristais desses fármacos (SHEGOKAR; MÜLLER, 2010). Por definição, nanocristais são considerados nanopartículas compostas somente pelo fármaco estabilizado por agentes tensoativos e poliméricos, isentas de outros componentes que formem matrizes e que apresentem tamanho menor que 1 μm (FU et al., 2013; JACOBS; KAYSER; MÜLLER, 2000; JUNGHANS; MÜLLER, 2008, KECK; MÜLLER, 2006; MÜLLER; GOHLA; KECK, 2011; RABINOW, 2004).

A redução do tamanho das partículas originadas pelas tecnologias de obtenção dos nanocristais permite a obtenção de fármacos que apresentem maior desempenho *in vivo*. Esse melhor desempenho é decorrente do aumento de área superficial, da solubilidade de saturação e da velocidade de dissolução do fármaco (MÜLLER; KECK, 2007). Em especial, quando os nanocristais são comparados aos sistemas matriciais, suas principais vantagens estão relacionadas à sua ampla aplicabilidade e simplicidade (DURÁN et al., 2010; MÜLLER; PETERS, 1998).

Adicionalmente, os nanocristais oferecem elevada viabilidade para veiculação em diferentes formas farmacêuticas e administração pelas vias oral, tópica, ocular, intravenosa e pulmonar; na maioria das vezes, apresentando melhor desempenho quando comparado aos seus homólogos, em escala micrométrica (JACOBS; KAYSER; MÜLLER, 2001; MÜLLER; JACOBS, 2002; KASSEM et al., 2007; MERISKO-LIVERSIDGE et al., 1996; OSTRANDER et al., 1990; WAHLSTROM et al., 2007; CHIANG et al., 2007, 2011).

Nesse contexto, a via de administração pulmonar de nanocristais constitui alternativa promissora. Essa abordagem tecnológica, associada às vantagens oferecidas pela administração pulmonar dos fármacos, em especial aqueles com baixa solubilidade e permeabilidade, permite alcançar maior eficiência de deposição pulmonar e maior tempo de retenção quando comparada às micropartículas. Como consequência, utilizando a via de administração pulmonar, é possível evitar problemas associados à administração oral e obter aumento de sua biodisponibilidade (GEISER; KREYLING, 2013; ZHANG et al., 2011; ROA et al., 2011).

Considerando tais vantagens, a adoção de estratégias inovadoras, que permitam o desenvolvimento de medicamentos contendo furosemida, com maior eficácia e segurança, é de fundamental importância. Tais estratégias devem

apresentar facilidade de aplicação e, ainda, devem permitir a obtenção de lotes de medicamentos em escala comercial.

Nesse sentido, o emprego da tecnologia computacional ou *in silico* no desenvolvimento de novas formas farmacêuticas tem demonstrado elevado potencial de aplicação. Sua utilização é responsável por reduzir o período do desenvolvimento, em função da possível redução do número de procedimentos experimentais necessários para seleção, desenvolvimento e avaliação das propriedades de novos medicamentos. Além disso, essa nova ferramenta pode estabelecer estratégias de desenvolvimento de formulações, prevendo a velocidade e a extensão da absorção do fármaco nas diferentes formas farmacêuticas e vias de administração (AGORAM; WOLTOSZ; BOLGER, 2001).

Na última década, as ferramentas *in silico* têm sido amplamente utilizadas na pesquisa e na regulamentação dos medicamentos. Órgãos regulatórios, como a *Food and Drug Administration* (FDA), adotaram modelos de previsão de absorção para apoiar o desenvolvimento de políticas regulatórias (HUANG; LEE; YU, 2009).

Dessa maneira, é de fundamental importância o desenvolvimento de abordagens nanotecnológicas inovadoras e a adoção de ferramentas *in silico*, que permitam o desenvolvimento de medicamentos contendo o fármaco furosemida com maior eficácia e segurança.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Furosemida

O fármaco Furosemida (CAS 54-31-9), denominado quimicamente por ácido 5-(aminossulfonil)-4-cloro-2-[(2-furanilmetil)amino]-benzoico, possui estrutura molecular $C_{12}H_{11}ClN_2O_5S$ e peso molecular de 330,74 (Figura 1). Apresenta-se sob a forma física de pó cristalino branco ou quase branco e inodoro. É praticamente insolúvel em água e clorofórmio, facilmente solúvel em soluções aquosas de hidróxidos alcalinos, solúvel em acetona, dimetilformamida e metanol (FARMACOPEIA BRASILEIRA 5ª. ed., 2010; UNITED STATES PHARMACOPEIAL 36 NF32, 2013).

Figura 1 – Estrutura molecular da furosemida.

Fonte: Elaborado pelo autor.

A furosemida apresenta retículos cristalinos triclinicos ou monoclinicos, é considerada um ácido fraco, possuindo constante de dissociação (pK_a), coeficiente de partição ($LogP$) e coeficiente de distribuição ($LogD$ a pH 6,5) iguais a 3,8, 2,29 e -0,48, respectivamente (BHERTOD, 1999). São conhecidos sete diferentes polimorfos da furosemida, sendo quatro verdadeiros (I, II, III, e IV), dois solvatos (IV: dimetil sulfóxido e V: dioxano) e um sólido amorfo (BABU et al., 2010; GRANERO et al., 2010).

Esse fármaco é classificado como diurético de alça e pertencente ao grupo das sulfonamidas derivadas do ácido antranílico. É considerado um potente diurético de alça, com rápido início de ação e curta duração, tornando-se amplamente utilizado em situações de emergência (HARDMAN; LIMBIRD, 2010).

De acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS) (2013), a furosemida faz parte da lista de medicamentos essenciais para adultos e crianças e encontra-se

disponível nas seguintes formas farmacêuticas: solução oral 20 mg/5 mL, comprimidos com 10, 20, 40 mg e solução injetável intravenosa de 10mg/mL. No caso da forma farmacêutica solução injetável, é importante destacar que, para garantir total solubilização e evitar precipitações da furosemida, é necessário manter o pH da formulação alcalino, entre 8,0 e 9,3 (FARMACOPEIA BRASILEIRA 5ª. ed., 2010).

Entre os diuréticos de alça, o fármaco furosemida é considerado o mais eficaz, pois apresenta ampla curva dose-resposta. Atualmente, é utilizado principalmente no tratamento da hipertensão leve à moderada, associado a outros agentes anti-hipertensivos, e no tratamento de edema pulmonar cardiogênico agudo ou crônico, uma complicação potencialmente fatal ocasionada por doença cardíaca. Além disso, a furosemida pode ser utilizada em casos de doenças hepáticas e situações acompanhadas por hipercalcemia e oligúria causadas por insuficiência renal (SILVA, 1994; SWEETMAN, 2004). Para essas aplicações, a dose terapêutica habitual é de 40-120mg/dia, administrados por via oral. Para o tratamento de casos leves de edema, doses menores do que 20 mg podem ser eficazes; entretanto, para casos graves de edema, doses maiores do que 600 mg/dia geralmente são necessárias. Em relação a sua administração, as vias intramuscular (IM) ou intravenosa (IV) são opções, sendo a via oral (VO) a mais utilizada (HARDMAN; LIMBIRD, 2010).

Diversas pesquisas indicam a administração pulmonar de furosemida no tratamento de edema pulmonar cardiogênico, na prevenção e no tratamento da broncoconstrição moderada à severa em pacientes asmáticos e na dispneia mediada pelo esporte, presente em pacientes prematuros, terminais de câncer e que apresentam sarcoma de Kaposi (BIANCO et al., 1988; BHURE et al., 2009; KALLET, 2007; SAHNI; PHELPS 2011; SIERRA-JOHNSON, 2002; SOLYMOSI et al., 2013; UJWAL, et al., 2009)

Na área veterinária, a furosemida é administrada em cavalos de corrida, como broncodilatadora, e na prevenção da hemorragia pulmonar induzida pelo exercício (HPIE), condição responsável pelo comprometimento físico do animal e por 60% das mortes súbitas na indústria de corrida. Entretanto, sua aplicação é controversa, por ser considerado um fármaco de aumento de desempenho (WATSON, 2011).

Em relação ao mecanismo de ação (Figura 2), a furosemida é responsável em reduzir a absorção de eletrólitos na alça de Henle, presente no néfron,

bloqueando o cotransportador sódio-potássio-cloreto ($\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-2Cl}^-$). Esse bloqueio diminui a reabsorção de sódio e cloreto, bem como cálcio, íons de magnésio e hidrogênio. Além disso, aumenta a excreção de potássio no túbulo renal distal. Esta perda de eletrólitos altera a osmolaridade do líquido intersticial da medula renal, diminuindo a absorção de água pela alça descendente de Henle e aumentando o volume de débito urinário. Como consequência, tanto o volume sanguíneo como a hipertensão arterial sistêmica (HAS) diminuem (GUYTON; HALL, 2006).

Figura 2 – Ilustração da ação farmacológica da furosemida.

Fonte: Elaborado pelo autor.

Estudo recente, que descreve novo mecanismo para a formação de edema pulmonar cardiogênico, fornece explicações não mecânicas para os efeitos extrarrenais da furosemida. Anteriormente, a formação de edema pulmonar era atribuída à filtração passiva de fluido através da barreira alvéolo-capilar intacta. Entretanto, foi observado que o edema pulmonar cardiogênico resulta da secreção

epitelial ativa de Cl^- , ocasionando fluxo de fluídos para o espaço alveolar. A secreção transepitelial de Cl^- é desencadeada pela inibição da absorção de Na^+ epitelial, mediada via regulador da condutância transmembrana em fibrose cística (CFTR) e de co-transportadores $1 \text{ Na}^+ \text{K}^+ \text{2Cl}^-$ (NKCL1), fornecendo, assim, novo mecanismo de ação da furosemida no tratamento de edema pulmonar (SOLYMOSI et al., 2013).

Em relação aos efeitos adversos causados pela furosemida, esses geralmente ocorrem em doses elevadas e/ou durante seu uso prolongado. Os efeitos graves são raros, sendo, os mais comuns: desequilíbrio eletrolítico, hiponatremia, hipocalemia e alcalose metabólica hipoclorêmica. Além disso, a administração crônica de furosemida em humanos e cães induz a resistência diurética, possivelmente devido à ativação do sistema renina-angiotensina-aldosterona. Adicionalmente, recentes estudos indicaram potencial ação ototóxica da furosemida em ratos, devido a interações medicamentosas com antibióticos aminoglicosídeos e cisplatina (LI et al., 2011; SWEETMAN, 2004; SCHMITZ; JOHNSON; SANTI, 2014).

Com referência à absorção oral da furosemida, essa é rapidamente absorvida pelo trato gastrointestinal, entretanto sua absorção é variável e errática, apresentando biodisponibilidade entre 50 e 70% (SWEETMAN, 2004). As principais justificativas para a biodisponibilidade errática deste fármaco estão relacionadas às variações intra e inter individuais, às doenças, ao estado alimentar e à sua baixa solubilidade e permeabilidade (AMBROGI et al., 2012; PERIOLI et al., 2012; SWEETMAN, 2004).

De acordo com o *Therapeutic Systems Research Laboratories* (TSRL) (2013), a furosemida é considerada fármaco integrante da Classe IV no Sistema de Classificação Biofarmacêutica (SCB). A solubilidade desse fármaco varia de 0,014 mg/mL a 8,91 mg/mL, em pH de 1,0 a 8,0, apresentando, em todas as situações, número de dose (D_o) menor do que 1 (GRANERO et al., 2010).

A solubilidade aquosa da furosemida, à temperatura ambiente, é descrita como 0,01825 mg/mL (SHIN; KIM 2003). Em meios biorrelevantes, como o fluído intestinal simulado (FaSSIF) e o fluído intestinal humano não alimentado (FaHIF), é de 1.938,8 $\mu\text{g/mL}$ e 2.663,8 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente. Adicionalmente, em fluído intestinal simulado (FeSSIF) e no fluído intestinal humano alimentado (FeHIF), é de 523,2 $\mu\text{g/mL}$ e 2.111,5 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente (CLARYSSE et al., 2011).

De acordo com Babu e colaboradores (2010), a baixa solubilidade aquosa da furosemida é atribuída a fortes ligações intra e intermoleculares, formadas por pontes de hidrogênio que desfavorecem a solvatação e a hidratação de seus cristais e comprometem sua dissolução (Figura 3).

Figura 3 – Ligações intermoleculares de ponte de hidrogênio entre moléculas de furosemida.

Fonte: BABU et al., 2010.

Após dissolução, a furosemida é preferencialmente absorvida no estômago e no intestino superior, locais nos quais apresenta menor solubilidade, por ser um ácido fraco (GRANERO et al., 2010; SWEETMAN, 2004). Estudos utilizando célula Caco-2 indicaram que sua absorção e sua permeabilidade são mediadas por transporte ativo e não somente por difusão (GRANERO et al., 2010; SWEETMAN, 2004).

Considerando avaliação realizada por perfusão intestinal, a permeabilidade (P_{app}/P_{eff}) da furosemida é de $5,0 \times 10^{-6}$ cm/s (WINIWARTER, 1998). Em ensaios utilizando cultura de células Caco-2, os resultados de permeabilidade variaram entre 0,11 e $0,50 \times 10^{-6}$ cm/s (CORTI et al., 2006; FLANAGAN; BENET, 1999; JUNG et al., 2006; PADE; STAVCHANSKY, 1997; REGE et al., 2001; YAMASHITA et al., 2000).

A furosemida é conhecida como substrato de efluxo mediado por glicoproteínas-P. Quando aplicado gradiente entre os compartimentos apical e basolateral (A-B), observa-se razão de fluxo-efluxo de aproximadamente 50. Essa grande diferença direcional no transporte em células Caco-2 foi atribuída à absorção

paracelular passiva e à secreção da furosemida por efluxo (AL-MOHIZEA, 2010; MOTZ, 2007).

Devido às limitações relacionadas à solubilidade e à permeabilidade da furosemida, diversas estratégias foram utilizadas, para melhorar sua biodisponibilidade. A primeira estratégia adotada foi a aplicação de sistemas de dispersão sólida utilizando a polivinilpirrolidona (PVP). Esse sistema aumentou 17 vezes a velocidade de dissolução do fármaco (AKBUGA; GÜSOY; YETIMOGLU, 1988). Posteriormente, a mesma técnica foi empregada utilizando PVP (CHAULANG et al., 2008), polietilenoglicol 6.000 e celulose microcristalina (PATEL et al., 2010). Ambas formulações apresentaram aumento significativo na velocidade de dissolução, além disso, a dispersão obtida utilizando PVP apresentou amorfização.

Em 2002, Spamer e colaboradores produziram e caracterizaram complexos de furosemida e β -ciclodextrinas. Posteriormente, outros sistemas utilizando β -ciclodextrinas e hidroxipropil- β -ciclodextrinas foram desenvolvidos e avaliados, demonstrando aumento na velocidade de dissolução (FARCAS et al., 2006; SPRICIGO et al., 2008).

Com o objetivo de obter matrizes para liberação prolongada, Al e colaboradores (2003) incorporaram a furosemida a nanocarreadores de gelatina e poliméricos. Essa formulação foi responsável em diminuir a velocidade de liberação de 5 a 300 vezes. No mesmo período, Nassem e colaboradores (2003) utilizaram irradiação de plasma de oxigênio, com o objetivo de aumentar a velocidade de dissolução. No estudo, foi observado aumento no ângulo de molhabilidade, mas nenhuma alteração na velocidade de dissolução.

Goud e colaboradores (2011) desenvolveram cocristais de furosemida com citosina e adenina. Esses apresentaram aumento significativo na solubilidade de saturação, na velocidade de dissolução (duas vezes maior) e melhor estabilidade química em relação ao fármaco não cocrystalizado.

Em 2012, a furosemida foi alvo do desenvolvimento de nanocarreadores peglados, na intercalação em matrizes inorgânicas, na aplicação de fluídos supercríticos e nas formas farmacêuticas mucoadesivas (AMBROGI et al., 2012; DARANDALE; VAVIA, 2012; PERIOLI et al., 2012; YOUAM et al., 2012; ZORDI et al., 2012). Em todas as plataformas utilizadas, foi observado aumento na velocidade de dissolução em meio gástrico simulado. Adicionalmente, Zordi e colaboradores

(2012), utilizando sistema *in silico* GastroPlus[®], observaram diminuição no $T_{\text{máx}}$ (tempo de absorção da concentração máxima do fármaco) e na $C_{\text{máx}}$ (concentração máxima absorvida do fármaco) das dispersões sólidas de furosemida elaboradas utilizando fluído supercrítico, enquanto experimentos realizados por Sadighi e colaboradores (2012) revelaram que complexos de furosemida e hidroxipropil- β -ciclodextrinas induzem a abertura das junções oclusivas (ou *tight junctions*), aumentando a transição do fármaco através das monocamadas de células Caco-2.

Garnero e colaboradores (2013) e Nilesen e colaboradores (2013) desenvolveram, recentemente, complexos supramoleculares de polimorfos e sais sódicos amorfos de furosemida, respectivamente. Ambos os desenvolvimentos apresentaram aumento na velocidade de dissolução em meio gástrico simulado. Além disso, os sais sódicos amorfos apresentaram significativa diminuição no $T_{\text{máx}}$ após administração oral em ratos.

Até o presente momento não há pesquisas relacionadas a nanocristais de furosemida, objeto do presente estudo.

2.2 Considerações gerais sobre a solubilidade, a dissolução e a permeabilidade dos fármacos

Desde a sua criação, em 1995, por Gordon L. Amidon, o Sistema de Classificação Biofarmacêutica (SCB) apresenta-se como ferramenta de valor inestimável para prever a absorção intestinal dos fármacos após a administração oral. Sua grande importância na área farmacêutica está no fato de determinar que o grau de absorção dos fármacos é governado por dois fatores primários: a permeabilidade efetiva, na mucosa intestinal, e suas características de solubilidade e dissolução, nos fluídos gastrointestinais (DAHAN; MILLER; AMIDON, 2009; LOBENBERG; AMIDON, 2000).

De acordo com o SCB, esses fatores são caracterizados por três números adimensionais: número de dose (D_0), número de dissolução (D_n) e número de absorção (A_n). Esses números levam em conta ambos os parâmetros físico-químicos e fisiológicos que são fundamentais para o processo de absorção oral. Assim, o SCB classifica compostos em quatro grupos, de acordo com sua

solubilidade em água e sua permeabilidade intestinal: Classe I (alta solubilidade, alta permeabilidade), Classe II (baixa solubilidade, alta permeabilidade), Classe III (alta solubilidade, baixa permeabilidade) e Classe IV (baixa solubilidade, baixa permeabilidade) (MARTINEZ; AMIDON, 2002).

Outra contribuição relevante, na área farmacêutica, se refere à Regra dos 5, criada por Christopher A. Lipinski, em 1997, e considerada “regra de ouro”, ao indicar determinadas propriedades moleculares como fortes indicadores para prever a permeabilidade gastrointestinal do fármaco. Essa regra estabelece que um composto apresentará biodisponibilidade oral adequada se possuir: peso molecular ≤ 500 daltons, $\text{Log}P \leq 5$, número de aceptores de hidrogênio ≤ 10 e número de doadores de hidrogênio ≤ 5 . Estes dois fatos na história farmacêutica, ao considerarem a importância da solubilidade, da permeabilidade e dos fatores moleculares e físico-químicos que às influenciam, foram responsáveis por mudanças significativas na maneira de se desenvolver novos medicamentos. Partindo de investigações basicamente empíricas, hoje, a descoberta, a avaliação e o aprimoramento de novos fármacos atingiram patamares racionais de desenvolvimento dos medicamentos.

2.2.1 Solubilidade

De acordo com a IUPAC (*International Union of Pure and Applied Chemistry*), a solubilidade corresponde à composição analítica de uma solução saturada, expressa em termos de proporção do soluto em relação ao solvente (GAMSJÄGER et al., 2008). Para a Farmacopeia Americana (2012), solubilidade pode ser definida como a concentração máxima na qual determinada substância apresenta-se totalmente dissolvida em determinado solvente, à temperatura e à pressão conhecidas.

A solubilidade dos fármacos pode ser considerada uma das principais propriedades físico-químicas nas áreas de pesquisa e desenvolvimento de novos fármacos (DELANEY, 2005; YANG; RAN; YALKOW, 2001). Essa propriedade não só apresenta grande influência na absorção, na distribuição, no metabolismo e na excreção (ADME) dos fármacos, como também nos primeiros estágios de avaliação

de novas entidades químicas (NEQ), que utilizam o sistema de *high-throughput screening* (HTS) (DELANEY, 2005).

De acordo com Löbenberg e Amidon (2000), ao se aplicar a primeira lei de *Fick* ao processo de absorção através da superfície da membrana intestinal, temos:

$$J_w = P_w \times C_w = \frac{DM}{Dt} \times \frac{1}{A} \quad Eq. 1$$

onde J_w é o transporte de massa através da parede intestinal, P_w permeabilidade efetiva, C_w a concentração do fármaco na membrana e A é a área de superfície.

Esse modelo (Equação 1) indica quanto a solubilidade e a permeabilidade são variáveis fundamentais para descrever o transporte de massa através das membranas biológicas.

Para que o fármaco consiga atravessar as membranas biológicas, esse deve ser solúvel em água. Quanto maior sua solubilidade aquosa, maior será a velocidade de dissolução e, conseqüentemente, maior será sua absorção; sendo assim, qualquer fármaco, para ser absorvido, deve apresentar-se na forma de solução aquosa no local de absorção (SAVJANI; GAJJAR; SAVJANI, 2012).

Caso o fármaco apresente baixas solubilidade e velocidade de dissolução, após sua administração por via oral, esse será totalmente excretado, sem possibilidade de permear o trato gastrointestinal e atingir o sistema cardiovascular. Sendo assim, não poderá ser estudado (JORGENSEN; DUFFY, 2002).

Desse modo, conhecer rapidamente a solubilidade no processo de descoberta e seleção de NEQ é de fundamental importância. A primeira série de ensaios analíticos, utilizando o sistema de HTS, inclui a avaliação da solubilidade dessas moléculas, partindo de soluções em DMSO (dimetilsulfóxido), posterior adição dessa solução em diversos meios aquosos e avaliação do ponto de precipitação do fármaco por turbidimetria ou nefelometria (BERGSTRÖM et al., 2002; LIPINSKI et al., 2001; STEGEMANN et al., 2007).

Atualmente, mais de 90% das NEQ desenvolvidas na indústria farmacêutica, utilizando técnicas de química combinatória e HTS, apresentam natureza lipofílica, sendo praticamente insolúveis em água. Como consequência, essas NEQ são descartadas nos primeiros estágios de pesquisa, por provavelmente apresentarem

lenta absorção, toxicidade na mucosa gastrointestinal, biodisponibilidade inadequada e variável (BENET; BROCCATELLI; OPREA, 2011; SAVJANI; GAJJAR; SAVJANI, 2011; WALTERS et al., 2011).

Teoricamente, o processo de solubilização ou solvatação de compostos cristalinos ocorre quando partículas sólidas (em excesso) são expostas a uma fase líquida e as moléculas de sua superfície, após determinado intervalo de tempo, alcançam equilíbrio entre aquelas que são desprendidas e aquelas que retornam a essa superfície (Figura 4). A solução final obtida é denominada solução saturada à temperatura e à pressão do experimento (GENNARO et al., 2000).

Figura 4 – Ilustração do processo de solvatação de compostos cristalinos.

$$\mu_2(T, p, x_2) = \mu_{2(\text{sólido})}(T, p) \quad \text{Eq. 2}$$

Fonte: Elaborado pelo autor.

O equilíbrio observado em soluções saturadas é dado pela Equação 2, na qual o potencial químico (μ_2) da fração molar do soluto (x_2) em solução é igual ao potencial químico do soluto no estado sólido ($\mu_{2(\text{sólido})}$), em temperatura e pressão constantes (ATKINS; PAULA, 2011; CASTELLAN, 2003).

A solubilidade ocorre em equilíbrio termodinâmico, o que significa que essa é resultado dos processos simultâneos e opostos de solubilização e união de fase, como por exemplo, a precipitação de sólidos (MYRDAL; YALKOWSKY, 2007).

Com base nos processos termodinâmicos da solubilização e das novas técnicas analíticas disponíveis, é possível classificar a solubilidade em solubilidade de equilíbrio, intrínseca e cinética. Tradicionalmente, as ciências farmacêuticas trabalham com a solubilidade de equilíbrio, que indica a concentração do soluto em solução saturada na presença de excesso de soluto, considerando que tanto a solução quanto o soluto estão em equilíbrio (BOX et al., 2009; MYRDAL; YALKOWSKY, 2007).

A solubilidade intrínseca é considerada a solubilidade de equilíbrio do ácido ou da base livre de um composto ionizável, em pH no qual as moléculas desse composto apresentam-se totalmente não ionizadas ou em sua forma molecular (ALSENZ; KANSY, 2007; LOUIS; AGRAWAL; KHADIKAR, 2010). A solubilidade cinética, por sua vez, é a concentração do composto em solução no momento em que o primeiro precipitado induzido do soluto surge. A indução de precipitação é realizada alterando o pH do meio ou partindo das titulações de soluções orgânicas do fármaco em meios aquosos. Entre as classificações, a solubilidade cinética apresenta grande interesse farmacêutico, pois indica e avalia a real solubilidade dos fármacos em situações de mudança de pH, como observado no trânsito do trato gastrointestinal (ALSENZ; KANSY, 2007; BOX et al., 2009).

Adicionalmente, a solubilidade também pode ser expressa na forma de lipofilicidade ou coeficiente de partição ($\log P$). O $\log P$ é um parâmetro que indica o equilíbrio de partição de um fármaco entre a água e o solvente orgânico n-octanol. Normalmente, é calculado pelo logarítmico da razão entre a concentração em equilíbrio do ativo solubilizado na fase orgânica em relação à fase aquosa. Para fármacos ionizáveis, o coeficiente de distribuição aparente ($\log D$) em pH 7,4 também é utilizado com frequência. Ao contrário do $\log P$, que é válido apenas para uma única espécie elétrica, o $\log D$ refere-se à mistura pH dependente de todas as espécies elétricas presentes em condições de pH específicas (LIU; TESTA; FAHR, 2011).

De acordo com o SCB (1995), os fármacos podem ser classificados, quanto à solubilidade, em alta e baixa. Para que os fármacos sejam classificados como de alta solubilidade, sua maior dose terapêutica deve ser solúvel em volume igual ou menor que 250 mL, em meios aquosos, apresentando valor de pH entre 1,0 e 7,5.

De acordo com a FDA, a OMS, a EMEA (*European Medicines Agency*) e a ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária), a solubilidade dos fármacos

deve ser avaliada em meios apresentando valores de pH entre 1,0 e 6,8 (ANVISA, 2011; EMEA, 2010; FDA; 2000; OMS; 2006).

De forma complementar, o SCB aplica a solubilidade de saturação, para caracterizar os fármacos utilizando o número de dose (D_0). Esse número adimensional (Equação 3) é definido como a razão entre o produto da divisão da dose do fármaco (M) pelo volume de água administrado (V_0) e a solubilidade de saturação (C_s):

$$D_0 = \frac{M/V_0}{C_s} \quad Eq. 3$$

Um D_0 igual ou inferior a 1 indica alta solubilidade, enquanto que número dose igual ou superior a 1 indica que o fármaco apresenta baixa solubilidade.

Deve-se enfatizar que a solubilidade aquosa dos fármacos, tal como os métodos de avaliação, não são necessariamente adequados para determinar a solubilidade nos fluídos intestinais. Com efeito, a solubilidade intestinal, não só depende da solubilidade intrínseca do fármaco, mas também é afetada por múltiplos fatores intraluminais, incluindo pH, presença de micelas formadas pelos ácidos biliares, fosfolipídios e produtos da digestão de lipídica (DRESSMAN et al., 2007).

Essa questão é responsável pelo desenvolvimento de novos métodos de avaliação da solubilidade, que utilizam fluído intestinal humano aspirado e fluídos intestinais simulados tanto no estado alimentado como não alimentado (AUGUSTIJNS et al., 2013; CLARYSSE et al., 2011).

Considerando os fenômenos qualitativos que ocorrem no processo de solubilização, podemos designar esse processo como dissolução. Durante o processo de dissolução, diferentes fenômenos físicos ocorrem: (a) a superfície da partícula entra em contato com a água; (b) as ligações do estado sólido se quebram; (c) as moléculas, os íons e os átomos individualizados são recobertos por moléculas de água, dando origem ao processo de solvatação; (d) as moléculas, os íons e os átomos individualizados difundem-se da superfície da partícula para o líquido, passando pela camada de difusão e atingindo o sistema onde o fluído está sob agitação; (e) caso o fluído encontre-se sob agitação, as moléculas, íons e átomos do fármaco serão transportados por convecção no fluído. Deve-se destacar que esses

processos não ocorrem separadamente, mas em série (SIEPMANN; SIPEMANN, 2013).

De forma similar, a velocidade de dissolução de um fármaco em um solvente indica a velocidade do processo em que moléculas do fármaco deixam a superfície da partícula sólida e difundem-se para o centro do solvente, dispersando-se molecularmente. Esse processo geralmente é equacionado como a mudança na concentração do fármaco solubilizado (dc), em determinado intervalo de tempo (dt) (Equação 4):

$$\text{Velocidade de dissolução} = \frac{dc}{dt} \quad \text{Eq. 4}$$

É possível definir qualitativa e quantitativamente a velocidade de dissolução de determinado fármaco. O tratamento mais simples é baseado no modelo ilustrado pela Figura 5. A partícula sólida dispersa é envolvida por fina camada do solvente apresentando espessura finita, h , em centímetros. Essa camada é considerada parte integral da partícula e é denominada como camada imóvel ou camada de difusão. Independentemente de quão rápido a solução é agitada, a camada de difusão permanece como parte da superfície da partícula, movimentando-se com ela. Sua espessura diminui à medida que a agitação da solução aumenta, porém sempre apresentará espessura finita (ABDOU; HANNA; MUHAMMAD et al., 2000).

Figura 5 – Modelo físico que representa o processo de dissolução.

Fonte: Elaborado pelo autor.

Aplicando a lei de *Fick* ao fenômeno de dissolução (Equação 5), considera-se que a velocidade na qual as moléculas do soluto dissolvido se difundem na camada de difusão é determinada pela diferença de concentração existente entre a superfície da partícula (C_1) e o limite da camada de difusão (C_2) (Figura 5). Assim, quanto maior a diferença na concentração ($C_1 - C_2$), maior é a velocidade de dissolução, onde D é uma constante proporcional denominada coeficiente de difusão, em cm^2s^{-1} (ABDOU; HANNA; MUHAMMAD et al., 2000).

$$\frac{dc}{dt} = \frac{DA}{h} (C_1 - C_2) \quad \text{Eq. 5}$$

Da mesma forma, a velocidade de dissolução apresenta relação direta com a superfície da partícula (A) exposta ao solvente e inversamente proporcional à largura da camada de difusão.

Na avaliação experimental da velocidade de dissolução, a concentração C_2 mantém-se menor, comparada a C_1 , e, por isso, exerce efeito insignificante na velocidade de dissolução. Dessa forma, C_1 , na maioria das vezes, pode ser substituída pela solubilidade de saturação do soluto. Assim, a Equação 5 pode ser simplificada a:

$$\frac{dc}{dt} = \frac{DA}{h} \times (\text{Solubilidade de saturação}) \quad \text{Eq. 6}$$

A Equação 6 pode explicar os fenômenos comumente observados, que alteram a velocidade de dissolução: pequenas partículas solubilizam-se mais rápido em relação a partículas maiores, devido ao aumento da área superficial (A); a agitação do solvente aumenta a velocidade de dissolução, por diminuir a espessura da camada de difusão (h); quanto maior a solubilidade de saturação do soluto, maior

a velocidade de dissolução; e quanto maior a viscosidade do solvente, menor a velocidade de dissolução. Nesse último caso, o coeficiente de difusão (D) é inversamente proporcional à viscosidade (DOKOUMETZIDIS; MACHERAS, 2006).

Noyes e Whitney (1897) conduziram o primeiro experimento de dissolução e publicaram o artigo intitulado “*The rate of solution of solid substances in their own solution*”. Nesse experimento, os autores concluíram que a velocidade de dissolução é proporcional à diferença entre a concentração instantânea da solução, C no tempo t , e a concentração relativa à solubilidade de saturação C_s . Essa afirmação foi equacionada matematicamente como:

$$\frac{dc}{dt} = k(C_s - C) \quad \text{Eq. 7}$$

onde k é denominada constante de proporcionalidade

Os mesmos autores também relacionaram o mecanismo de dissolução e transporte de massa à fina camada de difusão, que se forma ao redor da superfície das partículas sólidas e na qual as moléculas se difundem em direção à solução (GAISFORD; SAUNDERS, 2013).

Posteriormente, com o objetivo de quantificar o passo de transporte de massa, Noyes e Whitney adicionaram à equação de velocidade de dissolução a primeira lei de *Fick*, sobre difusão:

$$\frac{dM}{dt} = -S \cdot D \cdot \frac{dc}{dx} \quad \text{Eq. 8}$$

onde dM representa a transporte de massa em um determinado intervalo de tempo dt ; S representa a área de superfície disponível para a difusão; D o coeficiente de difusão, dc a diferença de concentração e dx a distância a ser superada (SIEPMANN; SIEPMANN, 2013).

Brunner e Tolloczoko¹ (1900 apud DOKOUMETZIDIS; MACHERAS, 2006, p. 2) estenderam as condições nas quais a Equação 8 se mantém e evidenciaram que a velocidade de dissolução depende da área de superfície exposta, da velocidade de agitação, da temperatura, da estrutura da superfície e do arranjo da aparelhagem utilizada no experimento. Assim, um novo modelo foi proposto, derivado da Equação 8, considerando que $k=k_1S$:

$$\frac{dc}{dt} = k_1S(C_s - C) \quad \text{Eq. 9}$$

Posteriormente, baseados nos conceitos de camada de difusão e na segunda lei de *Fick*, Nerst e Brunner² (1904 apud DOKOUMETZIDIS; MACHERAS, 2006, p. 2) desenvolveram modelo matemático alternativo, derivado da Equação 9, denominado equação de *Noyes-Whitney-Nernst-Brunner* (NWNB), que descreve as mudanças de concentração do sólido com o tempo, considerando que $k_1=D/(Vh)$:

$$\frac{dc}{dt} = \frac{DS}{Vh}(C_s - C) \quad \text{Eq. 10}$$

onde h é a espessura da camada de difusão e V o volume do meio.

Na maioria dos casos, os modelos matemáticos assumem que qualquer molécula solubilizada do fármaco, em sua superfície, deve difundir-se através da camada de difusão saturada que envolve a partícula antes de atingir o centro da solução (DOKOUMETZIDIS; MACHERAS, 2006).

¹ BRUNER, L., TOLLOCZKO, S. Über die Auflösungsgeschwindigkeit Fester Körper. Z. Phys. Chem. 35, 283–290, 1900.

² BRUNNER, E. Reaktionsgeschwindigkeit in heterogenen Systemen. Z. Phys.Chem. 43, 56–102, 1904.

Outros modelos descrevendo a velocidade de dissolução foram publicados, entretanto, o modelo NWNB permanece entre aqueles mais utilizados atualmente (GAISFORD; SAUNDERS, 2013).

Com referência ao SCB (1995), a velocidade de dissolução é considerada no número adimensional Dn , que é definido como a relação entre o tempo de residência do fármaco (t_{res}) e o tempo de dissolução (t_{diss}). O t_{diss} , por sua vez, é influenciado por relações entre solubilidade de saturação (C_s), coeficiente de difusão (D), densidade (ρ) e raio inicial da partícula do fármaco (r^2) (Equação 11).

$$Dn = \left(\frac{3D}{r^2} \right) \times \left(\frac{C_s}{\rho} \right) \times t_{res} = \frac{t_{res}}{t_{diss}} \quad Eq. 11$$

2.2.2 Permeabilidade

Estreitamente associada à solubilidade, a permeabilidade exerce papel significativo na absorção dos fármacos e se refere ao fluxo ou à passagem de uma substância através dos tecidos, ou ao grau de penetração dessa substância nos tecidos, por unidade de tempo. Matematicamente, a permeabilidade é igual ao coeficiente de difusão do fármaco (através da membrana), vezes o coeficiente de partição do fármaco membrana/fase aquosa, dividido pela espessura da membrana (DAHAN; MILLER, 2012).

De acordo com a FDA (2000), podemos definir a permeabilidade como a capacidade de passagem do fármaco através do trato gastrointestinal humano, incluindo a resistência aparente ao transporte de massa através da membrana intestinal. Para o SCB (1995), a permeabilidade pode ser classificada como baixa ou alta. Para que os fármacos sejam classificados como de alta permeabilidade, sua fração absorvida *in vivo* deve ser igual ou superior a 90%. Adicionalmente, o SCB caracteriza os fármacos utilizando o número de absorção (A_n). Esse número adimensional (Equação 12) relaciona a permeabilidade efetiva do fármaco (P_{eff}) com o raio do intestino (R) e o tempo de residência do fármaco no intestino delgado. Pode ser definida como a relação entre o tempo de residência do fármaco (t_{res}) e o tempo de absorção (t_{abs}):

$$A_n = \frac{P}{R} \times t_{res} = \frac{t_{res}}{t_{abs}} \quad Eq. 12$$

Com o objetivo de flexibilizar os limites determinados pelo SCB, a OMS, a EMEA e a ANVISA consideram que os fármacos de alta permeabilidade apresentam fração absorvida *in vivo* igual ou superior a 85% (ANVISA, 2011; EMEA, 2010; OMS; 2006).

A permeabilidade pode ser determinada de maneira direta ou indireta. De maneira direta, se avalia a extensão da absorção intestinal dos fármacos em seres humanos utilizando o balanço de massa ou comparando com a dose intravenosa de referência. De maneira indireta, a permeabilidade é determinada realizando medições da velocidade de transferência de massa através da membrana intestinal humana utilizando sistema padrão Loc-I-gut[®]. Alternativamente às duas formas, modelos de perfusão intestinais em animais ou modelos *in vitro* de cultura de células epiteliais também são utilizados (DAHAN; MILLER; AMIDON, 2009; LENNERNAS et al., 1992; LENNERNAS, 1997, 1998).

De modo ideal, a classificação da permeabilidade deveria basear-se em dados experimentais de permeabilidade em humanos, em estudos de balanço de massa bem definidos ou na comparação com dose intravenosa de referência. Entretanto, uma vez que tais dados estão disponíveis apenas para um pequeno número de fármacos, a avaliação da permeabilidade estimada é muitas vezes determinada com base no LogP, como também no LogP calculado (CLogP) (WINIWARTER et al., 2003).

Fármacos que exibem LogP maior do que o ativo metoprolol (LogP= 1,72) são classificados como de alta permeabilidade. Por ser 95% absorvido no trato gastrointestinal, o metoprolol é utilizado como padrão de referência entre os limites de baixa e alta permeabilidade (KIN et al., 2006). Destaque deve ser dado à limitação da previsão de permeabilidade por correlações de lipofilicidade utilizando o LogP. Fármacos cuja absorção intestinal é mediada por transportadores, seja na direção de absorção ou excreção, terão suas permeabilidades subestimada ou superestimada, respectivamente (DAHAN; MILLER; AMIDON, 2009).

Nesse sentido, os modelos *in vitro* de cultura de células epiteliais apresentam-se como alternativa para as limitações das técnicas *in vivo* e dos modelos de previsão de permeabilidade com base em correlações de lipofilicidade. Atualmente,

a técnica mais adequada para a determinação da permeabilidade *in vitro* é a proposta por Per Artursson (1990), na qual monocamadas de culturas das células Caco-2 são utilizadas.

Os resultados de permeabilidade obtidos nas técnicas empregando as monocamadas de células Caco-2 apresentam significativa correlação com a absorção intestinal humana (ZHAO, 2001). De acordo com Yee (1997), fármacos que apresentam permeabilidade aparente (Papp) menor que 1×10^{-6} cm/s, entre 1 e 10×10^{-6} cm/s e maior que 10×10^{-6} cm/s apresentarão baixa, média e alta permeabilidades, respectivamente. Para Artursson e colaboradores (2001), fármacos completamente absorvidos apresentam altos coeficientes de permeabilidade aparente ($Papp > 1 \times 10^{-6}$ cm/s), enquanto que fármacos absorvidos de maneira incompleta apresentam baixos coeficientes de permeabilidade ($Papp < 1 \times 10^{-7}$ cm/s) nas monocamadas Caco-2.

2.2.3 Fatores que influenciam a solubilidade, a velocidade de dissolução e a permeabilidade dos fármacos

Diversos fatores estruturais e físico-químicos influenciam a solubilidade de saturação, a velocidade de dissolução e a permeabilidade dos fármacos nos fluídos e nos tecidos corporais. Dentre esses fatores, é possível destacar características como: *pka*, ponto de fusão, área superficial molecular, polimorfismo e tamanho de partícula (HÖRTER; DRESSMAN, 2001).

Com referência às constantes de ionização (*pka*), elas são responsáveis pela variabilidade das características biofarmacêuticas dos fármacos e de parâmetros de base, como *logD* e solubilidade. Os valores de *pKa* podem influenciar as propriedades físico-químicas, tais como a solubilidade em água, o que, por sua vez, influenciará na formulação de medicamentos. Mais importante ainda: a absorção, a distribuição, o metabolismo, a excreção e a toxicidade (ADMET) são profundamente influenciados pelo estado de carga de compostos em condições de pH sob variação (MANALLACK et al., 2013).

Na sua grande maioria, os fármacos são eletrólitos orgânicos que apresentam sua solubilidade influenciada pelo seu grau de ionização (K_a). A solubilidade de

fármacos com caráter de ácidos fracos aumenta com o aumento do pH (Equação 13). Nessas condições, existe a predominância de espécies ionizadas, que são rapidamente solvatadas e solubilizadas.

$$S = S_0 \times \left(1 + \frac{K_a}{[H^+]}\right) \quad Eq. 13$$

onde S corresponde à solubilidade dependente do pH e S_0 à solubilidade independente do pH.

Em valores de pH maiores que $pH=pK_a+1$, a relação linear entre o logaritmo da solubilidade e o pH é observada até que o limite de solubilidade da forma ionizada seja atingido. O inverso ocorre no caso de fármacos básicos (Equação 14), pois apresentam maior solubilidade em soluções ácidas, nas quais a forma ionizada do fármaco é predominante (BERGSTROM; LUTHMAN; ARTURSSON, 2004; HÖRTER; DRESSMAN, 2001; VÖLGLY et al., 2010).

$$S = S_0 * \left(1 + \frac{[H^+]}{K_a}\right) \quad Eq. 14$$

Outras constantes físico-químicas, como o ponto de fusão, apresentam relações diretas com a solubilidade das moléculas. De acordo com a *lei da solubilidade ideal* (Equação 11), a fração molar solubilizada ($\ln x_2$) do fármaco é influenciada em função da entalpia de fusão (ΔH_{fus}), do ponto de fusão do sólido (T^*) e da temperatura da solução (T), considerando uma solução ideal saturada e R a constante dos gases.

$$\ln x_2 = \frac{\Delta H_{fus}}{R} \left(\frac{1}{T^*} - \frac{1}{T} \right) \quad Eq. 15$$

Fármacos com elevados pontos e entalpias de fusão apresentam pouca solubilidade aquosa em temperaturas normais (ATKINS; PAULA, 2003; CASTELLAN, 2003). Tanto o ponto de fusão em sólidos como o ponto de ebulição de compostos na forma líquida são indicativos da força de coesão molecular. Dessa maneira, essas características podem ser utilizadas como guias para se avaliar a solubilidade (HÖRTER; DRESSMAN, 2001).

Considerando a importância da área de superfície molecular, essa é evidenciada quando os seguintes fatores envolvidos na dissolução de uma partícula são considerados (Figura 6): remoção de uma molécula de soluto da partícula (W_{22}); surgimento de cavidade para a molécula no solvente (W_{12}) e inserção da molécula do soluto na cavidade ($-W_{12}$) (FLORENCE; ATTWOOD, 2003; SHAWAHNA; RAHMAN, 2011).

Figura 6 – Representação esquemática dos três processos envolvidos na dissolução de um soluto cristalino. A expressão para o trabalho envolvido é $w_{22}+w_{11}-xw_{12}$.

Fonte: Elaborado pelo autor.

De acordo com Marcus (2003), Florence e Attwood (2003), o deslocamento da molécula do soluto para a cavidade do solvente requer número definido de contatos soluto-solvente. Quanto maior a superfície da molécula do soluto, maior o número de contatos e, conseqüentemente, a dificuldade de solubilização. Se a área de superfície da molécula do soluto é A , a interface soluto-solvente aumenta em σ_{12}^A , onde σ_{12} é a tensão interfacial entre o solvente (subscrito 1) e o soluto (subscrito 2). A variação de energia livre na inserção do soluto na cavidade do solvente é expressa por $-\sigma_{12}A$. Dessa maneira, pode-se demonstrar que o trabalho reversível no processo de dissolução é igual a:

$$(w_{11} + w_{22} - x \times w_{12}) \times A \quad Eq. 16$$

A maioria dos fármacos não é composta exclusivamente por hidrocarbonetos apolares, mas também apresenta grupos funcionais polares. O termo w_{12} representa interações soluto-solvente, porém, precisa ser dividido para considerar a interação envolvida na superfície não polar e na superfície polar da molécula (FLORENCE; ATTWOOD, 2003).

A área de superfície polar (*polar surface area* - PSA) é definida como a soma das áreas de todos os átomos polares, primeiramente nitrogênio e oxigênio e, adicionalmente, os hidrogênios ligados. A PSA é um dos parâmetros mais utilizados para avaliar a solubilidade e a permeabilidade dos fármacos, previamente aos ensaios *in vivo*. Moléculas com valores elevados de PSA apresentam elevada solubilidade, porém reduzida biodisponibilidade. Valores de PSA iguais ou menores do que $140 \text{ \AA}^2$ indicam alta permeabilidade e probabilidade de biodisponibilidade oral adequada (ERTL; ROHDE; SELZER, 2000; VEBER et al., 2002).

A área de superfície polar também apresenta relação com as ligações de hidrogênio nas moléculas, que são expressas na forma de doadores e aceptores de hidrogênio. Os doadores de hidrogênio são representados pela soma dos grupos amina (NH) e hidroxila (OH), enquanto que os aceptores são representados pela soma de átomos de nitrogênio (N) e oxigênio (O) (LIPINSK et al., 2012; WINIWARTER et al., 2003). Números excessivos de doadores e aceptores de

hidrogênio prejudicam a permeabilidade dos fármacos através das membranas (ABRAHAM et al., 1994).

Muitos modelos computacionais foram desenvolvidos para a previsão da solubilidade e da permeabilidade dos fármacos. Esses modelos, em sua maioria, baseiam-se nas relações estrutura-propriedade das moléculas (*quantitative structure-property relationship* – QSPR) como topologias moleculares, $\log P$, ponto de fusão, doadores e aceptores de hidrogênio (BERGSTRÖM et al., 2002; DELANEY, 2005; LIPINSK et al., 2012).

Um dos modelos mais conhecidos é a equação geral de solubilidade (*general solubility equation* - GSE), proposta por Jain e Yalkowsky (2001). A GSE (Equação 17) é considerada um simples modelo QSPR, pois utiliza apenas dois descritores, o ponto de fusão modificado ($p.f.^{\circ}C - 25$) e o $\log P$, para prever a solubilidade ($\log S$). O poder de explicação dessa equação ($r^2 = 0,96$ e raiz quadrada do erro quadrático = 0,53, para 1.026 compostos orgânicos) e sua facilidade de utilização a tornam amplamente utilizada pela área farmacêutica (ALI et al., 2012).

$$\log S = 0,5 - 0,01(pf^{\circ}C - 25) - \log P \quad Eq. 17$$

Recentemente, Ali e colaboradores (2012) incluíram na GSE mais um descritor, com o objetivo de melhorar a previsão da solubilidade de coleções virtuais de novas entidades químicas (Equação 18). Nessa nova equação, a PSA foi inclusa por afetar a solubilidade aquosa, apresentando $r^2 = 0,86$ e raiz quadrada do erro quadrático = 0,62.

$$\log S = -1,044 \log P - 0,0056(pf^{\circ}C - 25) - 0,0134PSA + 0,5134 \quad Eq. 18$$

Outra questão envolvendo as propriedades estruturais da molécula está relacionada ao polimorfismo. Esse fenômeno refere-se às diferentes formas

cristalinas ou hábitos cristalinos que os fármacos podem assumir dependendo do solvente de cristalização utilizado no processo de síntese. Cada forma cristalina ou amorfa apresenta diferentes energias de formação. Assim, esses apresentam diferentes características físico-químicas, tais como: densidade, índice de refração, ponto de fusão e solubilidade. O polimorfismo apresenta grande influência na solubilidade e, conseqüentemente, na velocidade de dissolução e biodisponibilidade dos fármacos (GIRON, et al., 2007; HÖRTER; DRESSMAN, 2001; SINGHAL; CURATOLO, 2004).

Em muitos casos, a seleção do polimorfo metaestável, estrutura que apresenta maior solubilidade, pode aumentar a biodisponibilidade do fármaco como, por exemplo, a clorpropamida e a novobiocina. Entretanto, a escolha da forma mais solúvel nem sempre ocasiona aumento da biodisponibilidade, como no caso da forma metaestável do analgésico diflunisal, que apresenta o dobro de solubilidade em relação à forma estável; porém, não foi observada diferença significativa em sua biodisponibilidade. Em alguns casos, a utilização da forma metaestável pode apresentar eventual conversão para a forma mais estável de menor energia e, geralmente, de menor solubilidade (GIRON, 2007; HÖRTER; DRESSMAN, 2001; SINGHAL; CURATOLO, 2004).

Fator adicional e de grande impacto na solubilidade e na velocidade de dissolução dos fármacos refere-se ao tamanho da partícula. A diminuição no tamanho de partícula dos fármacos é responsável por alterações significativas em suas propriedades físico-químicas. Tanto a solubilidade de saturação quanto a velocidade de dissolução são diretamente proporcionais à área de superfície do fármaco, que, por sua vez, aumenta com a redução do tamanho da partícula (FU et al., 2013; HÖRTER; DRESSMAN, 2001; SUN et al., 2012).

Essas alterações físico-químicas podem ser explicadas por meio da equação de *Noyes-Whitney-Nerst-Brunner* (Equação 10). De acordo com a equação, a velocidade de dissolução é diretamente proporcional à área superficial da partícula e inversamente proporcional à espessura da camada de difusão. Com a diminuição do tamanho de partícula, a área superficial aumenta e a espessura da camada de difusão diminui, aumentando a velocidade de dissolução (dc/dt).

De acordo com a equação de Prandtl, a espessura da camada de difusão (h_H) pode ser expressa como:

$$h_H = k(L^{1/2}/V^{1/2}) \quad \text{Eq. 19}$$

onde L é o comprimento da superfície na direção do fluxo, k relaciona-se à constante e V é a velocidade relativa do fluxo do líquido contra a superfície plana.

Acredita-se que alterações no diâmetro da partícula possam corresponder às alterações no parâmetro L e, conseqüentemente, ocasionar diminuição da camada de difusão ao redor das partículas e aumento da velocidade de dissolução (Figura 7) (MOSHARRAF; NYSTRÖM, 1995).

Figura 7 – Influência da camada de difusão (h) na velocidade de dissolução (dc/dt) de microcristais (A) e nanocristais (B). Abreviações: C_{SM} , solubilidade de saturação do fármaco na superfície aquosa; M, micropartícula; N, nanopartícula; C_x , concentração do fármaco nos líquidos intersticiais. $dc/dt \approx (C_s - C_x)/h$.

Fonte: Elaborado pelo autor.

Quanto às alterações na C_s , essas podem ser explicadas pela equação de Kelvin (Equação 20), que demonstra que a pressão de vapor (p) aumenta com a diminuição do ângulo de curvatura das gotículas presentes na fase gasosa. O

mesmo é válido para as partículas sólidas presentes em fase líquida, o que significa aumento da pressão de dissolução (p_x), com diminuição de tamanho de partícula (Figura 8).

$$\ln \frac{p}{p_0} = \frac{-2\gamma V_m}{rRT} \quad \text{Eq. 20}$$

onde p é a pressão de vapor atual, p_0 é a pressão de vapor saturada, γ é a tensão superficial, V_m é o volume molar, R é a constante universal dos gases, r o raio das gotículas e T a temperatura.

Figura 8 – Influência no tamanho de partícula no ângulo de curvatura e, consequentemente, na pressão de dissolução (p).

Fonte: Elaborado pelo autor.

2.3 Estado da arte dos nanocristais

A importância do tamanho de partícula foi reconhecida na área farmacêutica na década de 1950, com os trabalhos realizados por Gordon, que indicaram a

relação entre o aumento da atividade anti-helmíntica da fenotiazida com a redução de suas partículas (FARRINGTON; THOMSON; WHITLOCK, 1962; GORDON, 1956).

Na década de 1990, Kondo (1993a,1993b), Liversidge e colaboradores (1992, 1995), ao diminuírem o tamanho de partícula dos fármacos HO-221, danazol e naproxeno às escalas nanométricas, superaram problemas associados à biodisponibilidade limitada pela velocidade de dissolução.

Nesse mesmo período, G. Liversidge (1992; 1996) propôs abordagem alternativa que revolucionaria as plataformas nanotecnológicas de aplicação nas áreas farmacêuticas. Nessa nova abordagem, denominada *NanoCrystal*[®], partículas de fármacos, na escala nanométrica, foram obtidas, utilizando a tecnologia de moagem à alta energia, empregando moinho de esferas em meio aquoso.

Ao final da década de noventa, Müller e Peters (1998), visando superar as limitações do sistema *NanoCrystal*[®], desenvolveram nova tecnologia, denominada *Dissocubes*[®], baseada no processo de homogeneização à alta pressão. A partir desse processo, nanossuspensões, contendo nanocristais apresentando retículo cristalino cúbico, foram produzidas para administração endovenosa de fármacos de baixa solubilidade.

Do ponto de vista industrial, as tecnologias propostas por Liversidge e Müller foram consideradas as mais relevantes e aplicáveis, sendo posteriormente adquiridas e patenteadas pela *Elan Nanosystem*, atual *Alkermes*, e pela *SkyePharma* (PATHAK; THASSU, 2009; TEMTEM; NEVES; WINTERS, 2013). Entre 2002 e 2003, os primeiros medicamentos aprovados pela FDA, Rapamune[®] (Sirolimus) e Emend[®] (Aprepitant), foram lançados no mercado. Ambos produzidos utilizando a tecnologia de moagem à alta energia.

Desde então, o foco das pesquisas relativas às estratégias para melhorar a biodisponibilidade dos fármacos migrou da escala micro para a nanométrica e propagou-se, gerando inúmeros benefícios nas áreas farmacêuticas e médicas (JUNGHANNS; MÜLLER, 2008; PATHAK; THASSU, 2009).

Atualmente, 8 produtos farmacêuticos produzidos com base nas tecnologias *NanoCrystal*[®] e *Dissocubes*[®] estão disponíveis no mercado (Quadro 1).

Quadro 1 – Medicamentos disponíveis no mercado utilizando as tecnologias *NanoCrystal*[®] e *Dissocube*[®]. Descrição da tecnologia, nome do produto, fármaco, classificação no SCB, indicação terapêutica, via de administração, empresa fabricante, vendas mundiais em 2011 e ano do lançamento no mercado.

Tecnologia	Produto	Fármaco	SCB	Indicação	Via	Empresa	M US\$ (2011)	Ano
ME	Rapamune [®] Comprimido 1-2 mg	Sirolimus	II	Imunossupressor	Oral	Wyeth	372	2002
	Emend [®] Cápsula 8-125 mg	Aprepitanto	IV	Antiemético	Oral	Merck	419	2003
	Tricor [®] Comprimido 48-145 mg	Fenofibrato	II	Hipercolesterolemia	Oral	Abbott	632	2004
	Megace [®] Nanosuspensão 125 mg/mL	Acetato de megestrol	II	Estimulante do apetite	Oral	Par Pharm	58*	2005
	Naprelan [®] Comprimido 375-750 mg	Naproxeno sódico	I/II	Anti-inflamatório	Oral	Wyeth	NI	2006
	Theodur [®] Comprimido 200-400 mg	Teofilina	I	Bronco dilatador	Oral	Mitsubishi Tanabe Pharma	NI	2008
HP	Triglide [®] Comprimido 50-160 mg	Fenofibrato	II	Hipercolesterolemia	Oral	Skye Pharma	NI	2005
	Invega Sustenna [®] Nanosuspensão 39-234 mg/mL	Paliperidona palmitato	II	Esquizofrenia	Injetável	Johnson & Johnson	499	2009

ME: moagem à alta energia; HP: homogeneização à alta pressão; M: milhões; * apenas nos Estados Unidos; NI: não informado. Fonte: GAO et al. (2012); MÖSCHWITZER (2013); TEMTEM; NEVES; WINTERS (2013)

Em levantamento realizado no banco de dados científicos Scopus, utilizando as palavras-chave *nanocrystals*, *nanosuspension*, *drug* e *poor solubility*, aproximadamente 805 trabalhos, relacionados aos nanocristais e às nanossuspensões, foram publicados entre 1995 e 2014 (Figura 9). Os Estados Unidos lideram as colocações, com 26% das publicações, seguidos por China

(25%), Alemanha (10%) e Índia (5%). O Brasil encontra-se na vigésima colocação, ainda iniciando as pesquisas na área (Figura 10). Entre os pesquisadores, o idealizador da tecnologia *Dissocubes*[®], Prof. Dr. Rainer H. Müller, lidera o *ranking* de publicações (Figura 11).

Figura 9 – Evolução do número de publicações de artigo sobre nanocristais entre 1995 e 2013.

Figura 10 – Número de publicações entre os países no período de 1995 a 2013.

Figura 11 – Número de publicações sobre nanocristais em relação aos pesquisadores.

Fonte: Elaborado pelo autor.

Até o presente momento, foram obtidos nanocristais e nanossuspensões de 55 diferentes fármacos utilizando as duas principais tecnologias de produção, a homogeneização à alta pressão (HP) e moagem à alta energia (ME) (Apêndice A).

2.3.1 Propriedades biofarmacêuticas dos nanocristais

Por definição, os nanocristais são considerados nanopartículas compostas somente pelo fármaco estabilizado por agentes tensoativos e poliméricos, isentas de outros componentes que formem matrizes e que apresentem tamanho menor que 1 μm (FU et al., 2013; JACOBS; KAYSER; MÜLLER, 2000; JUNGHANS; MÜLLER, 2008, KECK; MÜLLER, 2006; MÜLLER; GOHLA; KECK, 2011; RABINOW, 2004).

Na maioria das vezes, a obtenção dos nanocristais é precedida pela dispersão do fármaco em veículos estabilizados por tensoativos e polímeros. Posteriormente, essa dispersão é submetida aos processos de moagem ou

homogeneização, responsáveis em fragmentar as partículas do fármaco, originando às nanossuspensões, que, por sua vez, são consideradas dispersões coloidais de nanocristais, com tamanho entre 100 e 1.000 nm, em veículos estabilizados (GAO et al., 2012 e 2013; PATRAVALE; DATE; KULKARINI et al., 2004).

De modo complementar, o vocabulário de nanotecnologia elaborado pela *British Standards* (2011) define nanocristal como um sólido na escala nanométrica que apresenta retículos compostos por átomos, íons ou moléculas.

Entre as plataformas nanotecnológicas disponíveis na área farmacêutica, os nanocristais têm revelado grande potencial para solucionar problemas associados à baixa solubilidade, à velocidade de dissolução e à reduzida biodisponibilidade dos fármacos (PATRAVALE; DATE; KULKARNI, 2004; MÜLLER; GOHLA; KECK, 2011).

Atualmente, as tecnologias inovadoras para desenvolvimento de candidatos a protótipos de novos fármacos, como a química combinatória e os sistemas *HTPS*, são responsáveis pela obtenção de moléculas muito lipofílicas. Estima-se que 40% dos novos fármacos apresentem baixa solubilidade aquosa e que, frequentemente, por esse motivo, 70% desses sejam abandonados durante os primeiros passos de sua descoberta. Além disso, 50% dos fármacos disponíveis no atual arsenal terapêutico apresentam elevada lipofilicidade, gerando verdadeiro desafio para os formuladores (DOLENC et al., 2009; KOCBEK; BAUMGARTNER; KRISTL, 2006; LIPINSK, 2002).

Nesse contexto, a capacidade dos nanocristais em promover alterações significativas nas propriedades físico-químicas dos fármacos, associada à melhor compreensão dos aspectos biofarmacêuticos envolvidos nos processos de absorção, são responsáveis pelo seu promissor desempenho *in vivo* (MÖSCHWITZER, 2013).

Os nanocristais têm demonstrado capacidade de solucionar problemas biofarmacêuticos, como: biodisponibilidade variável e reduzida após administração oral; variações de biodisponibilidade nos estados alimentado e não alimentado; administração de altas dosagens terapêuticas; extenso período para o início da ação terapêutica; variação de biodisponibilidade entre pacientes; irritação local; limitações quanto a via de administração; baixa penetração na pele; utilização de volumes elevados de diluente para administração intravenosa; utilização de solventes tóxicos ou pH extremos para a solubilização do fármaco e efeitos indesejáveis após aplicação via parenteral (MÜLLER et al., 2011; GAO et al., 2013).

Essas limitações são solucionadas, pois os fármacos, na forma de nanocristais, quando comparados aos fármacos micronizados, apresentam significativo aumento na solubilidade de saturação e na velocidade de dissolução, além de maior bioadesividade nas superfícies das membranas celulares. Essas novas propriedades são atribuídas à escala nanométrica e estão relacionadas com a redução acentuada da camada de difusão que circunda as partículas e também devido ao aumento significativo da área e curvatura de superfície dos nanocristais (DURÁN et al., 2010; JUNGHANS; MÜLLER, 2008).

As novas características físico-químicas observadas nos nanocristais podem ser elucidadas a partir dos modelos matemáticos que relacionam os fatores que influenciam a solubilidade, a velocidade de dissolução e a permeabilidade dos fármacos. De acordo com a equação de *Noyes-Whitney-Nernst-Brunner* (Equação 9), com o número adimensional Dn (Equação 11) e a equação de Prandtl (Equação 19), a redução no tamanho de partícula é responsável pelo aumento na superfície, diminuição na espessura da camada de difusão e pelo consequente aumento na velocidade de dissolução. Com base na equação de *Kelvin* (Equação 20), é possível identificar que aumento do ângulo de curvatura da superfície da partícula é responsável em aumentar a pressão de dissolução e, consequentemente, sua solubilidade de saturação.

A Lei de Fick aplicada ao processo de absorção (Equação 1) demonstra que, quando os fármacos são administrados na forma de nanocristais, o aumento da solubilidade de saturação e velocidade de dissolução é responsável em elevar o gradiente de concentração do fármaco entre a parede celular e os vasos sanguíneos. Consequentemente, quanto maior a concentração dos fármacos na membrana, maior é a difusão e o transporte de massa nos tecidos. As propriedades inovadoras presentes nos nanocristais e as relações que as influenciam são ilustradas na Figura 12.

Figura 12 – Características dos nanocristais: 1. Aumento na solubilidade de saturação, devido ao aumento da pressão de dissolução causada pela superfície de maior curvatura dos nanocristais; 2. Aumento na velocidade de dissolução, devido ao aumento de área superficial e diminuição da camada de difusão; 3. Aumento na adesividade do produto, devido ao aumento da área superficial (cálculos realizados considerando as partículas na forma de cubos).

Fonte: Müller et al., 2011.

Quanto à bioadesividade, esse efeito também desempenha papel importante no aumento da biodisponibilidade dos nanocristais após administração oral e pulmonar. Existem quatro teorias gerais sobre os mecanismos de bioadesividade das nanopartículas: a teoria eletrônica (atração eletrostática entre as superfícies de partículas e muco); a teoria de adsorção (forças secundárias, tais como pontes de hidrogênio e ligações de Van der Waals, entre as superfícies de nanocristais e

muco); a teoria da difusão (interpenetração e emaranhamento físico dos nanocristais nas microvilosidades - Figura 13); e a teoria de aprisionamento ou de retenção dos nanocristais na superfície desigual da mucosa (DURÁN et al., 2010; JUNGHANS; MÜLLER, 2008).

Figura 13 – Ilustração sobre o contato, a interpenetração e o aprisionamento de macropartículas e nanopartículas na superfície dos enterócitos.

Fonte: Elaborado pelo autor.

Comparando os nanocristais aos sistemas matriciais nanoestruturados (Figura 14), destacam-se as vantagens relacionadas à maior facilidade de obtenção e o fato dos nanocristais não exigirem a avaliação da eficiência de encapsulamento ou associação, pois são constituídos 100% pelo fármaco. Além disso, os nanocristais não necessitam de outras avaliações, normalmente necessárias, em sistemas matriciais, tais como: avaliações de eficiência de formação das matrizes,

estudos de cinética de liberação e estudos de estabilidade do fármaco no interior da matriz.

Figura 14 – Diferentes sistemas nanoestruturados de liberação de fármaco.

Fonte: Elaborado pelo autor.

Considerando as diferentes vias de administração, os nanocristais podem ser administrados por via oral, tópica, ocular, intravenosa e pulmonar. Na maioria das vezes, apresentando melhor desempenho quando comparado ao dos seus homólogos, em escala micrométrica.

De acordo com o Apêndice B, diversas pesquisas demonstraram que os nanocristais apresentam efeito positivo na absorção oral de fármacos, que possuem limitações quanto à solubilidade e à permeabilidade. Estudos *in vivo* indicam que as principais alterações nos parâmetros farmacocinéticos incluem o aumento na concentração máxima plasmática ($C_{máx}$), a redução do tempo para concentração plasmática máxima ($T_{máx}$), o aumento da área sob a curva (AUC), a melhor proporcionalidade da dose (diminuição da dose terapêutica) e a reduzida variabilidade entre os estados alimentado e não alimentado.

A administração de atovaquone, um antibiótico usado no tratamento de infecções por *Pneumocystis carinii*, na forma de nanossuspensões, resultou aumento na biodisponibilidade oral em 2,5 vezes na comparação com o produto comercial Wellvone[®], que contém o fármaco micronizado (SCHÖLER et al., 2001). O aumento na biodisponibilidade oral foi atribuído à bioadesividade e ao aumento da área de superfície e da solubilidade de saturação devido à redução do tamanho de partícula de dez a cinquenta vezes.

O fármaco Danazol, inibidor da gonadotrofina, apresentou aumento de 16 vezes na biodisponibilidade, quando administrado na forma de nanossuspensão em comparação com a macrossuspensão comercializada Danocrine[®], que, por sua vez, apresentou biodisponibilidade de apenas 5,2% (LIVERSIDGE; CUNDY, 1995). A administração oral da anfotericina B nanossuspensão produziu aumento substancial na absorção oral em comparação com as formulações comerciais (KAYSER et al., 2003).

Em relação à reduzida variabilidade entre os estados alimentado e não alimentado (pós e pré-prandial), a vantagem dos nanocristais está relacionada com o aumento de sua velocidade de dissolução. Esse processo é rápido em ambas as condições; dessa maneira, a absorção torna-se processo limitado apenas pela permeabilidade (Figura 15) (GAO et al, 2013).

Figura 15 – A absorção oral de macropartículas em geral é um processo limitado pela velocidade de dissolução em ambos os estados (pré/pós-prandial). No caso dos nanocristais, a absorção geralmente é um processo limitado pela permeabilidade.

Fonte: Elaborado pelo autor.

Tanto o medicamento Emend[®] quanto o Triglide[®], já disponíveis no mercado, apresentavam, como principal justificativa para o desenvolvimento na forma de nanocristais, a redução na irregularidade de absorção nos estados alimentado e não alimentado (VAN EERDENBRUGH; MOOTER; AUGUSTIJNS, 2008). Outros fármacos na forma de nanossuspensões, como o cilostazol e itraconazol, também não exibiram irregularidades de absorção em relação aos estados de alimentação (JINNO et al., 2006; MOU et al., 2011).

Quanto à administração parenteral, o emprego de fármacos de baixa solubilidade aquosa através dessa via representa grande desafio para os formuladores. Nessas situações, as formulações exigem a aplicação de sistemas tensoativos, de co-solventes, valores de pH extremos ou de carreadores, como as ciclodextrinas, e podem apresentar problemas de precipitação. Entretanto, essas abordagens, na maioria das vezes, não solucionam os problemas de fármacos de

baixa solubilidade, como também estão associadas a efeitos adversos indesejáveis (MÖSCHWITZER, 2013; SHEGOKAR; MÜLLER, 2010).

Nesse contexto, as nanossuspensões são consideradas abordagem alternativa para resolver problemas de solubilidade e efeitos colaterais presentes nas soluções injetáveis. Essas podem ser formuladas utilizando pequenas quantidades de estabilizantes toleradas pelo organismo, não ocasionando efeitos colaterais, como dor durante a aplicação. Adicionalmente, as nanossuspensões podem ser manipuladas em faixa de pH neutro, em altas concentrações e baixas viscosidades (GAO et al., 2013; MÖSCHWITZER, 2013; SHEGOKAR; MÜLLER, 2010).

Considerando as características físico-químicas da solução injetável de furosemida, essa, de acordo com a Farmacopeia Brasileira 5^a edição, deve apresentar valores de pH entre 8,0 e 9,3, para garantir total solubilidade do fármaco. Valores elevados de pH em soluções injetáveis são responsáveis em causar dor durante a aplicação e precipitações do fármaco após diluição do veículo no sangue (DAVIO et al., 1991; WARD; YALKOWSKY; 1993).

Em 2009, a primeira nanossuspensão parenteral foi lançada com sucesso no mercado. Nanossuspensões de palmitato de paliperidona, obtidas utilizando a tecnologia NanoCrystal[®], são comercializadas em seringas prontas para o uso, que oferecem manejo amigável para o paciente, pois apresentam baixa viscosidade e elevada concentração de fármaco, resultando em reduzidos volumes de administração e menores níveis de dor após a injeção (GAO et al., 2013; MÖSCHWITZER, 2013; SHEGOKAR; MÜLLER, 2010).

Outra consideração importante, relacionada à administração endovenosa, refere-se ao efeito prolongado que as nanossuspensões podem oferecer. Em casos nos quais os nanocristais não se dissolvem imediatamente, esses serão acumulados nos órgãos ricos no sistema mononuclear fagocítico. Tal fato pode desenvolver ação prolongada do fármaco. Alguns trabalhos demonstraram que a administração de nanossuspensões, por via intravenosa, apresentou melhor tolerabilidade em pacientes em comparação com as soluções injetáveis (GAO et al., 2007, 2008; KIPP, 2004; MERISKO-LIVERSIDGE et al., 2003; RABINOW et al., 2007).

No que se refere à via de administração pulmonar, a utilização de nanocristais ou de nanossuspensões inaláveis pode ser considerada área emergente e de grande interesse farmacêutico, pois oferecem vantagens para a administração de

fármacos com baixa solubilidade, uma vez que apresentam maior eficiência de deposição pulmonar, melhor redispersibilidade, maior tempo de retenção, comparada às micropartículas, e consequente aumento de sua biodisponibilidade (GEISER; KREYLING, 2013; ZHANG et al., 2011; ROA et al., 2011).

Os principais fatores que viabilizam o pulmão como via de administração de fármacos, para o tratamento de doenças sistêmicas e locais, referem-se: à sua extensa área de superfície epitelial, à sua elevada vascularização, à delgada espessura do epitélio alveolar, à capacidade de troca de solutos utilizados e à ausência de metabolismo de primeira passagem (SCHEUCH et al., 2006). Além disso, a administração de fármacos via pulmonar oferece diversas vantagens, quando comparada às vias intravenosa, oral, bucal, transdérmica, vaginal, nasal e ocular, conforme descrito no Quadro 2.

Quadro 2 – Vantagens da administração de fármacos por via pulmonar no tratamento de doenças respiratórias e sistêmicas.

<i>Tratamento de doenças respiratórias</i>	<i>Tratamento de doenças sistêmicas</i>
Libera altas concentrações de fármaco no local da doença.	Método não invasivo.
Minimiza o risco de efeitos adversos sistêmicos.	Adequado para diversas substâncias, variando de pequenas a grandes moléculas.
Respostas clínicas rápidas.	Grande área de absorção (100 m ²).
Evita problemas de baixa absorção gastrointestinal.	Grandes moléculas com baixa velocidade de absorção podem ser absorvidas em quantidades significativas; baixa atividade mucociliar na periferia dos pulmões resulta em maior permanência do fármaco.
Ambiente de baixa atividade enzimática e isento do metabolismo de primeira passagem.	Ambiente de baixa atividade enzimática e isento do metabolismo de primeira passagem.
Doses menores apresentam efeito terapêutico similar ou superior quando comparado a doses orais terapêuticas.	Cinética de absorção reprodutível. A liberação pulmonar não depende da dieta do paciente, enzimas extracelulares e diferenças metabólicas entre pacientes, que afetam a absorção gastrointestinal.

Adaptado de Labiris e Dolovich (2003), Chiang e colaboradores (2009).

O potencial aumento na biodisponibilidade pulmonar após administração dos nanocristais atribui-se à maior eficiência de deposição na superfície alveolar e à habilidade única de não serem removidos por atividade fagocítica e mucociliar. Dessa maneira, é possível observar maior tempo de residência do fármaco e, como consequência, maior absorção (GHIRARDELLI et al., 1999; OBERDORSTER et al., 1994; OBERDORSTER et al., 2005; ROGUEDA; TRAINI, 2007). Nos trabalhos realizados por Möller e colaboradores (2008), foi observado que apenas 25% de nanopartículas de carbono, com 100nm de tamanho, foram removidas pelo movimento mucociliar em 24 horas, enquanto que 75% das nanopartículas permaneceram retidas por mais de 48 horas.

No trato respiratório, as vias aéreas bifurcam aproximadamente de 18 a 19 vezes antes de atingir os alvéolos (Figura 16). Nesse percurso, a deposição das partículas ocorreu obedecendo as forças de impacto (inércia), sedimentação (gravidade) e difusão Browniana.

Figura 16 – Bifurcações e sistemas de deposição no trato respiratório.

Fonte: Elaborado pelo autor.

Os mecanismos e o padrão de eficiência da deposição de partículas dependerão da forma como se depositam ao longo do sistema respiratório. No caso das nanopartículas, essas apresentam alta eficiência de depósito das vias aéreas superiores até os alvéolos, pois obedecem as forças referentes ao movimento Browniano. Portanto, apenas o seu diâmetro termodinâmico é relevante durante a inalação (PATTON; BYRON, 2007).

Em relação à absorção pulmonar, em todo o percurso, as vias aéreas são compostas por epitélio colunar pseudoestratificado, que apresenta progressiva redução da espessura até atingir os alvéolos. Nesse ponto, a absorção do fármaco é controlada por uma fina barreira alvéolo-vascular permeável (Figura 17). O número de alvéolos varia de 200 a 600 milhões, resultando em extensa superfície epitelial de aproximadamente 100 m^2 . Esse epitélio consiste de uma única camada fina de células do tipo 1, que apresentam 0,1 a 0,2 μm de espessura (PATTON; BYRON, 2007; PARK et al., 2007).

Figura 17 – Representação do trato respiratório dividido em vias aéreas superiores (extratorácica) e vias aéreas inferiores (intratorácica).

Fonte: Elaborado pelo autor.

Embora o mecanismo de absorção não seja totalmente elucidado, foi identificada possibilidade de macromoléculas atravessarem as células pulmonares por transcitose (mediada por caveolis), transporte paracelular, entre junções celulares, ou através de poros transitórios no epitélio causados por lesão celular (LABIRIS; DOLOVICH, 2003).

Em relação à deposição dos nanocristais no sistema respiratório, Ostrander e colaboradores (1990) observaram que nanossuspensões de dipropionato de beclometasona comparadas com o produto comercial Vancerilw[®] demonstraram menor deposição na garganta e aumento de 56 para 72% na fração inalável. Pesquisas recentes realizadas por Zhang e colaboradores (2011) observaram que nanocristais do flavonoide balaceína, administrados através da via pulmonar,

demonstraram biodisponibilidade superior à administração oral dos mesmos nanocristais e parâmetros farmacocinéticos semelhantes à injeção intravenosa de balaceína.

No que se referem às outras formulações contendo nanocristais, administrados por via pulmonar, foram encontradas algumas observações nas propriedades farmacocinéticas dos fármacos (conforme Quadro 3).

Quadro 3 – Alterações nas propriedades farmacocinéticas das formulações de nanocristais de administração pulmonar em relação aos seus homólogos.

Fármaco	Tecnologia	Tamanho médio	Comparação Farmacocinética	Avaliação
Budesonida	NR	75 a 300 nm	Aumento de 1,8 vezes o $C_{máx}$, redução de 1,7 vezes no $T_{máx}$.	Humanos
Budesonida	NR	Menor que 1 μ m	Aumento de 1,5 vezes o $C_{máx}$, redução de 3,0 vezes no $T_{máx}$.	Humanos
Itraconazol	ME	190 a 150 nm	$C_{máx}$ das nanopartículas amorfas foram 3,0 vezes maiores do que as nanopartículas cristalinas.	Ratos
Itraconazol	PRE	Menor que 1 μ m	Significativo aumento na concentração pulmonar do fármaco.	Ratos
Sulfato de Atropina	PRE	300 nm	$T_{máx}$ atingido com 15 minutos, sem comparação de dados.	Humanos

NR: não relatado; ME: moagem à alta energia; PRE: precipitação; $C_{máx}$: concentração máxima plasmática; $T_{máx}$: tempo onde $C_{máx}$ foi atingida.

Fonte: Adaptado de Gao et al., 2012.

Até o presente momento, não foram encontrados trabalhos e pesquisas nos principais bancos de dados científicos utilizando nanocristais de furosemida para a administração oral, endovenosa e pulmonar.

2.3.2 Principais tecnologias de obtenção de nanocristais

Existem diversas possibilidades de se produzir nanocristais no tamanho e na forma desejados. O Quadro 4 apresenta as principais técnicas utilizadas para a obtenção de nanocristais. Geralmente, as tecnologias são agrupadas em três categorias, *bottom-up*, *top-down* e combinações de tecnologias (DURÁN et al., 2010).

Quadro 4 – Tecnologias de obtenção de nanocristais. Descrição dos processos, designações comerciais registradas, princípios e referências.

Tecnologia		Princípios		Referências	
Top-down	Moagem à alta energia	NanoCrystal [®] <small>(Alkermes)</small>	Moagem à alta energia utilizando moinho de esferas em meio aquoso.	LIVERSIDGE et al., 1992; LIVERSIDGE; CONZENTINO, 1995	
		NI	Moagem à alta energia utilizando moinho de esferas em meio aquoso, sob movimentos de revolução/rotação.	TAKATSUKA et al., 2009	
	Homogeneização à alta pressão	Dissocubes [®] <small>(SkyePharma)</small>	Homogeneização à alta pressão utilizando veículo aquoso.	MÜLLER; PETERS, 1998	
		Nanopure [®] <small>(PharmaSol)</small>	Homogeneização à alta pressão utilizando veículo não aquoso (polietilenoglicol e óleos).	RADTKE, 2001	
		SolEmuls [®]	Fármaco disperso em emulsão óleo em água (o/a), contendo o estabilizante lecitina, e submetido à homogeneização à alta pressão.	AKKAR; MÜLLER, 2002	
		IDD-P [®] <small>(SkyePharma)</small>	Homogeneização sob corrente de jato.	JUNGHANNS; MÜLLER, 2008	
Bottom-up	Precipitação	NI	Hydrosol [®] <small>(Novartis)</small>	Precipitação solvente antissolvente “ <i>via humida paratum</i> ”.	SUCKER; GASSMANN, 1992
				Precipitação evaporativa em solução aquosa.	GASSMANN et al., 1994; CHEN et al., 2002
				Precipitação sob centrifugação.	CHIOU et al., 2007
				Precipitação solvente antissolvente sob corrente de jato.	BENET et al., 2002
				Precipitação por rápida expansão de fluídos supercríticos.	MASTON et al., 1987
				Precipitação supercrítica antissolvente.	BYRAPPA; OHARA; ADSCHIRI, 2008
				Precipitação sob ultrassom.	DHUMAL et al., 2008
	Evaporação de Solvente		Solubilização e evaporação do solvente utilizando tecnologia <i>Spray Drying</i> .	LEE et al., 2011 SALAZAR; MÖSCHWITZER; MÜLLER, 2013	
			Solubilização e evaporação do solvente utilizando liofilização.	HU et al., 2003 WARD et al., 2008	
			Eletrospray.	GOMEZ et al., 1998	
Combinações	Nanoedge [®] <small>(Baxter)</small>		Precipitação e posterior homogeneização à alta pressão.	RABINOW et al., 2004	
	H69		Precipitação ocasionada durante o processo de homogeneização à alta pressão.	MÜLLER; MÖSCHWITZER, 2005	
	H42		Evaporação do solvente por <i>Spray Drying</i> e posterior homogeneização à alta pressão.	MÖSCHWITZER, 2005	
	H96		Evaporação do solvente por liofilização e posterior homogeneização à alta pressão.	MÖSCHWITZER; LEMKE, 2005; SHEGOKAR; MÜLLER, 2010	
	CT		Moagem à alta energia utilizando moinho de esferas em meio aquoso e posterior homogeneização à alta pressão.	SHEGOKAR; MÜLLER, 2010	
Combinações	-		Precipitação, liofilização e posterior homogeneização à alta pressão.	MARAKUL et al., 2013	
	-		Liofilização não-aquosa e posterior homogeneização à alta pressão.	SALAZAR; MÖSCHWITZER, MÜLLER et al., 2013	
	ARTcrystal [®]		Homogeneização em alta velocidade utilizando sistema rotor-estator e posterior homogeneização à baixa pressão.	SCHOLZ et al., 2014	

NI: designação comercial registrada não informada.

Nas tecnologias *bottom-up*, os nanocristais são obtidos partindo do plano molecular e atingindo a forma e o tamanho desejados. Geralmente, os nanocristais são obtidos através da precipitação em solvente e posterior secagem, com o objetivo de evitar o crescimento dos cristais. Devido à utilização de solventes orgânicos e à dificuldade em controle de tamanho de partícula, os processos *bottom-up* não apresentaram suficiente interesse para tornarem-se padrão na indústria farmacêutica (MÖSCHWITZER, 2013).

No caso das tecnologias *top-down*, o processo é iniciado a partir de partículas sólidas em escala micrométrica e essas são submetidas à fragmentação mecânica, sob determinadas condições, resultando em nanocristais (KHARB et al., 2006; MÜLLER; PETERS, 1998; PATRAVALE; DATE; KULKARNI, 2004; MISHRAA et al., 2009; DURÁN et al., 2010).

Dentre os processos por moagem à alta energia, podemos destacar aquele que emprega movimentos de rotação e revolução simultâneos, para garantir maior eficiência de nanopulverização. Nesse processo, em recipiente de homogeneização, contendo esferas de zircônio, são aplicados movimentos simultâneos de revolução/rotação, responsáveis por gerar forças centrífugas que atingem a magnitude de 400G. Nessas condições, as esferas produzem elevada energia de impacto e cisalhamento, permitindo a nanopulverização do material, em reduzido intervalo de tempo (TAKATSUKA et al., 2009).

A eficiência da nanopulverização está relacionada com a energia de colisão entre as esferas de zircônio e a parede do recipiente de homogeneização. As esferas estão em contínua rotação da posição A para D devido à rotação do frasco. A esfera sobe, atingindo a posição D devido à força (ω) da rotação, e cai, atingindo a posição A devido à força (Ω) de revolução (TAKATSUKA et al., 2009) (Figura 18).

Figura 18 – a) Ilustração dos movimentos simultâneos de Rotação (ω)/Revolução (Ω), b) as posições assumidas pelas esferas de zircônio durante a homogeneização e c) visão externa e interna do equipamento.

Fonte: Elaborado pelo autor.

As esferas colidem com as partículas do fármaco na parede do recipiente de homogeneização, fragmentando as partículas. Quanto maior a altura que as esferas atingem, maior é a energia de colisão. A altura que as esferas podem atingir está diretamente relacionada com a distância vertical da esfera (h) em relação ao centro do recipiente. As esferas localizadas na posição mais distante (posição D das esferas de zircônio, Figura 18 b), apresentarão maior energia de colisão. Assim, a eficiência de nanopulverização é otimizada no momento em que h apresentar valor igual ao raio do movimento de rotação (TAKATSUKA et al., 2009).

As principais vantagens da moagem à alta energia referem-se à: aplicação em fármacos com baixa solubilidade, tanto em meios aquoso quanto orgânico; e obtenção de nanocristais com distribuição granulométrica estreita e flexibilidade de

produção em escala laboratorial e industrial (MÜLLER; PETERS, 1998; PATRAVALE; DATE; KULKARNI, 2004). Considerando apenas a moagem à alta energia, que emprega o sistema de rotação/revolução, as principais vantagens são: capacidade de nanopulverizar pequenas quantidades de amostra até 100mg; tempo de processo de 2 a 5 minutos; processos padronizados; possibilidade de trabalhar em baixas temperaturas; utilização de pequenas quantidades de meio de pulverização; e apenas o recipiente de nanopulverização precisa ser limpo após o processo (TAKATSUKA et al., 2009).

Comparado aos outros procedimentos de obtenção de nanocristais, a moagem à alta energia apresenta como principal limitação a possível formação de resíduos provenientes do meio de moagem (DURÁN et al., 2010; KHARB et al., 2006).

Metodologia padrão para a aplicação da moagem à alta energia, sob rotação e revolução simultâneos, foi proposta por Takatsuka e colaboradores (2010). Os menores e mais estáveis nanocristais foram obtidos nas condições: diâmetros das esferas de zircônio 0,1mm, quantidade das esferas de zircônia 2,4g, velocidade de revolução 2000 rpm, tempo de homogeneização 2 minutos, volume da solução 0,6 mL e concentração do estabilizante 30% p/p em relação ao fármaco.

Os esforços de diversos grupos industriais e acadêmicos de pesquisa resultaram em várias técnicas de redução de tamanho de partícula. Do ponto de vista industrial, os dois processos mais utilizados em escala comercial são a moagem à alta energia e a homogeneização à alta pressão. Questões relacionadas às diferentes tecnologias, como longos tempos de moagem ou homogeneização e definição dos melhores parâmetros foram extensivamente avaliados e definidos (DENG et al., 2008; JACOBS; KAYSER; MÜLLER, 2000; MÜLLER; PETERS, 1998; SCHOLZ et al., 2014; TAKATSUKA et al., 2009).

Verma e colaboradores (2009), aplicando a ferramenta *quality by design* (QbD), definiram os principais parâmetros que influenciam a formação e estabilidade dos nanocristais. Foi observado que os seguintes parâmetros, em ordem de importância, são pontos críticos do processo: tempo de fragmentação, pressão (quando aplicável), tipo de estabilizante, temperatura e concentração do estabilizante.

Com relação à estabilidade das nanossuspensões, sua produção implica no aumento da área superficial e, por consequência, na interface das partículas dos

fármacos. À medida que a energia livres de Gibbs aumenta, devido ao aumento da interface, as nanossuspensões transformam-se em sistemas termodinamicamente instáveis, originando aglomerações para diminuir a energia total dos sistemas. Cineticamente, o processo de aglomeração depende da energia de ativação. Essa, por sua vez, pode ser influenciada pela adição de estabilizantes (VAN EERDENBRUGH et al., 2008).

Sistemas estabilizadores adequados devem fornecer barreira para a aglomeração. Os possíveis mecanismos para a formação dessa barreira são a estabilização eletrostática ou estérica, que pode ser obtida pela adição de agentes tensoativos carregados, agentes tensoativos não-iônicos e polímeros.

2.4 Ensaios *in silico*

Atualmente, a aplicação da tecnologia computacional na descoberta e no desenvolvimento de novos fármacos demonstra grande potencial. Sua utilização é responsável em reduzir o período de estudos, pois diminui o número de procedimentos experimentais necessários para seleção, desenvolvimento e avaliação das propriedades de novos compostos (AGORAM; WOLTOSZ; BOLGER, 2001).

Simulações da absorção do fármaco por via oral têm sido amplamente utilizadas na descoberta, no desenvolvimento e na regulamentação dos medicamentos. Modelos de previsão de absorção são utilizados para facilitar a seleção de novos candidatos a fármacos, estabelecer estratégia de desenvolvimento da formulação, determinar a velocidade e a extensão da absorção e apoiar o desenvolvimento de políticas regulatórias (HUANG; LEE; YU, 2009).

Diversos modelos e simulações estão disponíveis, entre eles, podemos destacar o programa *Gastroplus*[®], desenvolvido e comercializado pela empresa norte-americana *Simulation Inc*[®] (Figura 19). Esse sistema despertou grande interesse da área científica para sua aplicação no desenvolvimento de formulações, nas correlações *in vitro-in vivo*, na avaliação dos impactos relacionados a características físico-químicas do fármaco na absorção (solubilidade, tamanho e

distribuição de tamanho de partícula), como também nas avaliações para bioisenção de fármacos classes II e III do SCB (DANNENFELSER et al., 2004; HEIKKINEN et al., 2012; HONÓRIO et al., 2013; KUENTZ et al., 2006; OKUMO; DiMASO; LÖBENBERG, 2009; WEI et al., 2008).

Em 2007, a FDA licenciou o uso do *software Gastroplus®*, com o objetivo de adotar métodos científicos inovadores de previsão *in silico*, para aplicação de investigações internas no escritório de Medicamentos Genéricos, no Centro para a Segurança Alimentar e Nutrição Aplicada e no Centro de Medicina Veterinária. Em 2013, mais licenças foram adquiridas exclusivamente para os cientistas do Departamento de Farmacologia Clínica (OCP), uma divisão que é responsável pela análise de dados clínicos, com ênfase no estudo de variabilidade populacional e interações medicamentosas. Grandes empresas, como a Pfizer, também licenciaram o *software* para a realização das primeiras previsões em seres humanos (FIH – *first in human*).

Figura 19 – Tela inicial do sistema computadorizado de previsão *in silico* *Gastroplus®*.

The screenshot displays the Gastroplus software interface. The 'Compound' tab is active, showing the chemical structure of Furosemide (Molecular Formula: C12H11ClN2O5S, Molecular Weight: 330.75, Reference logD: -1, @pH: 6.8). The 'Pharmacokinetics' tab shows simulation parameters: Initial Dose (mg): 100, Subsequent Doses (mg): 0, Dosing Interval (h): 6, Dose Volume (mL): 250, pH for Reference Solubility: 7.2, Solubility (mg/mL @pH=7.2): 2.25, Mean Precipitation time (sec): 900, Diff. Coeff. (cm²/s x 10⁻⁵): 0.876, Drug Particle Density (g/mL): 1.2, User PSD (1 bins). The 'Simulation' tab shows Effective Permeability (Source: Human, P_{eff} (cm/s x 10⁻⁴): 0.3, Sim P_{eff} x 10⁻⁴ (Human): 0.3) and Biorelevant Solubilities (Dose No. = 14.8148, Absorption No. = 0.590, Dissolution No. = 2.347E+6).

Com relação à previsão da absorção oral, o *software Gastroplus®* baseia-se em um modelo dinâmico mecanístico que considera as variáveis espaciais e temporais no processo de absorção, podendo prever tanto a extensão como a velocidade de absorção dos fármacos (HUANG; LEE; YU, 2009). Esse modelo, denominado ACAT (*advanced compartmental absorption and transit*), foi elaborado

por Agoram e colaboradores (2001) e compõe as bases fisiológicas e matemáticas do sistema.

Para realizar as previsões de absorção oral, o modelo ACAT (Figura 20) considera seis estados do fármaco (não liberado, não dissolvido, dissolvido, degradado, metabolizado e absorvido), nove compartimentos (estômago, sete segmentos do intestino delgado e cólon), três estados para o material excretado (não liberado, não dissolvido e dissolvido), cinética de transferência linear e cinética de metabolismo/transporte não lineares. Além disso, o sistema leva em conta fatores físico-químicos (pK_a , solubilidade, tamanho de partícula, densidade de partícula e permeabilidade), fatores fisiológico (esvaziamento gástrico, velocidade de trânsito intestinal, metabolismo de primeira passagem e de transporte luminal) e fatores relacionados à forma farmacêutica (dose e forma farmacêutica) (AGORAM; WOLTOSZ; BOLGER, 2001; HUANG; LEE; YU, 2009).

Figura 20 – Ilustração do modelo de ACAT (*advanced compartmental absorption and transit*) ou absorção compartimental e trânsito avançado.

Fonte: HUANG; LEE; YU, 2009.

Adicionalmente, o modelo ACAT, utilizando dados de atividade *in vitro* de diversas enzimas e transportadores, é capaz de simular saturação cinética não-linear de *Michaelis-Menten* no metabolismo e no transporte dos fármacos administrados por via oral. Nesse sentido, o modelo conseguiu prever com sucesso a absorção oral de medicamentos submetidos a metabolismo de primeira passagem hepática (propranolol), metabolismo de primeira passagem intestinal e hepática (midazolam), fármacos considerados substratos de efluxo (digoxina) e metabolismo de primeira passagem e efluxo (saquinavir). Além disso, este modelo demonstrou potencial para prever interações medicamentosas e alimentos (suco de *grapefruit* como substrato da CYP3A) e interações medicamentosas (rifampicina como inibidor da enzima P-gp no efluxo do fármaco digoxina) durante a absorção do fármaco (AGORAM; WOLTOSZ; BOLGER, 2001; HUANG; LEE; YU, 2009).

Com relação à previsão da absorção pulmonar, o *software Gastroplus*[®], para descrever a administração de moléculas de fármacos intranasais ou inaláveis, baseia-se em modelo dinâmico mecanístico fisiológico de compartimentos do pulmão (MILLER et al., 2010). Esse sistema divide os pulmões em cinco compartimentos, conforme o modelo *International Commission on Radiological Protection* (ICRP 66) (SMITH, 1995): nariz (contendo a passagem nasal anterior); extratorácico (nasofaringe, orofaringe e laringe); torácico (traqueia e brônquios); bronquiolar (bronquíolos e bronquíolos terminais); e alvéolo-intersticial (bronquíolos respiratórios, ductos, sacos alveolares e tecido conjuntivo intersticial) (Figura 21).

Figura 21 – Divisão dos 5 compartimentos do pulmão, conforme o modelo proposto pela ICRP 66.

Fonte: HUANG; LEE; YU, 2009.

Imediatamente após a administração, o fármaco é parcialmente exalado enquanto o restante é ingerido ou depositado na camada de muco que reveste as vias respiratórias. As frações de fármaco depositadas nos compartimentos são previstas pelo modelo de deposição ICRP 66 ou especificadas pelo usuário e dependem das características da formulação, como tamanho, densidade e forma da partícula. Além disso, são considerados diversos processos aos quais o fármaco está sujeito no pulmão, como trânsito mucociliar, dissolução, precipitação, permeação nas células pulmonares, ligação não específica no muco, metabolismo e transferência para a circulação sistêmica (MILLER et al., 2010).

Nesse modelo, a velocidade de dissolução do fármaco no muco pulmonar é descrita pela equação de *Noyes-Whitney-Nernst-Brunner* (Equação 10),

considerando solubilidade do composto no pH do muco pulmonar (pH=6,9), tamanho, forma, densidade das partículas e coeficiente de difusão na água (CHAUDHURI; LUKACOVA, 2010).

No modelo de previsão pulmonar, a absorção do fármaco nos diferentes compartimentos é considerada passiva e impulsionada por um gradiente de concentração. Além disso, o modelo apresenta dependentes fisiológicos, como a área de superfície pulmonar, e as propriedades físico-químicas relacionadas ao fármaco, como, por exemplo, sua permeabilidade. Para simular a absorção gastrointestinal de fármacos depositados na região bucal, como também a concentração plasmática do fármaco após absorção, os compartimentos pulmonares estão relacionados aos modelos ACAT do sistema *Gastroplus*[®] (MILLER et al., 2010).

Em relação à forma farmacêutica do medicamento para a administração pulmonar, frequentemente o fármaco é associado a transportadores, como a lactose. Em tais casos, o modelo assume que as partículas de fármaco formarão revestimento sobre o transportador, caso suas partículas apresentem tamanhos menores do que valor de corte definido pelo usuário. Posteriormente, essas partículas serão distribuídas nos compartimentos pulmonares, de acordo com o diâmetro do complexo formado pelo carreador e o fármaco. No caso das partículas de fármacos maiores do que o valor de corte, essas são distribuídas de acordo com seu próprio diâmetro, independentemente das partículas dos carreadores (CHAUDHURI; LUKACOVA, 2010).

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivos gerais

O presente trabalho teve, como objetivos gerais, a obtenção, a caracterização físico-química e a avaliação *in silico* da absorção oral e pulmonar dos nanocristais de furosemida.

3.2 Objetivos específicos

- 3.2.1 Obtenção dos nanocristais de furosemida utilizando o método de moagem à alta energia por revolução/rotação.
- 3.2.2 Caracterização da distribuição de tamanho, superfície e forma das partículas dos nanocristais empregando técnicas de: difração de raio *laser* e microscopia eletrônica de varredura.
- 3.2.3 Caracterização de possíveis interações e alterações no estado cristalino dos nanocristais empregando técnicas de: calorimetria exploratória diferencial, termogravimetria/termogravimetria diferencial, difração de raio X e espectroscopia Raman de baixo deslocamento.
- 3.2.4 Determinação da solubilidade de saturação dos nanocristais empregando técnica *Shake Flask*.
- 3.2.5 Determinação da dissolução intrínseca dos nanocristais utilizando instrumento *Woods* modificado.
- 3.2.6 Avaliação estatística dos resultados da dissolução intrínseca empregando *software* Minitab[®] versão 16.
- 3.2.7 Avaliação *in silico* das características físico-químicas do fármaco furosemida empregando as plataformas de quimioinformática ChemAxon's[®] Marvin e JChem[®].
- 3.2.8 Avaliação *in silico* da absorção oral dos nanocristais empregando *software* *SimulationPlus oral model*[®].
- 3.2.9 Avaliação *in silico* da deposição dos nanocristais nos diferentes compartimentos do sistema respiratório, assim como sua absorção pulmonar empregando *software* *SimulationPlus pulmonar model*[®].

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Material

4.1.1 Obtenção dos nanocristais de furosemida

4.1.1.1 Matéria-prima, solventes e reagentes

- Furosemida - Allchemistry Ltda., São Paulo, Brasil
- Metilcelulose - Metolose SM-4000[®], Shin-Etsu Ltda., Tóquio, Japão
- Polissorbato 80 - Shin-Etsu Ltda., Tóquio, Japão
- Metilparabeno - Shin-Etsu Ltda., Tóquio, Japão
- Água purificada

4.1.1.2 Aparelhos, equipamentos e acessórios

- Nanopulverizador NP-100[®] - Thinky Co., Ltda., Tóquio, Japão
- Balança analítica - Shimadzu Co., Ltda., Tóquio, Japão
- Esferas de zircônio - Thinky Co., Ltda., Tóquio, Japão
- Proveta de vidro de 100 mL - Pyrex Ltda., Tewksbury, Estados Unidos

4.1.2 Liofilização das nanossuspensões

4.1.2.1 Matéria-prima, solventes e reagentes

- Glicose, Shin-Etsu Ltda., Tóquio, Japão
- Acetona, Shin-Etsu Ltda., Tóquio, Japão
- Nitrogênio Líquido, Air Liquide Ltda., Minatoku, Japão
- Nanossuspensão de furosemida

4.1.2.2 Aparelhos, equipamentos e acessórios

- Liofilizador Christ Alpha 1-5[®] - Martin Christ Ltda., Alemanha

4.1.3 Quantificação de furosemida

4.1.3.1 Matéria-prima, solventes e reagentes

- Água ultrapura
- Tetraidrofurano HPLC, Tédia Ltda., Rio de Janeiro, Brasil
- Ácido acético HPLC, Tédia Ltda., Rio de Janeiro, Brasil
- Furosemida padrão primário (99,8% pureza), Fiocruz, Rio de Janeiro, Brasil
- Furosemida - Allchemistry Ltda., São Paulo, Brasil
- Nanocristais de furosemida

4.1.3.2 Aparelhos, equipamentos e acessórios

- Sistema cromatográfico equipado com detector UV/VIS SPD 10AVP[®], forno de coluna CT10AVP[®] e duas bombas isocráticas LC-10ATVP[®] - Shimadzu Co., Ltda., Kyoto, Japão
- Coluna cromatográfica Luna[®] C18 (5 µm, 200 mm x 4.6 mm) - Phenomenex Co., Ltda., Califórnia, Estados Unidos
- Balança semimicro analítica - Shimadzu Co., Ltda., São Paulo, Brasil

- Balões volumétricos classe A de 25, 50 e 100 mL - Laborglas Ltda., São Paulo, Brasil
- Pipetas volumétricas classe A de 5 mL - Laborglas Ltda., São Paulo, Brasil
- Seringas plásticas 5mL - Becton Dickinson Ltda., Curitiba, São Paulo
- Filtros Millex[®] PVDF 0,45 µm de tamanho de poro - Merck-Millipore, São Paulo, Brasil

4.1.4 Distribuição e tamanho médio de partícula

4.1.4.1 Matéria-prima, solventes e reagentes

- Água purificada
- Polissorbato 80 - Shin-Etsu Ltda., Tóquio, Japão
- Furosemida - Allchemistry Ltda., São Paulo, Brasil
- Nanocristais de furosemida

4.1.4.2 Aparelhos, equipamentos e acessórios

- Equipamento de difração de raio *laser* Mastersizer 2000[®] - Malvern Instruments, Inglaterra
- Unidade de pequeno volume Hidro 2000P[®] - Malvern Instruments, Inglaterra

4.1.5 Microscopia eletrônica de varredura

4.1.5.1 Matéria-prima, solventes e reagentes

- Furosemida - Allchemistry Ltda., São Paulo, Brasil
- Nanocristais de furosemida

4.1.5.2 Aparelhos, equipamentos e acessórios

- Microscópio eletrônico de varredura SU-3400[®] - Hitachi High Technologies, Tóquio, Japão

4.1.6 Calorimetria exploratória diferencial e termogravimetria/termogravimetria derivada

4.1.6.1 Matéria-prima, solventes e reagentes

- Metilcelulose - Metolose SM-4000[®], Shin-Etsu Ltda., Tóquio, Japão
- Polissorbato 80 - Shin-Etsu Ltda., Tóquio, Japão
- Metilparabeno - Shin-Etsu Ltda., Tóquio, Japão
- Glicose - Shin-Etsu Ltda., Tóquio, Japão
- Furosemida - Allchemistry Ltda., São Paulo, Brasil
- Nanocristais de furosemida
- Recipientes de alumínio
- Recipientes de platina

4.1.6.2 Aparelhos, equipamentos e acessórios

- Exstar DSC 7020[®] - Hitachi Instrumets, Shangai, China
- DSC 20920[®] - TA Instruments, Inglaterra
- Termobalança STA-409 PC Luxx[®] - Netzsch Ltda., Gebrüder, Alemanha

4.1.7 Difração de raio X

4.1.7.1 Matéria-prima, solventes e reagentes

- Metilcelulose - Metolose SM-4000[®], Shin-Etsu Ltda., Tóquio, Japão
- Metilparabeno - Shin-Etsu Ltda., Tóquio, Japão
- Glicose - Shin-Etsu Ltda., Tóquio, Japão
- Furosemida - Allchemistry Ltda., São Paulo, Brasil
- Nanocristais de furosemida

4.1.7.2 Aparelhos, equipamentos e acessórios

- Equipamento de difração de raio X - Rigaku Miniflex II[®] - Rigaku Ltda., Tóquio, Japão

4.1.8 Espectroscopia Raman de baixo deslocamento

4.1.8.1 Matéria-prima, solventes e reagentes

- Furosemida - Allchemistry Ltda., São Paulo, Brasil
- Nanocristais de furosemida

4.1.8.2 Aparelhos, equipamentos e acessórios

- Laser iônico de Argônio - Innova 70 Ltda., Califórnia, Estados Unidos
- Filtros tipo *notch* de bandas estreitas - SureBlock Ltda., Califórnia, Estados Unidos

4.1.9 Solubilidade de saturação

4.1.9.1 Matéria-prima, solventes e reagentes

- Água ultrapura
- Tetraidrofurano HPLC - Tédia Ltda., Rio de Janeiro, Brasil
- Ácido acético HPLC - Tédia Ltda., Rio de Janeiro, Brasil
- Ácido Clorídrico PA - Labsynth Ltda., São Paulo, Brasil
- Fosfato de potássio monobásico PA - Labsynth Ltda., São Paulo, Brasil
- Hidróxido de sódio PA - Labsynth Ltda., São Paulo, Brasil
- Furosemida padrão primário (99,8% pureza) - Fiocruz, Rio de Janeiro, Brasil
- Furosemida - Allchemistry Ltda., São Paulo, Brasil
- Nanocristais de furosemida

4.1.9.2 Aparelhos, equipamentos e acessórios

- Sistema cromatográfico equipado com detector UV/VIS SPD 10AVP[®], forno de coluna CT10AVP[®] e duas bombas isocráticas LC-10ATVP[®] - Shimadzu Co., Ltda., Kyoto, Japão
- Coluna cromatográfica Luna[®] C18 (5 µm, 200 mm x 4.6 mm) - Phenomenex Co., Ltd., Califórnia, Estados Unidos
- Balança semimicro analítica AUWD[®] - Shimadzu Co., Ltda., São Paulo, Brasil
- Banho de ultrassom Logen Sonic 28D[®] - Gehaka Ltda., São Paulo, Brasil
- Shaker MA429[®] - Marconi Ltda., São Paulo, Brasil
- Filtro Millex[®] PVDF 0,22 µm de tamanho de poro - Merck-Millipore Ltda., São Paulo, Brasil

4.1.10 Dissolução intrínseca

4.1.10.1 Matéria-prima, solventes e reagentes

- Água purificada
- Ácido Clorídrico PA - Sigma Aldrich Ltda., Ontário, Canadá
- Cloreto de sódio PA - Sigma Aldrich Ltda., Ontário, Canadá
- Fosfato de potássio monobásico PA - Sigma Aldrich Ltda., Ontário, Canadá
- Hidróxido de sódio PA - Sigma Aldrich Ltda., Ontário, Canadá
- Furosemida padrão primário (99,8% pureza) - Fiocruz, Rio de Janeiro, Brasil
- Furosemida - Allchemistry Ltda., São Paulo, Brasil
- Nanocristais de furosemida

4.1.10.2 Aparelhos, equipamentos e acessórios

- Instrumento *Woods* modificado
- Agitador mecânico R2R50[®] - Cafrano Ltda., Ontário, Canadá
- Béqueres de reação encamisados de 250 mL - Kontes Ltda., Vineland, Estados Unidos
- Circulador termostático - Haake Ltda., Newwigton, Estados Unidos
- Balança analítica AT250[®] - Metler Ltda., Ontário, Canadá
- Prensa - Fred S. Carver Ltda., Viscosin, Estados Unidos
- Espectrofotômetro UV/VIS Spectronic 3000 Array[®] - Milton Roy Ltda., Ivyland, Estados Unidos
- Cubetas de fluxo contínuo - Starna Ltda., Thornleigh, Austrália
- Bomba peristáltica Masterflex[®] - Cole Parmer Ltda., Quebec, Canadá

4.2 Métodos

4.2.1 Preparação dos nanocristais por moagem à alta energia

As nanossuspensões foram preparadas utilizando o nanopulverizador NP-100[®] (Thinky Co., Ltda., Tóquio, Japão). A nanopulverização foi realizada conforme metodologia padrão proposta por Takatsuka e colaboradores (2009). A metodologia consiste em duas etapas, nas quais diferentes velocidades, tempos de agitação e volumes da solução aquosa estabilizada são utilizados. As soluções estabilizadas utilizadas no preparo dos nanocristais eram compostas por metilcelulose 0,3% p/v, polissorbato 80, 0,1% p/v e metilparabeno 0,1% p/v.

Na primeira etapa, 10 g de furosemida e 50 mL da solução aquosa estabilizada foram pesados e transferidos para o recipiente de mistura. Posteriormente, ao mesmo recipiente foram adicionados 35 g de esferas de zircônio, apresentando diâmetro igual a 0,1 mm. Na primeira etapa, as condições para a nanopulverização foram: 1.500 rpm por 15 minutos. Na segunda etapa, 50 mL da solução aquosa estabilizada foram adicionados ao recipiente de mistura e as seguintes condições de nanopulverização aplicadas: 400 rpm por 1 minuto.

4.2.2 Liofilização das nanossuspensões

Às nanossuspensões preparadas (10 g) foi adicionada glicose (1 g), com o objetivo de prevenir a agregação durante o processo de liofilização. Posteriormente, foram transferidas para balão de vidro (30 mL) e congeladas com o auxílio de acetona e nitrogênio líquido. Após congelamento, as nanossuspensões foram imediatamente liofilizadas a -70 °C (Christ Alpha 1-5[®], Martin Christ, Alemanha), durante 48h, sob pressão de 0,120 mbar e temperatura de 24 °C.

4.2.3 Quantificação de furosemida

A quantificação de furosemida foi realizada para determinar o teor do fármaco nos nanocristais e para determinar a solubilidade de saturação. A análise por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) foi realizada, conforme metodologia descrita por Nielsen e colaboradores (2013). O sistema cromatográfico foi equipado com detector UV/VIS SPD-10AVP[®], forno de coluna CT10AVP[®], e duas bombas isocráticas LC-10ATVP[®] (Shimadzu Co., Ltda., Kyoto, Japão). A coluna cromatográfica Luna[®] C18 (5 µm, 200 mm x 4.6 mm) (Phenomenex Co., Ltda., Califórnia, Estados Unidos) foi utilizada com fase móvel composta de água, tetraidrofurano e ácido acético (70:30:1, v/v/v), sob fluxo de 1,5 mL min⁻¹. A quantidade de furosemida foi determinada no comprimento de onda 274 nm e o volume de injeção foi de 20 µL.

4.2.4 Distribuição e tamanho médio de partícula

O tamanho das partículas foi determinado utilizando difração de raio *laser* (DL) (Mastersizer 2000[®], Malvern Instruments, Inglaterra), acoplado à unidade de pequeno volume (Hidro 2000P[®], Malvern Instruments, Inglaterra). As amostras foram diluídas vinte vezes, com água purificada, e sonicadas durante 10 min. O tensoativo polisorbato 80, à concentração de 0,01% (p/v), foi adicionado à suspensão para evitar a agregação das partículas.

Para a avaliação da distribuição do tamanho das partículas, utilizaram-se os seguintes parâmetros: diâmetro médio ponderado pelo volume (D[4,3]), diâmetro médio ponderado pela superfície (D[3,2]), d_{0,1}, d_{0,5}, d_{0,9} e índice de polidispersividade (*spam*). O diâmetro médio ponderado pelo volume, ou média *DeBrouckere* (Equação 20), constitui parâmetro de avaliação da distribuição de tamanho de partícula. Nesse parâmetro, o diâmetro médio das partículas é ponderado pelo volume das partículas consideradas esféricas.

$$D[4,3] = \frac{\sum n_i d_i^4}{\sum n_i d_i^3} \quad Eq. 20$$

onde n_i significa a frequência das partículas e d_i ao diâmetro respectivo.

O diâmetro médio ponderado pela superfície ($D[3,2]$), ou diâmetro médio de *Sauter*, é ponderado pela área de superfície, correspondendo a:

$$D[3,2] = \frac{\sum n_i d_i^3}{\sum n_i d_i^2} \quad Eq. 21$$

O parâmetro $d_{0,5}$, denominado mediana, indica o valor do diâmetro da partícula no qual 50% da população encontra-se abaixo desse ponto. De forma similar, $d_{0,1}$ e $d_{0,9}$ indicam os valores de diâmetro em que 10% e 90% da população, respectivamente, estão abaixo desses valores (MERKUS, 2009).

4.2.5 Microscopia eletrônica de varredura

A superfície, a forma e o tamanho das partículas, antes e depois da nanopulverização, foram avaliados utilizando a microscopia eletrônica de varredura (MEV), empregando o equipamento SU-3400® (Hitachi High Technologies, Japão). As amostras foram analisadas com tensão de aceleração de 15,0 kV e aumento de 5.000 a 50.000 vezes.

4.2.6 Calorimetria exploratória diferencial e termogravimetria/termogravimetria derivada

As curvas de calorimetria exploratória diferencial foram obtidas utilizando os equipamentos Exstar DSC 7020[®] (Hitachi Instrumets, Shangai, China) e DSC 20920[®] (TA Instruments, Inglaterra). Em recipientes de alumínio, sob atmosfera dinâmica de N₂ (50 mL min⁻¹), 2mg das amostras de furosemida pó, mistura física (fármaco + excipientes, 1:1) e nanocristais, foram submetidas ao aquecimento, com razão de 5 °C min⁻¹, no intervalo de temperatura de 25 a 400 °C.

As curvas de termogravimetria/termogravimetria derivada (TG/DTG) foram obtidas utilizando termobalança STA-409 PC Luxx[®] (Netzsch Ltda., Gebrüder, Alemanha). Em recipientes de platina, sob atmosfera dinâmica de N₂ (50 mL min⁻¹), aproximadamente 5 mg de amostras foram submetidas ao aquecimento, com razão de 5 °C min⁻¹, no intervalo de temperatura de 25 a 600 °C.

4.2.7 Difração de raio X

A caracterização do estado cristalino, como a determinação de possíveis frações amorfas, foi determinada por difração de raio X (DRX). Utilizou-se o equipamento Rigaku Miniflex II[®] (Rigaku Ltda., Tóquio, Japão). As amostras foram expostas à radiação CuKα (40 kV, 25 mA) e analisadas a 2θ de tamanho de passo, entre 0,06 e 40° e tempo de passo de 0,5° min⁻¹.

4.2.8 Espectroscopia Raman de baixo deslocamento

O espectrofotômetro Raman dispersivo, com excitação na região espectral do vermelho, utilizado no presente experimento é um instrumento personalizado desenvolvido pelo pesquisador Reinhard Vehring (2005). O espectro de deslocamento Raman foi obtido utilizando *laser* iônico de argônio (Innova 70,

Coherent, Califórnia, Estados Unidos), de comprimento de onda 514,5 nm e potência entre 100 e 500 mW. As amostras foram analisadas utilizando espectrofotômetro de único estágio acoplado a filtros adicionais e sensor fotoelétrico (CCD) resfriado com nitrogênio líquido a -65 °C. Para a utilização do intervalo de deslocamentos de baixa frequência, os ajustes do espectrofotômetro foram modificados, utilizando-se filtros tipo *notch* de bandas estreitas (SureBlock, Ondax, Califórnia, Estados Unidos) presentes no coletor de sinal e no estágio de filtro (VEHRING et al., 2012).

4.2.9 Solubilidade de saturação

A solubilidade de saturação da furosemida e de seus nanocristais foi determinada (n=3) em água e em soluções apresentando valores de pH 1,2, 2,0, 6,0, 6,8 e 7,2, utilizando a metodologia *Shake Flask* (LÖEBENBERG; AMIDON, 2000; UNITED STATES, 2000). Excesso de furosemida, nanocristais e mistura física, composta por furosemida, glicose, metilcelulose, polissorbato e metilparabeno, na proporção de 49:49:1,5:0,5 partes, respectivamente, foi transferido para frascos contendo os meios, posteriormente sonicados por 2 minutos (Logen Sonic 28D[®], Gehaka, São Paulo, Brasil), devidamente selados e transferidos para *shaker* (Shaker MA429[®], Marconi, São Paulo, Brasil) e levados à agitação de 150 rpm, a 37 °C por 48 horas. Após período determinado, alíquotas foram retiradas e filtradas, utilizando filtro Millex[®] PVDF 0,45 µm (Merck-Millipore, São Paulo, Brasil), sendo a quantidade de furosemida determinada por CLAE. Para a determinação da solubilidade de saturação foi elaborada curva de calibração utilizando padrão primário de furosemida, que apresentou coeficiente de determinação de $r^2=1$ e equação da curva igual a $y = 4E+07x + 7377,6$.

4.2.10 Dissolução intrínseca

A velocidade de dissolução intrínseca (VDI) foi obtida utilizando instrumento *Woods* modificado, com superfície de 0,5 cm², acoplado a agitador mecânico (R2R50[®], Cafrano, Warton, Ontário, Canadá) e béqueres de reação encamisados de 250 ml (Kontes, Vineland, New Jersey, Estados Unidos) ligados ao circulador termostático (Haake, Newington, Estados Unidos). Furosemida e seus nanocristais foram compactados em discos, com força de compressão de 1 tonelada por 30 segundos utilizando prensa Carver[®] (Fred S. Carver Ink., Menomonee Falls, Viscosin, Estados Unidos). Conforme metodologia espectrofotométrica UV/VIS proposta por Yu e colaboradores (2004), as absorbâncias, no comprimento de onda 274 nm (em meios pH 4,5 e 6,8) e a 278 nm (no meio de pH 1,2), foram determinadas utilizando espectrofotômetro UV/VIS (Milton Roy Spectronic 3000 Array, Ivyland, Estados Unidos) acoplado à bomba peristáltica (Cole Parmer Masterflex, Montreal, Quebec, Canadá).

A VDI foi determinada utilizando discos rotativos do fármaco puro e dos nanocristais, comprimidos, imersos em 200 mL de diferentes meios de dissolução a 37 °C, garantindo as condições *sink*. Os meios de dissolução empregados foram o fluido gástrico simulado com pH 1,2 (SGF), tampão acetato pH 4,5 e fluido intestinal simulado de pH 6,8 (SIF), preparados de acordo com a USP 36^a. edição. As amostras dos meios foram analisadas sob fluxo contínuo em intervalos de tempo regulares e gráficos de quantidade de fármaco dissolvido em relação ao tempo foram elaborados.

Uma série de soluções padrão foi preparada nos mesmos meios e curvas de calibração elaboradas. A VDI (*j*) foi calculada conforme:

$$j = \frac{Vdc}{dt} \frac{1}{A} \quad Eq. 22$$

onde *j* é VDI, *V* é o volume do meio de dissolução, *dc* é a concentração, *A* é a área do disco de fármaco e *dt* é o tempo.

4.2.11 Avaliação *in silico* das características físico-químicas da furosemida

As características físico-químicas da furosemida foram determinadas empregando as plataformas de quimioinformática ChemAxon's[®] Marvin e JChem[®]. As seguintes constantes físico-químicas da furosemida foram determinadas: *pKa*, microespécies, ponto isoelétrico, *cLogP*, *LogD*, área de superfície molecular, área de superfície polar, doadores e receptores de ligações de hidrogênio.

4.2.12 Avaliação *in silico* da absorção dos nanocristais

Com o objetivo de avaliar a fração absorvida *in vivo* dos nanocristais de furosemida, a partir de suas propriedades físico-químicas, *in vitro* e *in vivo*, foi utilizado o sistema *in silico* GastroPlus[®] versão 6.0.0010 (Simulation Plus Inc., Lancaster, Califórnia). O *software* GastroPlus[®] simulou a biodisponibilidade da furosemida após a administração oral e pulmonar de comprimidos de liberação imediata e pó inalável contendo nanocristais de furosemida (dose M_0 = 40mg).

As principais interfaces do *software* para inclusão dos dados de simulação são constituídas pelas informações fisiológicas, características físico-químicas e farmacocinéticas do fármaco. As características físico-químicas da furosemida, como *pKa*, *LogP* e *LogD*, foram inseridas no *software* a partir dos resultados obtidos utilizando a plataforma quimioinformática ChemAxon's[®] Marvin e JChem[®]. Além disso, os resultados experimentais de distribuição e tamanho de partícula, solubilidade de saturação e dissolução intrínseca da furosemida e de seus nanocristais foram inseridos como funções variáveis da simulação.

Os dados farmacocinéticos da furosemida utilizados na simulação, tanto para a simulação oral como pulmonar, foram obtidos realizando revisão bibliográfica atualizada. Algumas constantes fisiológicas específicas de cada via de administração foram utilizadas conforme dados padrões oferecidos pelo próprio sistema *in silico* GastroPlus[®].

4.2.12.1 Avaliação *in silico* da absorção oral dos nanocristais

Os seguintes parâmetros farmacocinéticos foram assumidos para a avaliação da absorção oral dos nanocristais: voluntários sadios, do sexo masculino, com 18 anos de idade, 82 Kg, modelo de absorção de primeira ordem de três compartimentos, permeabilidade efetiva (P_{eff}) da furosemida de $0,3 \times 10^4$ cm/s, fisiologia estomacal no estado alimentado e jejum, biodisponibilidade absoluta de 60%, volume de distribuição de 2,7 L, 99% da furosemida ligada à albumina plasmática, tempo de meia vida de 2 horas, depuração renal de 7 L/hora e 24 para simulação oral (PRANDOTA; WITKOW, 1976; KIM et al., 1993; SWETMAN et al., 2004; GRANERO et al., 2010; VAN WART et al., 2013).

4.2.12.2 Avaliação *in silico* da absorção pulmonar dos nanocristais

No caso da simulação do processo de absorção pulmonar, os seguintes parâmetros farmacocinéticos foram assumidos: voluntários sadios, do sexo masculino, com 18 anos de idade, 82 Kg, fração de deposição nos diferentes compartimentos pulmonares conforme modelo matemático ICRP 66 (*International Commission on Radiological Protection*) (SMITH, 1995) e 18 horas de avaliação.

Adicionalmente, para a avaliação pulmonar, foi considerada a utilização de sistema carreador composto por partículas de 5 µm de diâmetro, 30 mg de massa e limite de associação para partículas de fármaco até 7 µm de diâmetro.

4.2.13 Análise estatística dos dados

A análise de regressão foi realizada nos resultados da VDI e a independência dos resíduos foi testada utilizando a estatística de Durbin-Watson (DWS). A análise de variância (One-way ANOVA - General Linear Model), utilizando *software* estatístico Minitab 15 (Minitab Inc., Pennsylvania, Estados Unidos), foi realizada para comparar a VDI da furosemida antes e após a nanopulverização, com valor de

$\alpha=0,05$. Para garantir a suposição de igualdade de variância (homoscedasticidade) e normalidade, todos os dados foram transformados usando-se: $Y' = \sqrt{Y}$, $Y' = \sqrt{Y} + \sqrt{(Y + 1)}$ e $Y' = \log Y$ (BOLTON et al., 2000).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Preparação dos nanocristais por moagem à alta energia

A concentração inicial de furosemida foi selecionada de acordo com os trabalhos desenvolvidos por Müller e colaboradores (2011). Esses autores relatam que o processo de obtenção dos nanocristais apresenta maior eficiência quando utilizadas concentrações iguais e superiores a 10% (p/p) do fármaco. Em concentrações menores ou iguais a 1% (p/p), não foi observada redução significativa do tamanho de partículas. Os mesmos autores consideram que quanto maior a concentração das partículas de fármaco, maior é a incidência de choque mecânico entre as mesmas, melhorando o processo de nanopulverização.

No que se refere à constituição do veículo para a obtenção dos nanocristais de furosemida, esse foi composto por água purificada, metilcelulose (0,3% p/p) e polissorbato 80 (0,1% p/p). De acordo Bushrab e Müller (2002), além da água purificada, outros veículos são utilizados na obtenção de nanocristais. No processo patenteado denominado Nanopure[®], óleos, polietilenoglicol e glicerina são utilizados como alternativa para fármacos que sofrem hidrólise, na produção de cápsulas moles, fármacos administrados por via parenteral e ativos cosméticos para aplicação dérmica.

Com relação ao tamanho dos nanocristais, a escolha do sistema estabilizante apresenta fator preponderante quanto à homogeneidade do tamanho das partículas. Durante o processo de obtenção, à medida que a área da superfície e a interface dos nanocristais aumentam, a energia livre de Gibbs é alterada, tornando-os termodinamicamente instáveis. Consequentemente, os nanocristais tendem naturalmente a minimizar sua energia total por meio da aglomeração (GONZÁLES; DURÁN, 2000).

O processo de aglomeração dos nanocristais depende de sua energia de ativação, que pode ser alterada pela adição de estabilizantes no sistema. Um dos requisitos necessários para que o sistema estabilizante escolhido aumente a energia de ativação é promover a molhagem da superfície hidrofóbica das partículas do fármaco. Adicionalmente, os estabilizantes devem fornecer barreira eletrostática ou física, com o objetivo de diminuir a atração e o contato entre os nanocristais (VAN EERDENBRUGH; MOOTER; AUGUSTIJNS, 2008).

Dessa maneira, é possível a obtenção de nanocristais com características de tamanho adequado. No presente trabalho, os tipos de estabilizantes e suas

respectivas concentrações foram definidos conforme metodologia padronizada por Takatsuka e colaboradores (2009). Esses autores obtiveram nanocristais estáveis dos fármacos fenitoína, indometacina, nifedipina, danazol e naproxeno utilizando a técnica de nanopulverização por revolução/rotação e o sistema padronizado de estabilizantes, composto por metilcelulose e polissorbato.

A metilcelulose é um polímero não iônico de metil éter de celulose, que, em concentrações entre 1 e 2% (p/p), é utilizado como agente espessante, flocculante e dispersante em suspensões (ALLEN; POPOVICH; ANSEL, 2007). De acordo com Swarbrick e colaboradores (2000), dependendo da concentração dos polímeros em suspensão, além de exercerem atividade flocculante, esses também são responsáveis por gerar estabilização física. A atividade flocculante ou flocculação é resultante da adsorção do polímero à superfície de várias partículas, formando sedimentados de elevado volume que apresentam fácil redispersão. Além disso, o polímero pode envolver toda a superfície da partícula, diminuindo o contato e a coesão entre essas partículas e impedindo o processo de aglomeração.

O polissorbato 80, por ser um agente tensoativo não iônico de alta hidrofilicidade, é geralmente utilizado em suspensões como agente molhante. Nesse caso, esse agente reduz a tensão interfacial entre o veículo e as partículas suspensas, facilitando a dispersão do fármaco (ALLEN; POPOVICH; ANSEL, 2007; SWARBRICK; RUBINO; RUBINO, 2000).

De acordo Choi (2005), Verma e colaboradores (2009), a seleção dos agentes estabilizantes é de fundamental importância e deve se basear em duas condições: pertencer a duas classes distintas, como, por exemplo, a associação entre polímeros e agentes tensoativos, e, ainda, apresentar mínimo efeito na solubilidade do fármaco.

Avaliando as recentes pesquisas relacionadas com o desenvolvimento dos nanocristais, é possível observar que técnicas diferentes da nanopulverização por revolução/rotação não apresentam sistemas estabilizantes padronizados (Apêndice A). A maioria dos estudos indica que o sistema estabilizante mais adequado varia de acordo com o fármaco utilizado. Nesses estudos, as recentes formulações de nanocristais desenvolvidas apresentam sistemas de estabilização compostos por polímeros e tensoativos isolados e de concentração variada, bem como sistemas múltiplos contendo associação de diferentes polímeros e tensoativos (VAN EERDENBRUGH et al., 2008).

5.2 Liofilização das nanossuspensões

No presente trabalho, o processo de liofilização foi escolhido para a solidificação das nanossuspensões obtidas ao final do processo de nanopulverização. Para isso, foram adicionados 1g do crioprotetor glicose a 10g da nanossuspensão, com o objetivo de prevenir a agregação durante o processo de liofilização. Ao final do processo, o produto apresentou teor de furosemida de $48,4 \pm 0,3\%$ (p/p), indicando proporção fármaco/crioprotetor de aproximadamente 100% p/p em relação ao fármaco.

As formulações de nanocristais utilizadas nos ensaios *in vitro* e *in vivo* apresentam-se geralmente na forma de dispersões aquosas, denominadas nanossuspensões (Apêndices A e B). Entretanto, quando se trata da sua utilização farmacoterapêutica, as formas farmacêuticas sólidas são as mais aceitáveis, devido à precisão de dosagem; à maior estabilidade física, química e microbiológica em relação às demais formas farmacêuticas, principalmente as líquidas; à facilidade de manuseio; à tecnologia de obtenção relativamente simples; à boa apresentação e à fácil aceitação (ALLEN; POPOVICH; ANSEL, 2007; AULTON, 2005; CHOI et al., 2012; VAN EERDENBRUGH et al., 2008).

Principalmente duas tecnologias são utilizadas para transformar as nanossuspensões aquosas, em formas de dosagem sólidas, incluindo comprimidos, cápsulas, granulados, *pellets* e comprimidos de liberação bucal. A primeira tecnologia consiste em duas etapas. No primeiro passo, a fase aquosa das nanossuspensões é retirada utilizando processos de secagem, tal como a liofilização, leito fluidizado ou *spray drying*, secagem por pulverização ou secagem em estufa (AIN-AL et al., 2008; GUO et al., 2006; LAI et al., 2011; MÖSCHWITZER; MÜLLER, 2006). Posteriormente, o pó obtido, misturado com outros excipientes, é processado em formas farmacêuticas sólidas, utilizando a compressão direta, a obtenção de *pellets* ou o enchimento de cápsulas (JUHNKE; MARTIN; JOHN, 2012; MAULUDIN; MÜLLER; KECK 2009).

Na segunda tecnologia, o processo de secagem e o de obtenção da forma farmacêutica são combinados em um único passo. De forma resumida, as nanossuspensões aquosas são utilizadas diretamente no processo de granulação ou como camadas de dispersão em leito fluidizado (BASA et al., 2008; KOCBEK; BAUMGARTNER; KRISTL, 2006).

A escolha da tecnologia de secagem das nanossuspensões deve garantir que agregações irreversíveis não ocorram ou, caso ocorram agregações moderadas, essas não devem comprometer o aumento da velocidade de dissolução ocasionado pelo aumento da área superficial.

Com frequência, anteriormente à etapa de secagem da nanossuspensão por liofilização, tem sido necessária a adição de agente formador de matriz, geralmente açúcares hidrossolúveis (KESISOGLOU; PANMAI; WU, 2007a, 2007b). Nas nanossuspensões, as moléculas dos estabilizantes ligadas à superfície dos nanocristais podem evitar a agregação, oferecendo repulsão iônica ou física. No entanto, durante a remoção da água entre os nanocristais, os grupos ionizados e o movimento constante das cadeias moleculares não são mantidos, induzindo o entrelaçamento de polímeros e a aglomeração das partículas (CHAUBAL; POPESCU, 2008).

Dessa maneira, os dispersantes são adicionados às nanossuspensões antes da operação de liofilização, para preencher as lacunas entre os nanocristais após a remoção da água, bloqueando fisicamente a ligação entre moléculas do fármaco e formando matrizes contínuas (KIM, 2010).

Lee e colaboradores (2006) investigaram a importância da velocidade de congelamento aplicada no processo de solidificação da nanossuspensão. Com base nas observações realizadas, os autores propuseram uma velocidade de congelamento crítica de aproximadamente 130 $\mu\text{m/s}$. Nessas condições, é possível obter maiores velocidade de nucleação, formação de cristais menores, menor aglomeração e maior velocidade de dissolução dos nanocristais. Pesquisas realizadas por Anderson e Worster (2012) também identificaram a influência da velocidade de congelamento na formação de diferentes formas de camadas de gelo presentes no liofilizado e segregação de macrosuspensões de alumina.

Em relação à proporção de crioprotetores no processo de liofilização, Van Eerdenbrugh e colaboradores (2007, 2008a, 2008b, 2008c, 2008d) observaram que tanto a ausência como as elevadas quantidades de glicose podem comprometer a velocidade de dissolução do fármaco. Os mesmo autores observaram que, para os nanocristais do fármaco Loverida, 100% (p/p) de glicose em relação ao fármaco garantiram a não aglomeração, bem como a dissolução completa do fármaco em poucos minutos.

No presente trabalho, após a liofilização das nanossuspensões de furosemida, foi obtido material que apresentou matriz contínua e fácil redispersão em água.

5.3 Distribuição e tamanho médio de partícula dos nanocristais de furosemida

Para a obtenção dos nanocristais, utilizou-se matéria-prima com distribuição granulométrica entre 1 μm e 12 μm , conforme a Figura 22. Após a nanopulverização, foi observada distribuição granulométrica entre 0,05 μm e 0,3 μm , com maiores volumes (%) entre 0,11 μm e 0,13 μm , indicando redução significativa do tamanho das partículas.

Figura 22 – Distribuição de tamanho de partícula, por DL, antes e após nanopulverização.

Fonte: Elaborado pelo autor.

A Tabela 1 apresenta a caracterização da distribuição granulométrica da furosemina. Os resultados revelaram que o processo de nanopulverização foi capaz de reduzir o tamanho de partícula a escalas nanométricas, apresentando diâmetro médio D[4,3] e D[3,2] de 231 e 111 nm, respectivamente.

A $d_{0,5}$ da matéria-prima furosemina foi reduzida em aproximadamente 30 vezes, partindo de partículas com dimensão de 3,643 μm e alcançando $d_{0,5}$ de 0,122 μm (ou 122 nm). A análise de distribuição de tamanho de partícula revelou que, após a nanopulverização, 10% ($d_{0,1}$) da população das partículas apresentaram diâmetro menor ou igual a 0,069 μm ou 69 nm, 50% ($d_{0,5}$) menor ou igual a 0,122 μm ou 122 nm e 90% ($d_{0,9}$) menor ou igual a 0,222 μm ou 222 nm. O índice de polidispersividade dos nanocristais indicou maior homogeneidade de distribuição do tamanho de partícula, após o processo de nanopulverização. Esse resultado é indicativo satisfatório relacionado à estabilidade das nanossuspensões. Elevados valores de polidispersividade são responsáveis por desencadear o fenômeno denominado *Ostwald's ripening* (JUNGHANNS; MÜLLER, 2008; LU et al., 2014). De acordo com IUPAC (2007), *Ostwald's ripening* consiste na dissolução de pequenos cristais e na redeposição das espécies solubilizadas nas superfícies dos cristais maiores, devido à diferença na energia de superfície e à consequente solubilidade de saturação dos cristais. Esse fenômeno é responsável pelo aumento do diâmetro dos nanocristais em sistemas polidispersos.

Tabela 1 – Caracterização do tamanho de partícula antes e depois da nanopulverização por DL.

Parâmetros de caracterização	Antes	Depois
Método	DL (μm)	DL (μm)
<i>Diâmetro Médio-D[4,3]</i>	7,100	0,231
<i>Diâmetro Médio-D[3,2]</i>	3,232	0,111
<i>d_{0,1}</i>	1,896	0,069
<i>d_{0,5}</i>	3,643	0,122
<i>d_{0,9}</i>	7,095	0,222
<i>Polidispersividade</i>	0,427	0,232

Utilizando o método de nanopulverização por revolução/rotação, Takatsuka e colaboradores (2009 e 2012) obtiveram nanocristais de 8 diferentes fármacos SCB classes II e IV: fenitoína, naproxeno, nifedipina, danazol, indometacina, fenofibrato, flurbiprofen e probucol. Os resultados revelaram que o processo de nanopulverização foi capaz de reduzir a $d_{0,5}$ em aproximadamente 100 vezes para todos os fármacos.

5.4 Análise morfológica e tamanho do cristal

As Figuras 23a e 23b apresentam as imagens dos cristais de furosemida, antes do processo de nanopulverização, utilizando aumento de 300 e 1.000 vezes. As imagens revelaram que os cristais possivelmente apresentam celas unitárias na forma triclinica ou monoclinica (Figuras 23c e 23d), conforme observado por Babu e colaboradores (2010), em trabalhos que avaliaram o polimorfismo na furosemida.

Figura 23 – Cristais de furosemida antes da nanopulverização (a) e (b), utilizando MEV e celas unitárias nas formas triclinica (c) e monoclinica (d).

Fonte: Elaborado pelo autor.

A Figura 24b evidencia os nanocristais de furosemida, após liofilização, comparado aos cristais maiores presentes na matéria-prima, antes da nanopulverização (Figura 24a). Os aumentos de 5.000 (Figura 24a) e 50.000 (Figura 24b) vezes revelaram que os cristais de furosemida, antes da nanopulverização, apresentaram tamanhos maiores do que 10 μm . Após a nanopulverização, os cristais apresentaram tamanho de partícula menor do que 1 μm . Além disso, é possível observar, na imagem dos nanocristais (Figura 24b), a presença de aglomerações e retículo cristalino não definido, indicando possível alteração no estado cristalino da furosemida ou na formação de matriz devido ao revestimento dos nanocristais pelo crioprotetor utilizado na liofilização.

Figura 24 – (a) Furosemida antes da nanopulverização e (b) nanocristais de furosemida, por MEV

Fonte: Elaborado pelo autor.

5.5 Calorimetria exploratória diferencial (DSC), termogravimetria (TG)/ termogravimetria derivada (DTG) dos nanocristais de furosemida

O DSC da furosemida matéria-prima (Figura 25 a) apresentou evento endotérmico fraco no intervalo de 120 a 150 $^{\circ}\text{C}$ ($T_{\text{peak}} = 138^{\circ}\text{C}$; variação de entalpia $\Delta H = 3,4 \text{ J g}^{-1}$), que corresponde à transição enantiotrópica da forma I ou forma II à forma mais estável VI, descrita por Matsuda e Tatsumi (1990). Esses resultados corroboram com aqueles obtidos por difração de raios X que serão discutidos a seguir, no item 6.5. Dessa maneira, as duas abordagens suportam que a furosemida

matéria-prima apresentava estado cristalino inicial correspondente à forma I (GE et al., 2009). De acordo com Granero e colaboradores (2010), a furosemida apresenta sete formas polimórficas: quatro polimorfos verdadeiros (I, II, III e IV), dois solvatos (V em dimetil sulfóxido e VI em dioxano) e um amorfo. Apesar dos polimorfos apresentarem diferentes características físico-químicas, não existem trabalhos que indiquem alterações farmacodinâmicas entre os diferentes polimorfos da furosemida (GRANERO et al., 2010).

Após a fase de transição, foi observado discreto pico endotérmico ($T_{\text{peak}} = 214^{\circ}\text{C}$), seguido por eventos exotérmicos ($T_{\text{peak}} = 220^{\circ}\text{C}$) no intervalo de 205 a 235 $^{\circ}\text{C}$, tal como descrito previamente por Ge e colaboradores (2009) e Silva e colaboradores (2011). As curvas TG/DTG indicam que o processo de decomposição térmica da furosemida matéria-prima ocorre em duas etapas principais, nos seguintes intervalos de temperatura e perdas de peso: 205-235 $^{\circ}\text{C}$ ($\Delta m = 2,96\%$), 249-600 $^{\circ}\text{C}$ ($\Delta m = 54,5\%$). No entanto, determinado grau de perda de peso ($\Delta m = 1,3\%$) foi observado a partir da temperatura ambiente até 205 $^{\circ}\text{C}$, o que pode estar relacionado com a perda de água de superfície (até 120 $^{\circ}\text{C}$) e o início da decomposição térmica.

Os mesmos perfis térmicos da matéria-prima furosemida foram observados em trabalhos realizados por Beyers e colaboradores (2000), Babu e colaboradores (2010) e Silva e colaboradores (2011).

As curvas de DSC das misturas binárias (Figura 25a) de furosemida e excipientes presentes na formulação dos nanocristais foram comparadas com os excipientes puros: glicose, metilparabeno, metilcelulose e polissorbato 80. Nenhuma interação química entre a furosemida e os excipientes utilizados foi observada, pois os perfis de DSC dos excipientes e os das misturas físicas binárias foram muito semelhantes.

As curvas DSC/DDSC e TG/DTG dos nanocristais de furosemida (Figura 25b e c) apresentaram perfil característico de eliminação de água ligada ($\Delta m = 5,5\%$) entre 30 e 100 $^{\circ}\text{C}$ ($T_{\text{onset}} = 69,8^{\circ}\text{C}$; $T_{\text{peak}} = 75^{\circ}\text{C}$; mudança de entalpia $\Delta H = 46,1 \text{ J g}^{-1}$), ampla transição endotérmica no intervalo de 100 a 125 $^{\circ}\text{C}$ ($T_{\text{onset}} = 90^{\circ}\text{C}$), variação de entalpia ($\Delta H = 26,7 \text{ J g}^{-1}$) sem perda de peso, seguida de dois eventos de decomposição térmica entre 150 e 245 $^{\circ}\text{C}$ ($\Delta m = 24,0\%$; $T_{\text{onset}} = 179^{\circ}\text{C}$) e 245 e 600 $^{\circ}\text{C}$ ($\Delta m = 31\%$).

A curva da primeira derivada (DDSC) foi utilizada para avaliar a presença da transição enantiotrópica da forma I, indicada pela seta na Figura 25b ($T_{\text{peak}} = 135$ °C). A presença da transição sinaliza claramente que a forma cristalina da furosemida permanece a mesma. O primeiro evento de desidratação indicou que os nanocristais apresentavam residual de água devido à formação de glicose hidratada, provavelmente durante o processo de liofilização. Com base na entalpia de desidratação do excipiente puro glicose (variação de entalpia $\Delta H = 94,1 \text{ J g}^{-1}$), a variação de entalpia observada corresponde aproximadamente à quantidade de 48,7% p/p da glicose monoidratada nos nanocristais.

O segundo evento observado nos nanocristais corresponde à fusão da glicose ($T_{\text{onset}} = 153$ °C; variação de entalpia $\Delta H = 153,3 \text{ J g}^{-1}$). Embora se esperasse variação de entalpia de aproximadamente 75 J g^{-1} (com base no teor de glicose de 48,7%), foi verificada diminuição significativa no intervalo de fusão e variação no valor de entalpia. Tal fato sugere fortemente a presença de regiões amorfas e cristalinas nos nanocristais, possivelmente associadas à presença da glicose (TRASI et al., 2011). Além disso, essa diminuição significativa no intervalo de fusão pode estar associada à redução do tamanho de partícula, à maior relação superfície-volume, à diminuição das forças coesivas intermoleculares e, conseqüentemente, à depressão do ponto de fusão (LETELLIER MAYAFFRE; TURMINE, 2007; LIU et al., 2007). A diminuição observada no intervalo de fusão/decomposição característica da furosemida pode, também, contribuir para melhorar sua absorção, conforme trabalhos publicados por Chu e Yalkowsky (2009).

Figura 25 – a) curvas de DSC das misturas binárias; b) curvas DSC/DDSC dos nanocristais de furosemida; c) curvas TG/DTG dos nanocristais de furosemida.

5.6 Difração de raio x dos cristais de furosemida

O padrão de difração de raio X da furosemida matéria-prima exibiu reflexões de alta intensidade, picos estreitos e bem definidos, indicando a natureza cristalina do fármaco (Figura 20). A matéria-prima furosemida apresentou picos de difração a 2 θ graus e valores de intensidade, conforme Tabela 2. Em trabalhos realizados por Ge e colaboradores (2009), picos de difração semelhantes foram observados no polimorfo da furosemida de forma I.

O difratograma da mistura física (furosemida+metilcelulose+glicose, partes iguais) apresentou diferente padrão em relação à matéria-prima furosemida. A mistura física revelou diferentes picos de difração, com maiores intensidades, indicando a natureza cristalina e a possível interferência da metilcelulose ou da glicose.

No caso dos nanocristais, o difratograma não exibiu os picos 3 e 5 com a mesma intensidade e intensidade relativa da matéria-prima. Além disso, foi possível observar sobreposição dos principais picos (Figura 26 e Tabela 2). Esse fenômeno indicou possível indício de amorfização, hipótese também sustentada pelas curvas de DSC.

Figura 26 – Difratograma do nanocristal, da furosemida matéria-prima e da mistura física (furosemida, metilcelulose e glicose).

Fonte: Elaborado pelo autor.

Tabela 2 – Ângulos de difração de raios X (2θ), intensidade (I) e intensidade relativa (I/I_0) dos principais picos observados nos difratogramas da matéria-prima furosemida, da mistura física (furosemida, metilcelulose e glicose) e nanocristal de furosemida.

Pico	Ângulo (2θ)	Furosemida		Mistura Física		Nanocristal	
		I	I/I_0	I	I/I_0	I	I/I_0
1	19,1	6	29	13	18	2	37
2	21,6	7	36	18	26	3	61
3	23,6	5	25	8	12	-	-
4	25,4	21	100	71	100	4	100
5	28,7	5	22	10	15	-	-
6	29,7	8	38	10	15	2	36

(-) não detectado

Recentes estudos envolvendo a preparação, a caracterização físico-química e a farmacodinâmica do sal sódico de furosemida amorfa observaram diferentes características em relação à forma ácida cristalina. O material amorfo apresentou maior solubilidade, maior velocidade de dissolução e $T_{máx}$ significativamente menor após administração oral em ratos. Entretanto, não foi observado aumento na área sob a curva (AUC) e na biodisponibilidade absoluta, quando comparada aos perfis de absorção apresentados pela solução de furosemida em sua forma ácida cristalina (Nielsen et al., 2013).

5.7 Espectroscopia Raman de baixo deslocamento

O deslocamento Raman dos nanocristais de furosemida não revelou diferenças na localização e na largura dos picos em relação à furosemida matéria-prima (Figura 27). Entretanto, o espectro na região de deslocamento de baixa frequência ($< 200 \text{ cm}^{-1}$) apresentou tênue grau de alargamento e, apesar dos picos

estarem presentes nas mesmas posições encontradas na furosemida matéria-prima, os nanocristais apresentaram estrutura cristalina menos definida.

Figura 27 – Espectro de deslocamento Raman da furosemida e seus nanocristais.

Fonte: Elaborado pelo autor.

O espectro Raman da furosemida matéria-prima na região considerada *fingerprint* ($< 200 \text{ cm}^{-1}$) apresentou considerável semelhança com o espectro FT-Raman da furosemida comercial previamente publicado (BABU et al., 2010).

A espectroscopia Raman de baixo deslocamento indicou que os nanocristais apresentaram parcial amorfização após a nanopulverização. Essa metodologia de avaliação permite identificação inequívoca de fases amorfas e cristalinas, mesmo em sistemas contendo mistura de outros componentes (VEHRING et al., 2005 e 2012).

5.8 Solubilidade de saturação

Entre as técnicas mais recomendados para o estudo de solubilidade destaca-se o método de equilíbrio. Nesse método, conhecido como *shake flask*, a avaliação da solubilidade é realizada com a adição de excesso de fármaco em meio aquoso até atingir a saturação do meio. Posteriormente, esse meio é submetido à agitação durante período prolongado até a obtenção do equilíbrio entre soluto e solução (LÖEBENBERG; AMIDON, 2000; UNITED STATES, 2000).

As solubilidades de saturação da furosemida matéria-prima, da mistura física e dos nanocristais foram avaliadas em sete diferentes meios: água e em soluções apresentando valores de pH 1,2; 2,0; 6,0; 6,8; e 7,2 (Tabela 3, Figuras 28 e 29).

Tabela 3 – Solubilidade de saturação da furosemida matéria-prima, da mistura física e dos nanocristais (mg/mL, n=3, $\pm$ desvio padrão) e número de vezes no aumento da solubilidade observado nos nanocristais (dados entre parênteses).

Meios/pH	Furosemida (mg/mL)	Mistura Física (mg/mL)	Nanocristais (mg/mL)
HCl 0,01 M pH 1,2	0,009 $\pm$ 0,006	0,012 $\pm$ 0,004	0,022 $\pm$ 0,003 (2,4 x)
HCl 0,1 M pH 2,0	0,015 $\pm$ 0,005	0,011 $\pm$ 0,004	0,029 $\pm$ 0,004 (1,9 x)
Água	0,124 $\pm$ 0,022	0,017 $\pm$ 0,009	0,174 $\pm$ 0,022 (1,4 x)
Tampão Acetato pH 4,5	0,137 $\pm$ 0,040	0,082 $\pm$ 0,006	0,384 $\pm$ 0,015 (2,8 x)
Tampão Fosfato pH 6,0	1,046 $\pm$ 0,337	0,099 $\pm$ 0,104	3,213 $\pm$ 1,332 (3,1 x)
Tampão Fosfato pH 6,8	6,149 $\pm$ 1,757	5,635 $\pm$ 0,415	8,843 $\pm$ 0,727 (1,4 x)
Tampão Fosfato pH 7,2	11,503 $\pm$ 1.460	7,074 $\pm$ 0,245	17,554 $\pm$ 0,784 (1,5 x)

Figura 28 – Solubilidade de equilíbrio da furosemida matéria-prima e dos nanocristais e mistura física em água e soluções tampões de valores de pH 1,2; 2,0; e 4,5.

Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 29 – Solubilidade de equilíbrio da furosemida matéria-prima e dos nanocristais e mistura física em soluções tampões de valores de pH 6,0; 6,8; e 7,2.

Fonte: Elaborado pelo autor.

De acordo com os resultados obtidos, os nanocristais exibiram aumento na solubilidade de saturação de 40% até três vezes mais em relação à furosemida matéria-prima (Tabela 3, Figuras 28 e 29). Esses resultados confirmam a relação existente entre tamanho de partícula, área superficial e solubilidade de saturação (FU et al., 2013; HÖRTER; DRESSMAN, 2001; SUN et al., 2012).

Adicionalmente, o aumento da solubilidade de saturação dos nanocristais, em aproximadamente duas vezes nos meios ácidos (Tabela 3), sugere a possibilidade do aumento na biodisponibilidade e da diminuição da irregularidade de absorção da furosemida. Considerando que esse fármaco apresenta janela de absorção estreita e que sua absorção ocorre preferencialmente na porção superior do intestino, a maior solubilidade em meios ácidos ocasionaria aumento na velocidade de dissolução no estômago, maior disponibilidade do fármaco solubilizado e consequente aumento no gradiente de difusão da furosemida no duodeno.

Provavelmente, o aumento na solubilidade dos nanocristais é um fenômeno combinado entre as partículas nanométricas e os diferentes efeitos no estado sólido causados durante o processo de fragmentação. Muitos autores (Apêndice A) relataram que fármacos na forma de nanocristais apresentaram aumento de 10% até duas vezes mais na solubilidade de saturação (GAO et al., 2007 e 2008; GANTA et al., 2009; HECQ et al., 2005; 2006a e 2006b; KAKRAN et al., 2012; MAULUDIN; MÜLLER; KECK, 2009; MÖSCHWITZER; MÜLLER, 2006; MÜLLER; PETERS, 1998; MITRI et al., 2011; PARDEIKE; MÜLLER, 2010; XIONG et al., 2008; WIEDMANN; DECASTRO; WOOD, 1997).

Os dados obtidos nos ensaios de solubilidade também demonstram que o aumento da solubilidade dos nanocristais não ocorreu devido à adição de estabilizantes durante o processo de preparo, pois não foi observado aumento na solubilidade de saturação da mistura física em relação à solubilidade da furosemida matéria-prima.

5.9 Velocidade de dissolução intrínseca

A velocidade de dissolução intrínseca (VDI) é uma metodologia amplamente utilizada para a determinação de parâmetros termodinâmicos, com o objetivo de

elucidar: as relações existentes entre a velocidade de dissolução e a distribuição de tamanho de partícula; a transição de fase cristalina; e o efeito de tensoativos e pH na dissolução de fármacos de baixa solubilidade, sob área de superfície constante (BARTOLOMEI et al., 2006; YU et al., 2002 e 2004).

A VDI é considerada um fenômeno de velocidade de solubilização, ao invés de um fenômeno de equilíbrio, como a solubilidade de saturação. Dessa maneira, é esperado que os resultados de VDI apresentem correlações mais próximas com a dinâmica de dissolução do fármaco *in vivo* (YU et al., 2002 e 2004).

A VDI dos nanocristais e a da furosemida matéria-prima foram avaliadas em três diferentes meios: SGF (pH 1,2), tampão acetato (pH 4,5) e SIF (pH 6,8) (Figura 30).

Figura 30 – Dissolução intrínseca dos nanocristais de furosemida nos meios SGF (pH 1,2), tampão acetato 4,5 e SIF (6,8).

Fonte: Elaborado pelo autor.

A Tabela 4 e as Figuras 31, 32 e 33 apresentam a dissolução intrínseca da furosemida matéria-prima e nanocristal nas diferentes condições, suas respectivas equações e coeficientes de determinação.

Tabela 4 – Furosemida matéria-prima e nanocristal VDI (mg/min/cm²), equação da reta e R^2 nos três diferentes meios: SGF (pH 1,2), tampão acetato (pH 4,5) e SIF (pH 6,8).

Meio	Furosemida			Nanocristal		
	VDI	Equação	R^2	VDI	Equação	R^2
SGF	0,023	$y=0,012x+0,057$	0,996	0,050	$y=0,025x - 0,021$	0,981
Tampão	0,036	$y=0,018x+0,052$	0,995	0,068	$y=0,034x+0,126$	0,991
SIF	0,173	$y=0,087x+0,018$	0,990	0,655	$y=0,328x+0,044$	0,999

Figura 31 – Dissolução intrínseca da furosemida matéria-prima e nanocristal no meio SGF (pH 1,2).

Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 32 – Dissolução intrínseca da furosemida matéria-prima e nanocrystal no meio tampão acetato pH 4,5.

Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 33 – Dissolução intrínseca da furosemida matéria-prima e nanocrystal no meio SIF (pH 6,8).

Fonte: Elaborado pelo autor.

A análise de regressão, aplicada em todos os resultados da VDI, apresentou coeficiente de determinação entre 0,981 e 0,999 e o teste de ajuste para o modelo (*lack-of-fit*) apresentou valores-p maiores que 0,05 ($\alpha=0,05$).

Para a avaliação dos resíduos, a estatística de *Durbin-Watson* (DWS) foi aplicada. Os valores expressos na DWS variam entre 0 e 4 e, como regra geral, os resíduos não apresentam correlação quando os resultados se aproximam de 2. Valores próximos a 0 indicam forte correlação positiva, enquanto que valores próximos a 4 indicam forte correlação negativa.

Para os testes de VDI dos nanocristais, os valores da estatística DWS encontrados foram 1,996, 1,853 e 2,200, em meio SGF, tampão 4,5 e SIF, respectivamente. Esses resultados indicam não correlação entre os perfis encontrados nessas condições. No caso da furosemida matéria-prima, apenas o perfil observado no meio SIF apresentou DWS próximo a 2.

Na análise dos resíduos (Figuras 34 e 35), foram observadas variância constante, independência das variáveis e distribuição normal. Além disso, os resíduos observados apresentaram distribuição aleatória ao redor de zero. A verificação dos dados indicou melhor ajuste estatístico dos modelos de regressão escolhidos para avaliar os perfis de dissolução no meio SIF.

Figura 34 – Distribuição dos resíduos de dissolução intrínseca dos nanocristais, em meio SIF (a), tampão acetato (b), SGF (c) e furosemida matéria-prima em meio SIF (d).

(a)

(b)

(b)

(d)

Figura 35 – Distribuição dos resíduos de dissolução intrínseca da furosemida matéria-prima e dos nanocristais, em meio SGI (a), tampão acetato (b) e SIF (c).

(a)

(b)

(c)

Como esperado, a VDI dos nanocristais foi significativamente superior em relação à furosemida matéria-prima (One-way ANOVA - Modelo Geral Linear $p < 0,05$ e $\alpha = 0,05$). Na análise dos resíduos (Figura 35), foram observadas variância constante, independência das variáveis e distribuição normal.

A VDI dos nanocristais foi 2,2 vezes ($0,050 \text{ mg/min/cm}^2$), 1,8 vezes ($0,068 \text{ mg/min/cm}^2$) e 3,8 ($0,655 \text{ mg/min/cm}^2$) vezes mais rápida, quando comparada à da furosemida matéria-prima em meio SGF, tampão 4,5 e SIF, respectivamente (Tabela 4, Figuras 31, 32 e 33).

Avaliando as recentes publicações sobre nanocristais (Apêndice A), foi observado, em sua grande maioria, aumento significativo na velocidade de dissolução. Diversos trabalhos indicaram aumento na velocidade de 40% até seis vezes mais (CRISP et al., 2007; GAO et al., 2007; LAI et al., 2009; LANGGUTH et al., 2005; MITRI et al., 2011; MÖSCHWITZER; MÜLLER, 2006; NAKARANI; MISRA; PATEL; VAGHANI, 2010; VAN EERDENBRUGH et al., 2008; VOGT et al., 2008).

Experimentos realizados por Jinno e colaboradores (2006) demonstraram que os nanocristais do fármaco cilostazol exibiram dissolução total após 1 minuto, nos meios intestinais simulados não alimentado (FaSSIF) e alimentado (FeSSIF). Outro exemplo que merece destaque refere-se aos nanocristais de glibenclamida, que apresentaram 90% de dissolução, após 10 minutos (SALAZAR; MÜLLER; MÖSCHWITZER, 2013).

5.10 Avaliação *in silico* das características físico-químicas da furosemida

5.10.1 *pKa*, microespécies e ponto isoelétrico (pI)

As avaliações *in silico* das características físico-químicas da furosemida apresentaram: pK_a igual a 3,8; quatro microespécies em relação ao pH do meio; e pI igual a 1,37. As Figuras 36 e 37 apresentam as curvas de distribuição de microespécies, ou o logaritmo comum de microespécies, *versus* pH e o pI da furosemida, respectivamente.

Figura 36 – As quatro diferentes microespécies de furosemida e suas distribuições em relação ao pH.

Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 37 – Ponto isoelétrico da furosemida.

Fonte: Elaborado pelo autor.

A difusão paracelular ou transcelular através das membranas biológicas é um processo físico-químico e, portanto, as propriedades físico-químicas dos fármacos

têm influência importante sobre estes transportes de membrana. Espera-se que as formas não ionizadas dos fármacos, mais solúveis em lipídeos, difundirão nas membranas biológicas com maior facilidade em relação às formas ionizadas, apresentando maior biodisponibilidade (WATERBEEMD, 2000).

Conforme avaliação *in silico*, a microespécie de maior lipofilicidade da furosemida, identificada como (1) na Figura 36, é predominante em $\text{pH} < 2,2$. Tal dado confirma a hipótese de que a furosemida apresente local específico de absorção. Conforme experimentos realizados em ratos por Chungi e colaboradores (1979), a absorção da furosemida apresenta comportamento biexponencial, exibindo maior velocidade quando administrada no estômago, porém mais lenta quando administrada no intestino delgado.

Em humanos, a absorção da furosemida também é local-específica e ocorre principalmente nas partes superiores do intestino delgado. Clear e colaboradores (2001), ao administrarem furosemida em locais específicos no trato gastrointestinal (GI), com o auxílio de cápsulas Intelisite[®], descobriram que a janela de absorção de furosemida no trato GI superior é estreita. Quando a liberação do fármaco ocorreu no duodeno, e não no estômago, a área sob a curva (AUC) para furosemida diminuiu acentuadamente, em 29%. Dessa maneira, é possível concluir que a furosemida, em humanos, é mais rapidamente absorvida no trato GI superior após sua dissolução, no estômago.

5.10.2 Coeficiente de partição ($c\log P$) e coeficiente de distribuição ($\log D$)

De acordo com os cálculos estimados da ChemAxon's[®] Marvin, o $c\log P$ da furosemida é de 1,75. A Figura 38 apresenta o incremento do $c\log P$ de cada átomo e o potencial molecular de lipofilicidade ilustrado na superfície da molécula. As regiões vermelhas indicam regiões hidrofílicas e as regiões azuis e cinzas as hidrofóbicas.

Figura 38 – Incremento do $clogP$ de cada átomo da furosemida e potencial molecular de lipofilicidade ilustrado na superfície da molécula.

Fonte: Elaborado pelo autor.

O $\log D$ da furosemida é descrito em 4 diferentes valores de pH na Tabela 5 e na Figura 39.

Tabela 5 – $\log D$ da furosemida em diferentes valores de pH.

pH	$\log D$
1,30	1,75
5,00	0,93
6,50	-0,48
7,40	-1,75

Figura 39 – $\log D$ da furosemida em relação aos diferentes valores de pH.

Fonte: Elaborado pelo autor.

De acordo com Van de Waterbeend e Testa (2009), valores de $clogP$ e D inferiores a zero indicam baixa permeabilidade do fármaco através do jejuno humano. Essas informações confirmam as observações realizadas por Clear e colaboradores (2001), justificando a absorção irregular que a furosemida apresenta.

5.10.3 Área de superfície molecular, área de superfície polar e doadores e aceptores de H

A área da superfície molecular e da superfície polar da furosemida é de 399,15 e 131,01 Å², respectivamente. A furosemida apresenta 3 pontos doadores e 5 pontos aceptores de H (Figura 40).

Figura 40 – pontos doadores (D) e aceptores (A) de H na molécula de furosemida.

Fonte: Elaborado pelo autor.

Valores de PSA iguais ou menores que $140 \text{ \AA}^2$ indicam alta permeabilidade e probabilidade de biodisponibilidade oral adequada (ERTL; ROHDE; SELZER, 2000; VAN DE WATERBEEND; TESTA, 2009; VEBER et al., 2002). Ademais, a “regra dos 5 de Lipinsk” prevê que a baixa absorção é mais provável quando existem mais de 5 doadores de H, 10 aceptores de H e peso molecular maior do que 500 daltons (LIPINSK et al., 2001, 2002 e 2012).

Apesar da furosemida não superar os limites de área de superfície polar, número de doadores e aceptores de H, experimentalmente sua biodisponibilidade é variável e errática; alguns trabalhos relatam biodisponibilidade menores de 50% ou entre 37 e 70% (SWETMAN et al., 2004).

Acredita-se que a variabilidade na biodisponibilidade da Furosemida esteja relacionada com a variação no processo de absorção intraindivíduo, uma vez que repetidas doses intravenosas indicaram variação não significativa intraindivíduo (GRANERO et al., 2010). Outro fator a ser considerado em relação à variação no

processo de absorção intraindivíduo é o fato de a furosemida ser um substrato de efluxo, mediado pelas bombas de glicoproteínas-P (P-gp) (AL-MOHIZEA, 2010).

5.11 Avaliação *in silico* da absorção oral e pulmonar dos nanocristais

Após simulação da absorção oral e pulmonar da furosemida e de seus nanocristais, foram observados valores relacionados às características farmacocinéticas e biofarmacêuticas (Tabela 6).

Tabela 6 – Fração absorvida (Fa%), área sob a curva (AUC), concentração máxima ($C_{\text{máx}}$), tempo para atingir a concentração máxima ($T_{\text{máx}}$), número de dose (D_0), número de absorção (A_n) e número de dissolução (D_n) após simulação da absorção oral e pulmonar de comprimidos e pó inalável contendo 40mg de furosemida e seu nanocristal.

Parâmetros	Absorção Oral			Absorção Pulmonar	
	Furosemida Alimentado	Nanocristal Alimentado	Não alimentado	Furosemida	Nanocristal
Fa%	51,86	53,93	53,39	69,71	74,60
AUC ug.h/mL	6,43	6,56	6,48	3,35	3,57
$C_{\text{máx}}$ ug/mL	1,61	1,63	1,62	1,03	1,81
$T_{\text{máx}}$ h	1,92	1,74	3,04	1,38	0,12
D_0	30,77		14,78	-	-
A_n	0,596		0,596	-	-
D_n	0,22		2,061	-	-

- não aplicável

A fração de furosemida absorvida (%) nos diferentes compartimentos, com relação às formas farmacêuticas e às vias de administração oral e pulmonar, é descrita na Figura 41.

Figura 41 – Fração absorvida (%) de furosemida nos diferentes compartimentos com relação às diferentes formas farmacêuticas e vias de administração

Fonte: Elaborado pelo autor.

A biodisponibilidade oral pode ser avaliada de acordo com as variáveis que influenciam a liberação intestinal do fármaco, a absorção no lúmen intestinal, o metabolismo de primeira passagem no estômago e o subsequente metabolismo de primeira passagem hepático. Essas variáveis, por sua vez, são influenciadas por: esvaziamento gástrico, trânsito intestinal, pH local, estado nutricional, velocidade de dissolução, permeabilidade, tamanho da partícula, efluxo intestinal e transporte mediado por carreadores (AGORAM, WOLTOSZ e BOLGER, 2001).

As propriedades biofarmacêuticas obtidas experimentalmente *in vitro*, como as propriedades estimadas *in silico*, podem ser utilizadas para prever a absorção, a distribuição, o metabolismo, a excreção e a toxicidade dos fármacos.

Em relação à absorção oral da furosemida nanocrystal, foi possível observar diminuição em seu número de dose (Do) e aumento do número de dissolução (Dn). Tal observação está associada ao aumento da solubilidade de saturação e da velocidade de dissolução dos nanocristais.

Considerando os parâmetros farmacocinéticos, os nanocristais apresentaram moderado aumento na fração absorvida (Fa%), na área sob a curva (AUC), na concentração máxima ($C_{máx}$). Além disso, foi observada moderada diminuição no tempo que a absorção atingiu a concentração máxima ($T_{máx}$).

A furosemida, por ser um fármaco classe IV, é alvo de diversas pesquisas que objetivam melhorar sua solubilidade ou controlar sua liberação. Na maioria dos experimentos realizados com a furosemida, apenas suas propriedades físico-químicas foram avaliadas, não considerando o impacto dessas no desempenho farmacocinético do produto final. Todos os trabalhos obtiveram aumento estatisticamente significativo na solubilidade de saturação, velocidade de dissolução e, dessa maneira, atribuíram-se, ao novo produto, propriedades promissoras quanto ao aumento de biodisponibilidade. Entretanto, poucos trabalhos avaliaram a modificação do desempenho farmacocinético da furosemida após aplicação das diferentes estratégias (AL et al., 2003; AMBROGI et al., 2012; CHAULANG et al., 2008; DARANDALE; VAVIA, 2012; FARCAS et al., 2006; GOUD et al., 2011; NASEEM et al., 2003; PATEL et al., 2010; PERIOLI et al., 2012; SPRICIGO et al., 2008; YOUAM et al., 2012).

Nos trabalhos realizados por Zordi e colaboradores (2012), dispersões sólidas de furosemida em polivinilpirrolidona (PVP) foram obtidas utilizando técnica de antissolvente supercrítico. Essas dispersões apresentaram aumento significativo na velocidade de dissolução em fluido gástrico simulado (pH 1,2). Utilizando-se simulação *in silico* (Gastro Plus[®]), foi observado aumento moderado na AUC, de 5,8 para 6,16 $\mu\text{g.h/mL}$, aumento de $C_{máx}$, de 0,99 para 1,11 $\mu\text{g/mL}$, e diminuição do $T_{máx}$, de 2,73 para 2,06 h.

Nielsen e colaboradores (2013) desenvolveram o sal sódico amorfo da furosemida utilizando a técnica de *spray drying*. Em avaliações *in vitro* e *in vivo*, o sal amorfo demonstrou aumento de 8 a 20 vezes na velocidade de dissolução intrínseca (VDI) e exibiu diminuição significativa no $T_{máx}$, de 57,5 para 23,3 minutos. Não foram observadas alterações no $C_{máx}$ e na AUC. Dentre as conclusões do trabalho de Nielsen e colaboradores (2013), destaca-se a relação entre a diminuição do $T_{máx}$, o aumento da VDI e a solubilidade de saturação.

Comparando os resultados do comportamento farmacocinético dos nanocristais com os resultados *in silico* e *in vivo*, obtidos nas diferentes formulações,

é possível observar correlação entre os trabalhos. Todos os experimentos apresentaram aumento significativo na VDI e solubilidade de saturação, diminuição no $T_{\text{máx}}$, porém moderado aumento na $Fa\%$ e no $C_{\text{máx}}$.

Considerando que a furosemida apresenta janela de absorção estreita no trato GI superior (CLEAR et al., 2001), o aumento de sua solubilidade de saturação e VDI em meios ácidos proporcionará maior dissolução de moléculas não ionizadas em meio gástrico. Dessa maneira, a furosemida poderá ser rapidamente absorvida no trato GI superior após total dissolução no estômago; assim, a velocidade do esvaziamento gástrico também pode ser considerada fator limitante para a absorção.

Por outro lado, estudos indicam que o aumento na solubilidade de saturação pode interferir negativamente na permeabilidade efetiva (P_{eff}) dos fármacos. Miller e Dahan (2012) demonstraram que, ao utilizar ciclodextrinas como agentes solubilizantes da furosemida, ao mesmo tempo que esses carreadores aumentam a solubilidade aparente, diminuem a permeabilidade intestinal e, conseqüentemente, limitam o desempenho *in vivo* da formulação.

Outro fator a ser considerado, e não avaliado pela simulação *in silico*, é a influência gerada pelo tensoativo polissorbato 80 na permeabilidade da furosemida. Sabe-se que esse fármaco é um substrato de efluxo, mediado pelas bombas de glicoproteínas – P (P-gp), e que o polissorbato 80 atua como inibidor das bombas P-gp (AL-MOHIZEA, 2010).

Paralelamente, ao avaliar os parâmetros farmacocinéticos da absorção pulmonar *in silico*, foi possível prever melhora no desempenho *in vivo* dos nanocristais de furosemida. Utilizando a via de administração pulmonar, os nanocristais apresentaram desempenho moderado em relação à furosemida não nanonizada, porém melhor desempenho em relação à administração oral; destacando-se o aumento de $Fa\%$ e $C_{\text{máx}}$ e a acentuada diminuição no $T_{\text{máx}}$.

Esses resultados podem ser justificados em função das características da via de administração pulmonar, como a extensa área de superfície, da fina camada alveolar de difusão, da lenta depuração de superfície e da baixa atividade enzimática (LABIRIS; DOLOVICH, 2003). Além disso, os nanocristais apresentam maior fração inalável e menor absorção sistêmica indesejada via deposição na garganta, quando comparados aos fármacos na forma de microcristais. Estudos indicam que a diminuição do tamanho das partículas de 4,4 μm para 730 nm, utilizando a

técnologia de homogeneização à alta pressão, aumentou a dose inalável do fármaco dipropionato de beclometasona de 227 µg para 421 µg (KELLER et al., 2002; OSTRANDER; BOSCH; BONDANZA, 1999).

Outra característica que justifica a utilização da via de administração pulmonar refere-se à ausência da influência da dieta do paciente na liberação pulmonar (LABIRIS; DOLOVICH, 2003). De acordo com Sweetman (2004), a absorção oral errática da furosemida pode estar associada a presença e a ausência de alimentos no trato gastrointestinal. No presente trabalho, a influência gerada pelos alimentos foi observada na simulação *in silico*, que indicou diferença de 1,30 horas entre $T_{m\acute{a}x}$ dos nanocristais administrados por via oral em estado alimentado em relação ao estado não alimentado.

A simulação *in silico* apresentou diferença de 1,80 e 1,26 horas entre $T_{m\acute{a}x}$ dos nanocristais administrados por via pulmonar em relação à furosemida administrada por via oral e através via pulmonar, respectivamente.

Avaliando as alterações farmacocinéticas entre furosemida e seus nanocristais, e ponderando as vantagens da administração pulmonar dos fármacos, é possível considerar que a via de administração pulmonar pode ser utilizada como via alternativa para o tratamento do edema pulmonar e da hipertensão. Diversas pesquisas indicam a administração pulmonar de furosemida no tratamento de edema pulmonar cardiogênico, na prevenção e no tratamento da broncoconstrição moderada à severa em pacientes asmáticos. Esse fármaco pode ser indicado na dispneia relacionada aos seguintes casos: ocasionada pelo esporte; em pacientes prematuros; pacientes com câncer em fase terminal e que apresentam sarcoma de Kaposi (BHURE et al., 2009; BIANCO et al., 1988; KALLET, 2007; SAHNI; PHELPS 2011; SOLYMOSI et al., 2013).

Os estudos sugerem que a furosemida administrada por via pulmonar diminui o edema pulmonar, melhora a mecânica pulmonar, em crianças prematuras, e alivia a asma e a dispneia em pacientes com câncer terminal e com doença pulmonar crônica obstrutiva (PACIFI, 2013; PENDINO et al., 1998; NISHINO et al., 2000; ONG et al., 2004; KALLET, 2007; VAHEDI et al., 2013). Benefícios semelhantes também foram observados na área veterinária, especialmente no tratamento de problemas respiratórios de cavalos de corrida (WATSON, 2011).

Recentemente, os *U.S. National Institutes of Health* e a *Clinical Trials Organization* estão organizando estudo clínico multicêntrico. Esse estudo tem o

objetivo de confirmar a hipótese de que a inalação de dose única de furosemida pode melhorar a percepção da dispneia durante exercícios físicos, em homens jovens e saudáveis, na presença de restrição torácica externa (JENSEN, 2013).

6. CONCLUSÃO

A tecnologia de moagem à alta energia por revolução/rotação permitiu a obtenção de nanocristais de furosemida apresentando diâmetros médios $D[4,3]$ e $D[3,2]$, de 231 e 111 nm, respectivamente. Os nanocristais também apresentaram adequada homogeneidade de distribuição do tamanho de partícula. O tamanho médio de partícula obtido permitirá sua aplicação no desenvolvimento de medicamentos inovadores administrados pelas vias intravenosa e pulmonar, além da via oral.

A formulação dos nanocristais apresentou estabilidade no que se refere à sua característica térmica. Não foram observadas interações entre os excipientes e os nanocristais de furosemida. Entretanto, esses apresentaram estrutura cristalina menos definida, indicando parcial amorfização.

A solubilidade de saturação dos nanocristais de furosemida foi até três vezes maior quando comparada ao fármaco matéria-prima, confirmando a relação existente entre tamanho de partícula, área superficial e solubilidade de saturação. Como consequência, os nanocristais exibiram aumento significativo na velocidade de dissolução intrínseca em 2,2 vezes ($0,050\text{mg}/\text{min}/\text{cm}^2$), 1,8 vezes ($0,068\text{mg}/\text{min}/\text{cm}^2$) e 3,8 vezes ($0,655\text{mg}/\text{min}/\text{cm}^2$), quando comparados à da furosemida matéria-prima em meio SGF, tampão 4,5 e SIF, respectivamente.

As ferramentas *in silico* permitiram a avaliação das características físico-químicas e biológicas dos nanocristais de furosemida. Essas avaliações indicaram que a furosemida apresenta pK_a igual 3,8; quatro microespécies em relação ao pH do meio; pI igual a 1,37; $clogP$ de 1,75; valor de área da superfície molecular de 399,15; valor superfície polar de $131,01 \text{ \AA}^2$; três pontos doadores; e cinco pontos aceptores de H. Essas constantes, associadas à “regra dos 5 de Lipinsk”, permitiram justificar parcialmente a absorção errática e irregular da furosemida, após administração oral.

No que se refere às avaliações biológicas *in silico* dos nanocristais de furosemida, sua absorção oral revelou moderada alteração no perfil farmacocinético. Os nanocristais apresentaram moderado aumento na $Fa\%$, na AUC e na $C_{m\acute{a}x}$. Além disso, também foi observada moderada diminuição no $T_{m\acute{a}x}$. Dessa maneira, será necessária a aplicação de tecnologias adicionais e/ou outros recursos, com a finalidade de aumentar a permeabilidade intestinal da furosemida. No

entanto, utilizando a via de administração pulmonar, os nanocristais apresentaram maior desempenho em relação à furosemida matéria-prima, quando comparada ao desempenho para a via de administração oral; destacando-se o aumento na Fa% e na $C_{m\acute{a}x}$ e a acentuada diminuição no $T_{m\acute{a}x}$. Desse modo, os nanocristais de furosemida apresentam potencial aplicação no desenvolvimento de formas farmacêuticas para administração pulmonar.

7. REFERÊNCIAS

- ABDOU, H. M. **Dissolution, bioavailability and bioequivalence**. Easton: Mack Printing, 1989. 554 p.
- ABDOU, H. M.; HANNA, S.; MUHAMMAD, N. Dissolution. In: In: REMINGTON: the science and practice of pharmacy. 20. ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2000. p. 654-666, il.
- ABRAHAM, M. H. et al. Hydrogen bonding. 32. An analysis of water-octanol and water-alkane partitioning and the delta log P parameter of seiler. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 83, n. 8, p. 1085-1100, Aug. 1994.
- AGORAM, B.; WOLTOSZ, W. S.; BOLGER, M. B. Predicting the impact of physiological and biochemical processes on oral drug bioavailability. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 50, suppl. 1, p. S41–S67, Oct, 2001.
- AI, H. et al. Nano-encapsulation of furosemide microcrystals for controlled drug release. **Journal of Controlled Release**, v. 86, n. 1, p. 59-68, Jan. 2003.
- AIN-AI, A.; GUPTA, P. K. Effect of arginine hydrochloride and hydroxypropyl cellulose as stabilizers on the physical stability of high drug loading nanosuspensions of a poorly soluble compound. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 351, n. 1/2, p. 282-288, Mar. 2008.
- AKKAR, A.; MÜLLER, R. H. SolEmuls for poorly soluble drugs: physical background of novel formulation principle. **Arch. Pharm. Pharm. Med. Chem.**, v. 335, sup. 1, p. 56, 2002.
- AKBUGA, J.; GÜSOY, A.; YETIMOĞLU, F. Preparation and properties of tablets prepared from furosemide-PVP solid dispersion systems. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, v. 14, n. 15/17, p. 2091-2108, 1988.
- AL SHAAL, L.; SHEGOKAR, R.; MÜLLER, R. H. Production and characterization of antioxidant apigenin nanocrystals as a novel UV skin protective formulation. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 420, n. 1, p. 133-140, Nov. 2011.
- AL-MOHIZEA, A. M. Influence of intestinal efflux pumps on the absorption and transport of furosemide. **Saudi Pharmaceutical Journal**, v. 18, n. 2, p. 97-101, April 2010.
- ALI, J. et al. Revisiting the General Solubility Equation: In Silico Prediction of Aqueous Solubility Incorporating the Effect of Topographical Polar Surface Area. **Journal of Chemical Information and Modeling**. v.52, n.2, p. 420-428, 2012.
- ALLEN, L. V.; POPOVICH, N. G.; ANSEL, H. C. **Formas farmacêuticas e sistemas de liberação de fármacos**. 8. ed. Porto Alegre: Artmed, 2007.
- ALSENZ, J.; KANSY, M. High throughput solubility measurement in drug discovery and development. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 59, n. 7, p. 546-567, July

2007.

AMBROGI, V. et al. Use of SBA-15 for furosemide oral delivery enhancement. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 46, n. 1-2, p. 43-48, May 2012.

AMIDON, G. et al. A theoretical basis for a biopharmaceutical drug classification: the correlation of in vitro drug product dissolution and in vivo bioavailability. **Pharmaceutical Research**, v. 12, n. 3, p.413-420, Mar. 1995.

ANDERSON, A. M.; WORSTER, M. G. Periodic ice banding in freezing colloidal dispersions. **Langmuir**, v. 28, n. 48, p. 16512-16523, 2012.

ARTURSSON, P. Epithelial transport of drug in cell culture. I: A model for studying the passive diffusion of drugs over intestinal absorptive (Caco-2) cells. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 79, n. 6, p. 476-482, June 1990.

ARTURSSON, P.; PALM, K.; LUTHMAN, K. Caco-2 monolayers in experimental and theoretical predictions of drug transport. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 46, n. 1/3, p. 27-43, Mar. 2001.

ATKINS, P.; PAULA, J. **Físico-química: fundamentos**. Rio de Janeiro: GEN: LTC, 2011. 493 p., il.

AUGUSTIJNS, P. et al. A review of drug solubility in human intestinal fluids: implications for the prediction of oral absorption. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 13, p. S928-S987, Aug. 2013.

AULTON, M.E. Delineamento de formas farmacêuticas. 2.ed. Porto Alegre: Artmed, 2005. 678 p.

BABU, N. J. et al. Conformational and synthon polymorphism in furosemide (Lasix). **Crystal Growth & Design**, v, 10 n. 4, p. 1979-1989, 2010.

BARTOLOMEI, M. et al. Physico-chemical characterization and intrinsic dissolution studies of a new hydrate form of diclofenac sodium: comparison with anhydrous form. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 40, n. 5, p. 1105-1113, Mar. 2006.

BASA, S. et al. Production and in vitro characterization of solid dosage form incorporating drug nanoparticles. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, v. 34, n. 11, p. 1209-1218, Nov. 2008.

BENET, L. Z.; BROCCATELLI, F.; OPREA, T. I. BDDCS applied to over 900 drugs. **AAPS Journal**, v. 13, n. 4, p. 519-547, Dec. 2011.

BENET, N. et al. New technologies for the precipitation of solid particles with controlled properties. **Powder Technology**, v. 128, n. 2/3, p. 93-98, Dec. 2002.

BERGSTRÖM, C. A.; LUTHMAN, K.; ARTURSSON, P. Accuracy of calculated pH-dependent aqueous drug solubility. Accuracy of calculated pH-dependent aqueous

drug solubility. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 22, n. 5, p. 387-398, Aug. 2004.

BERTHOD, A. Hydrophobicity of ionizable compounds. A theoretical study and measurements of diuretic octanol-water partition coefficients by countercurrent chromatography. **Analytical Chemistry**, v. 71, n. 4, p. 879-888, 1999.

BEYERS, H. et al. Structure-solubility relationship and thermal decomposition of furosemide. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, v. 26, n. 10, p. 1077-1083, Oct. 2000.

BHURE, U.N. et al. Lung epithelial permeability and inhaled furosemide: added dimensions in asthmatics. **Annals of Nuclear Medicine**, v. 23, n. 6, p. 549-547, Aug. 2009.

BIANCO, S. et al. Prevention of exercise-induced bronchoconstriction by inhaled furosemide. **Lancet**, v. 2, n. 8605, p. 252-255, July 1988.

BOLTON S. Statistics In: REMINGTON: the science and practice of pharmacy. 20. ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2000. p. 124-158, il.

BOX, K. et al. New ideas about solubility of drugs. **Chemistry and Biodiversity**, v. 6, n. 11, p. 1767-1788, Nov. 2009.

BRASIL. **Farmacopéia Brasileira**. 5ª ed. Brasília: Agência Nacional de Vigilância Sanitária, 2010.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Instrução normativa n. 4, de 3 de agosto de 2011. **Dispõe sobre a lista de fármacos candidatos à bioisenção baseada no sistema de classificação biofarmacêutica (SCB) e dá outras providências**. Brasília: ANVISA, 2011.

BRITISH STANDARDS INSTITUTION. **PAS 71:2005** - Vocabulary - Nanoparticles. 2005. Disponível em: <<http://www.bsi-global.com/upload/Standards%20&%20Publications/Nanotechnologies/PAS71.pdf>>. Acesso em: 12 de abril de 2012.

BUSHRAB, F. N.; MÜLLER, R. H. Nanocrystals of Poorly Soluble Drugs for Oral. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v.30, p. 426-439, 2002.

BYRAPPA, K., OHARA, S., ADSCHIRI, T. Nanoparticles synthesis using supercritical fluid technology – towards biomedical applications. **Advanced Drug Delivery Review**, v. 60, n.3, p. 299-327, Feb. 2008

CASTELLAN, G. **Fundamentos de físico-química**. Rio de Janeiro: LTC, 2003. 527 p., il.

CHAUBAL, M. V.; POPESCU, C. Conversion of nanosuspensions into dry powders by spray drying: a case study. **Pharmaceutical Research**, v. 25, n. 10, p. 2302-2308, Oct. 2008.

CHAUDHURI, R.; LUKACOVA, S. Simulating delivery of pulmonary (and intranasal) aerosolised drugs. In: ORALLY inhaled & nasal drug products: innovations from major delivery system developers. United Kingdom: Frederick Furness, 2010. Disponível em: <<http://www.ondrugdelivery.com/publications/OINDP%20November%202010/OINDP%20November%202010%20lo%20res.pdf>>. Acesso em: 01 de abril de 2014.

CHAULANG, G. et al. Preparation and characterization of solid dispersion tablet of furosemide with crospovidone. **Research Journal of Pharmacy and Technology**, v. 1, n. 4, p. 386-389, Oct./Dec. 2008.

CHEN, H. et al. A high-throughput combinatorial approach for the discovery of a cremophor EL-free paclitaxel formulation. **Pharmaceutical Research**, v. 20, n. 8, p. 1302-1308, Aug. 2003.

CHIANG, P. C. et al.. 1, 3 - Dicyclohexyl urea nanosuspension for intravenous steady-state delivery in rats. **Journal of Experimental Nanoscience**, v. 2, n. 3, p. 239-250, 2007.

_____. Evaluation of aerosol delivery of nanosuspension for pre-clinical pulmonary drug delivery. **Nanoscale Research Letters**, v. 4, n. 3, p. 254-261, 2009.

_____. Investigation of utilization of nanosuspension formulation to enhance exposure of 1,3-dicyclohexylurea in rats: Preparation for PK/PD study via subcutaneous route of nanosuspension drug delivery. **Nanoscale Research Letters**, v. 6, p. 413, 2011.

CHIOU, H. Production of salbutamol sulfate for inhalation by high-gravity controlled antisolvent precipitation. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 331, n. 1, p. 93-98, Feb. 2007.

CHOI, J. Y. Role of polymeric stabilizers for drug nanocrystal dispersions. **Current Applied Physics**, v. 5, n. 5, p. 472-474, July 2005.

CHOI, Y. K. et al. Enhanced solubility and oral bioavailability of itraconazole by combining membrane emulsification and spray drying technique. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 434, n. 1/2, p. 264-271, Sept. 2012.

CHU, K. A.; YALKOWSKY, S. H. An interesting relationship between drug absorption and melting point. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 373, n. 1/2, p. 24-40, May 2009.

CHUNGI, V. S.; DITTERT, L. W.; SMITH, R. B. Gastrointestinal sites of furosemide absorption in rats. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 4, n. 1, p. 27-38, Nov. 1979.

CLARYSSE, S. et al. Intestinal drug solubility estimation based on simulated intestinal fluids: comparison with solubility in human intestinal fluids. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 43, n. 4, p. 260-269, July 2011.

CLEAR, N. J. et al. Evaluation of the intelisite capsule to deliver theophylline and frusemide tablets to the small intestine and colon. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 13, n. 4, p. 375-384, July, 2001.

CONSIGLIERE, V. O.; STORPIRTIS, S.; FERRAZ, H. G. Aspectos farmacotécnicos relacionados à biodisponibilidade e bioequivalência de medicamentos. **Revista de Ciências Farmacêuticas**, v. 21 p. 23-41, 2000.

CORTI, G. et al. Development and evaluation of an in vitro method for prediction of human drug absorption II. Demonstration on the method suitability. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 27, n. 4, p. 354-362, Mar. 2006.

CRISP, M. T. Turbidimetric measurement and prediction of dissolution rates of poorly soluble drug nanocrystals. **Journal of Controlled Release**, v. 117, n. 3, p. 351-359, Feb. 2007.

DAHAN, A.; MILLER, J. M.; AMIDON, G. L. Prediction of solubility and permeability class membership: provisional BCS classification of the World's Top Oral Drugs. **The AAPS Journal**, v. 11, n. 4, p. 740-746, Dec. 2009.

DANNENFELSER, R. M. et al. Development of clinical dosage forms for a poorly water soluble drug I: application of polyethylene glycol-polysorbate 80 solid dispersion carrier system. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 93, n. 5, p. 1165-1175, 2004.

DARANDALE, S. S.; VAVIA, P. R. Design of a gastroretentive mucoadhesive dosage form of furosemide for controlled release. **Acta Pharmaceut Sinica B**, v. 2, n. 5, p. 509-517, Oct, 2012.

DAVIO, S. R. et al. Precipitation of the renin inhibitor ditekiren upon iv infusion; *in vitro* studies and their relationship to *in vivo* precipitation in the cynomolgus monkey. **Pharmaceutical Research**, v.8, p. 80-83, 1991.

DELANEY, J. S. Predicting aqueous solubility from structure. **Drug Discovery Today**, v. 10, n. 4, p. 289-295, Feb. 2005.

DENG, Z.; XU, S.; LI, S. Understanding a relaxation behavior in a nanoparticle suspension for drug delivery applications. **International Journal of Pharmaceutical**, v. 351, v. 1/2, p. 236-243, Mar. 2008.

DHUMAL, R. S. et al. Preparation of amorphous cefuroxime axetil nanoparticles by sonoprecipitation for enhancement of bioavailability. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 70, n. 1, p. 109-115, Sept. 2008.

DOKOUMETZIDIS, A.; MACHERAS, P. A century of dissolution research: from Noyes and Withney to the biopharmaceutics classification system. **International Journal of**

Pharmaceutics, v. 321, n. 1/2, p. 1-11, Sept. 2006.

DOLENC, A. et al. Advantages of celecoxib nanosuspension formulation and transformation into tablets. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 376, n. 1/2, p. 204-212, July. 2009.

DRESSMAN, J. B.; LENNERNÄS, H. **Oral drug absorption**: prediction and assessment. Hardcover: Marcel Dekker, 2000.

DRESSMAN, J. B. et al. Estimating drug solubility in the gastrointestinal tract. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 59, n. 7, p. 591-602, July 2007.

DURÁN, N. et al. Tecnologia de nanocristais em fármaco. **Química Nova**, v. 33, p. 151-158, 2010.

ELAN Pharma International Ltd. Elaine Merisko-Liversidge. **Stabilization of active agents by formulation into nanoparticulate form**: CA2460436 A1. World Patent, 13 Sept. 2002, 27 mar. 2003.

_____. James Cunningham et al. **Milling microgram quantities of nanoparticulate candidate compounds**: US 20040173696 A1. World Patent WO 2004/058216 A2, 17 Dec. 2003, 9 Sept. 2004.

ERTL, P.; ROHDE, B.; SELZER, P. Fast calculation of molecular polar surface area as a sum of fragment-based contributions and its application to the prediction of drug transport properties. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 43, n. 20, p. 3714-3717, 2000.

EUROPEAN MEDICINES AGENCY. **Committee for medicinal products for human use**. 2010. Guideline on the investigation of bioequivalence. Disponível em: <http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2010/01/WC500070039.pdf>. Acesso em: 12 de abril de 2012.

FAKES, M. G. et al. Enhancement of oral bioavailability of an HIV-attachment inhibitor by nanosizing and amorphous formulation approaches. **International journal of pharmaceutics**, v.370, n.1, p.167-174, Mar. 2009.

FARCAS, A. et al. Synthesis and characterization of furosemide complex in β -cyclodextrin. **Digest Journal of Nanomaterials and Biostructures**, v. 1, n. 2, p. 55-60, June 2006.

FARRINGTON, K. J.; THOMSON, B. M.; WHITLOCK, H. V. The relationship between the surface area of phenothiazine and its excretion in sheep. **Australian Veterinary Journal**, v. 38, n. 2, p. 53-58, Feb. 1962.

FLANAGAN, S. D.; BENET, L. Z. Net secretion of furosemide is subject to indomethacin inhibition, as observed in Caco-2 monolayers and excised rat Jejunum. **Pharmaceutical Research**, v. 16, n. 2, p. 221-224, Feb. 1999.

FLORENCE, A. T.; ATTWOOD, D. **Princípios físico-químicos em farmácia**. São Paulo: Edusp, 2003.

FU, Q. et al. Nimodipine nanocrystals for oral bioavailability improvement: preparation, characterization and pharmacokinetic studies. **Colloids and Surfaces B. Biointerfaces**, v. 109, p. 161-166, 2013.

GAISFORD, S.; SAUNDERS, M. Dissolution. In: _____. **Essentials of pharmaceutical preformulation**. United Kingdom: John Wiley & Sons, 2012.

GAMSJÄGER, H. et al. Glossary of terms related to solubility. **Pure and Applied Chemistry**, v. 80, n. 2, p. 233-276, 2008.

GANTA, S. et al. Formulation and pharmacokinetic evaluation of an asulacrine nanocrystalline suspension for intravenous delivery. **International journal of pharmaceutics**, v.367, n.1, p.179-186, Feb. 2009.

GAO, L. et al. Preparation and characterization of an oridonin nanosuspension for solubility and dissolution velocity enhancement. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, v. 33, n. 12, p. 1332-1339, Dec. 2007.

_____. Studies on pharmacokinetics and tissue distribution of oridonin nanosuspensions. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 355, n. 1/2, p. 321–327, May 2008.

_____. Drug nanocrystals: In vivo performance. **Journal of Control Release**, v. 160, n. 10, 2012.

_____. Application of Drug Nanocrystal Technologies on Oral Drug Delivery of Poorly Soluble Drugs. **Pharmaceutical Research**, v. 30, n. 2, p. 307-324, Feb. 2013.

GASSMANN, P. et al. Hydrosols – alternatives for the parenteral application of poorly water soluble drugs. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 40, p. 64-72, 1994.

GE, M. et al. Polymorphic forms of furosemide characterized by THz time domain spectroscopy. **Bulletin Korean Chemical Society**, v. 30, n. 10, p. 2265-2268, 2009.

GEISER, M.; KREYLING, W. G. Deposition and biokinetics of inhaled nanoparticles. **Particle and Fibre Toxicology**, v. 7, n. 2, p. 1-17, 2010.

GHIRARDELLI, R. et al. Identification of particular epithelial areas and cells that transport polypeptide-coated nanoparticles in the nasal respiratory mucosa of the rabbit. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1416, n. 1/2, p. 39-47, Jan. 1999.

GIRON, D. et al. Comparison of quantitative methods for analysis of polyphasic pharmaceuticals. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, v. 89, n. 2, p. 729-743, Sept. 2007.

GONZÁLES-CABALLERO, F., DIOS GARCÍA LÓPEZ-DURÁN, J. Suspension formulation. In: NIELLOUD, F.; MARTI-MESTRES, G. (Eds.). **Pharmaceutical emulsions and suspensions, drugs and the pharmaceutical sciences**. New York: Marcel Dekker, 2000. v. 105, p. 127-190.

GOMEZ, A. et al. Production of protein nanoparticles by electrospray drying, **Journal of Aerosol Science**, v. 29, n. 5/6, p. 561–574, June 1998.

GOODMAN & Gilman's: the pharmacological basis of therapeutics. 20. ed. New York: McGraw-Hill, 2001. 2148 p.

GORDON, B. V.; HUGH, Mc. L. The influence of particle size on the anthelmintic efficiency of phenothiazine in sheep. **Australian Veterinary Journal**, v. 32, n. 10, p. 258-268, Oct. 1956.

GOUD, N. R. et al. Novel furosemide cocrystals and selection of high solubility drug forms. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 101, n. 2, p. 664-680, Feb. 2012.

GHOSH, S. et al. Oral Delivery of 1, 3-Dicyclohexylurea Nanosuspension Enhances Exposure and Lowers Blood Pressure in Hypertensive Rats. **Basic & clinical pharmacology & toxicology** v.102, n. 5, p. 453-458, May 2008.

GRANERO, G. E. et al. Biowaiver monographs for immediate release solid oral dosage forms: semide. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 96, n. 6, p. 1480-1489, June 2007.

GUO, Z. et al. Surface functionalized alumina nanoparticle filled polymeric nanocomposites with enhanced mechanical properties. **Journal of Material Chemistry**, v. 16, n. 6, p. 2800-2808, 2006.

GUYTON, A. C.; HALL, J. E. **Tratado de fisiologia médica**. 11. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2006.

HANAFY, A. et al. Pharmacokinetic evaluation of oral fenofibrate nanosuspensions and SLN in comparison to conventional suspensions of micronized drug. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 59, n. 6, p. 419-426, July 2007.

HECQ, J. et al. Preparation and characterization of nanocrystals for solubility and dissolution rate enhancement of nifedipine. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 299, n. 1/2, p. 167-177, Aug. 2005.

_____. Preparation and in vitro/in vivo evaluation of nano-sized crystals for dissolution rate enhancement of ucb-35440-3, a highly dosed poorly water-soluble weak base. **European Journal of Pharmaceutcs and Biopharmaceutics**, v. 64, n. 3, p. 360-368, Nov. 2006a.

_____. Nifedipine nanocrystals: pharmacokinetic evaluation in the rat and permeability studies in Caco-2/HT29-5M21 (co)-cultures. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**, v. 16, p. 437-442, 2006b.

HEIKKINEN, A. T. et al. Application of PBPK modeling to predict human intestinal metabolism of CYP3A substrates – An evaluation and case study using GastroPlus. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 47, n. 2, p. 375-386, Sept. 2012.

HONÓRIO, T. S. et al. *In Vitro–In Vivo* Correlation of Efavirenz Tablets Using GastroPlus®. **AAPS PharmSciTech**, v. 14, n. 3, p. 244-254, Sept. 2013.

HÖRTER, D.; DRESSMAN, J. B. Influence of physicochemical properties on dissolution of drugs in the gastrointestinal tract. **Advanced Drug Delivery Review**, v. 46, n. 1/3, p. 75-87, Mar. 2001.

HU, J., JOHNSTON, K.P., WILLIAMS, R.O. Spray freezing into liquid (SFL) particle engineering technology to enhance dissolution of poorly water soluble drugs: organic solvent versus organic/aqueous co-solvent systems. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 20, n. 3, p. 295–303, Nov. 2003.

_____. Nanoparticle engineering processes for enhancing the dissolution rates of poorly water soluble drugs. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, v. 30, n. 3, p. 233-245, Mar. 2004.

HUANG, LEE, YU. Mechanistic Approaches to Predicting Oral Drug Absorption. **The AAPS Journal**, v. 11, n. 2, p. 217-224, Jun. 2009.

IUPAC. **Compendium of Chemical Terminology**, 2nd ed. The “Gold Book”, 2006. Disponível em: <<http://goldbook.iupac.org/O04348.html>> Acesso em: 23 mar. 2014.

JACOBS, C.; KAYSER, O.; MÜLLER, R. H. Nanosuspensions as a new approach for the formulation for the poorly soluble drug tarazepide. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 196, n. 2, p. 161-164, Mar. 2000.

_____. Production and characterisation of mucoadhesive nanosuspensions for the formulation of bupravaquone. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 214, n. 1/2, p. 3-7, Feb. 2001.

JACOBS, C., MÜLLER, R.H. Production and characterization of a budesonide nanosuspension for pulmonary administration. **Pharmaceutical Research**, v. 19, n. 2, p. 189-194, Feb. 2002.

JAIN, N.; YALKOWSKY, S. H. Estimation of the aqueous solubility I: application to organic nonelectrolytes. **Journal Pharmaceutical Sciences**, v. 90, n. 2, p. 234-252, 2001.

JENSEN, D. **Inhaled furosemide e dyspnea**. 2013. Disponível em: <<http://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01851980>>. Acesso em: 23 mar. 2013.

JIA, L. et al. Effect of nanonization on absorption of 301029: *ex vivo* and *in vivo* pharmacokinetic correlations determined by liquid chromatography/mass spectrometry. **Pharmaceutical Research**, v. 19, n. 8, p. 1091-1096, Aug. 2002.

JINNO, J. et al. Effect of particle size reduction on dissolution and oral absorption of a poorly water-soluble drug, cilostazol, in beagle dogs. **Journal of Controlled Release**, v. 111, n. 1/2, p. 56-64, Mar. 2006.

JORGENSEN, W. L.; DUFFY, E. M. Prediction of drug solubility from structure. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 54, n. 3, p. 355-366, Mar. 2002.

JUHNKE, M.; MÄRTIN, D.; JOHN, E. Generation of wear during the production of drug nanosuspensions by wet media milling. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 81, n. 1, p. 214-222, May 2012.

JUNG, S. J. et al. Prediction of the permeability of drugs through study on quantitative structure-permeability relationship. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 41, n. 2, p. 469-475, May 2006.

JUNGHANNS, J. U.; MÜLLER, R. H. Nanocrystal technology, drug delivery and clinical application. **International Journal of Nanomedicine**, v. 3, n. 3, p. 295-310, Sept. 2008.

KAKRAN, M. et al. Fabrication of quercetin nanocrystals: Comparison of different methods **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 80, n. 1, p. 113-121, Jan. 2012.

KALLET, R. H. The role of inhaled opioids and furosemide for the treatment of dyspnea. **Respiratory Care**, v. 52, n. 7, p. 900-910, July, 2007.

KASSEM, M. A. et al. Nanosuspension as an ophthalmic delivery system for certain glucocorticoid drugs. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 340, n. 1/2, p. 126-133, Aug. 2007.

KAYSER, O. Formulation of amphotericin B as nanosuspension for oral administration. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 254, n. 1, p. 73-75, Mar. 2003.

KECK, C. M.; MÜLLER, R. H. Drug nanocrystals of poorly soluble drugs produced by high pressure homogenization. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 62, n. 1, p. 3-16, Jan. 2006.

KELLER, M., et al. Nebulizer nanosuspensions: important device and formulation interactions. **Respiratory Drug Delivery**, v. VIII, n. 1, p. 197-206, 2002.

KESISOGLOU, F.; PANMAI, S.; WU, Y. Application of nanoparticles in oral delivery of immediate release formulations. **Current Nanoscience**, v. 3, n. 2, p. 183-190, May 2007a.

_____. Nanosizing - oral formulation development and biopharmaceutical evaluation. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 59, n. 7, p. 631-644, July, 2007b.

KHARB, V. et al. Nanoparticle technology for delivery of poorly water-soluble drugs. **PharmTech**, 2006. Disponível em:

<<http://www.pharmtech.com/pharmtech/article/articleDetail.jsp?id=301463>>. Acesso em: 22 de maio de 2013.

KIM, S. H.; CHOI, Y. M. LEE, M. G. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of furosemide in protein-calorie malnutrition. **Journal of Pharmacokinetics and Biopharmaceutics**, v. 21, n. 1, p. 1-17, Feb. 1993.

KIM, J. S. et al. The suitability of an in situ perfusion model for permeability determinations: utility for BCS class I biowaiver requests. **Molecular Pharmaceutics**, v. 3, n. 6, p. 686-694, Nov./Dec. 2006.

KIM, S.; LEE, J. Effective polymeric dispersants for vacuum, convection and freeze drying of drug nanosuspensions. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 397, n. 1/2, p. 218-224, Sept. 2010.

KIPP, J. E. The role of solid nanoparticle technology in the parenteral delivery of poorly water-soluble drugs. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 284, n. 1/2, p.109-122, Oct 2004.

KOCBEK, P.; BAUMGARTNER, S.; KRISTL, J. Preparation and evaluation of nanosuspensions for enhancing the dissolution of poorly soluble drugs. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 312, n. 1/2, p. 179-186, April 2006.

KONDO, N. et al. Improved oral absorption of a poorly water-soluble drug, HO-221, by wet-bead milling producing particles in submicron region. **Chemical & Pharmaceutical Bulletin**, v. 41, n. 4, p. 737-740, April, 1993a.

_____. Pharmacokinetics of a micronized, poorly water-soluble drug, HO-221, in experimental animals. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**, v. 16, n. 8, p. 796-800, Aug. 1993b.

KUENTZ, M. et al. A strategy for preclinical formulation development using GastroPlusTM as pharmacokinetic simulation tool and a statistical screening design applied to a dog study. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 27, n. 1, p. 91-99, Jan. 2006.

KUMAR, M. P.; RAO, Y. M.; APTE, S. Improved bioavailability of albendazole following oral administration of nanosuspension in rats. **Current Nanoscience**, v. 3, n. 2, p. 191-194, May 2007.

_____. Formulation of nanosuspensions of albendazole for oral administration. **Current Nanoscience**, v. 4, n. 1, p. 53-58, Feb. 2008.

LABIRIS, N. R.; DOLOVICH, M. B. Pulmonary drug delivery. Part I: Physiological factors affecting therapeutic effectiveness of aerosolized medications. **British Journal of Clinical Pharmacology**, v. 56, n. 6, p. 588-599, Dec. 2003.

LAI, F. et al. Diclofenac nanosuspensions: influence of preparation procedure and crystal form on drug dissolution behaviour. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 373, n. 1/2, p. 124-132, May 2009.

LAI, F. Nanocrystals as tool to improve piroxicam dissolution rate in novel orally disintegrating tablets. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 79, n. 3, p. 552-558, Nov. 2011.

LANCASTER, C. U. S. **FDA licenses GastroPlus™**: simulations plus flagship software to aid government research projects. Jan. 2007. Disponível em: <<http://www.businesswire.com/news/home/20070109005584/en/U.S.-FDA-Licenses-GastroPlus-TM#.U074C1zeOT4>>. Acesso em: 22 de fevereiro de 2014.

LANGGUTH, P. et al. Nanosuspension formulations pharmacokinetic evaluation using spironolactone as model compound. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, v. 31, n. 3, p. 319-329, Mar. 2005.

LEE, J. Drug nano-and microparticles processed into solid dosage forms: physical properties. **Journal Pharmaceutical Sciences**, v. 92, n. 10, p. 2057-2068, Oct. 2003.

LEE, J. et al. Amphiphilic amino acid copolymers as stabilizers for the preparation of nanocrystal dispersion. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 24, n. 5, p. 441-449, April 2005.

LEE, J.; CHENG, Y. Critical freezing rate in freeze drying nanocrystal dispersions. **Journal of Controlled Release**, v. 111, n. 1/2, p. 185-192, Mar. 2006.

LEE, J.; CHOI, J. Y.; PARK, C. H. Characteristics of polymers enabling nanocomminution of water-insoluble drugs. **International Journal Pharmaceutics**, v. 355, n. 1/2, p. 328-336, May 2008.

LEE, S. H. et al. Nano spray drying: a novel method for preparing protein nanoparticles for protein therapy. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 403, n. 1/2, p. 192-200, Jan. 2011.

LENNERNAS, H. et al. Regional jejunal perfusion, a new in vivo approach to study oral drug absorption in man. **Pharmaceutical Research**, v. 9, n. 10, p. 1243-1251, Oct. 1992.

LENNERNAS, H. Human jejunal effective permeability and its correlation with preclinical drug absorption models. **The Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 49, 7, p. 627-638, July, 1997.

_____. Human intestinal permeability. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 87, n. 4, p. 403-410, April 1998.

LETELLIER, P.; MAYAFFRE, A.; TURMINE, M. Melting point depression of nanosolids: Nonextensive thermodynamics approach. **Physical Review B**, v. 76, n.4, p. 045428-1-045428-8, Jul. 2007.

LI, X. et al. Preparation of fenofibrate nanosuspension and study of its pharmacokinetic behavior in rats. **Drug development and industrial pharmacy**, v.

35, n. 7, p. 827-833, Jul. 2009.

LI, Y. et al. Co-administration of cisplatin and furosemide causes rapid and massive loss of cochlear hair cells in mice. **Neurotoxicity Research**, v. 20, n. 4, p. 307-319, Nov. 2011.

LIPKA, E.; AMIDON, G. Setting bioequivalence requirements for drug development based on preclinical data: optimizing oral drug delivery systems. **Journal of Controlled Release**, v. 62, n. 1/2, p. 41-49, Nov. 1999.

LIPINSKI, C. A. et al. Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 46, n. 1/3, p. 3-26, Mar. 2001.

LIPINSKI, C. A. Poor aqueous solubility - an industry wide problem in drug discovery. **American Pharmaceutical Reviews**, v. 5, n. 3, p. 82-85, 2002.

LIPINSKI, C. A. et al. Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 64, p. 4-17, Mar. 2012.

LIU, X.; TESTA, B.; FAHR, A. Lipophilicity and its relationship with passive drug permeation. **Pharmaceutical Research**, v. 28, n. 5, p. 962-977, May 2011.

LIU, X.; YANG, P.; JIANG, Q. Size effect on melting temperature of nanostructured drugs. **Materials Chemistry and Physics**, v. 103, n. 1, p. 1-4, May 2007.

LIVERSIDGE, G. G.; CONZENTINO, P. Drug particle size reduction for decreasing gastric irritancy and enhancing absorption of naproxen in rats. **International Journal Pharmaceutics**, v. 125, n. 2, p. 309-313, Oct. 1995.

LIVERSIDGE, G. G.; CUNDY, K. C. Particle size reduction for improvement of oral bioavailability of hydrophobic drugs. I. Absolute oral bioavailability of nanocrystalline danazol in beagle dogs. **International Journal Pharmaceutics**, v. 125, n. 1, p. 91-97, Oct. 1995.

LIVERSIDGE, G. G. Drug nanoparticles for improved drug delivery. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM OF CONTROLLED RELEASE OF BIOACTIVE MATERIALS, 23., 1996, Kyoto. **Annals...** Kyoto: [s.e.], 1996.

LOBÉNBERG, 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, n. 1, p. 3-12, July 2000.

LOUIS, B.; AGRAWAL, V. K.; PADMAKAR, V. K. Prediction of intrinsic solubility of generic drugs using MLR, ANN and SVM analyses **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 45, n. 9, p. 4018-4025, Sept. 2010.

LU, Y. et al. Development and evaluation of transferring-stabilized paclitaxel

nanocrystal formulation. **Journal of Controlled Release**, v. 176, n. 26, p. 76-85, Feb. 2014.

MANALLACK, D. T. et al. The significance of acid/base properties in drug discovery. **Chemical Society Reviews**, v. 42, n. 2, p. 485-496, Jan. 2013.

MARAKUL, B. et al. Precipitation-lyophilization-homogenization (PLH) for preparation of clarithromycin nanocrystals: influencing factors on physicochemical properties and stability. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 457, n. 1, p. 187-196, Nov. 2013.

MARCUS, Y. **The properties of solvents**. New York: Wiley, 1998.

MARTINEZ, M. N.; AMIDON, G. L. A mechanistic approach to understanding the factors affecting drug absorption: a review of fundamentals. **Journal of Clinical Pharmacology**, v. 42, n. 6, p. 620-643, June 2002.

MATSON D. W. et al. Rapid expansion of supercritical fluid solutions: solute formation of powders, thin films, and fibers. **Industrial & Engineering Chemistry Research**, v. 26, n. 11, p. 2298-2306, Nov. 1987.

MATSUDA, Y.; TATSUMI, E. Physicochemical characterization of furosemide modifications. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 60, n. 1, p. 11-26, April 1990.

MAULUDIN, R.; MÜLLER, R.H.; KECK, C.M. Development of an oral rutin nanocrystal formulation. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 370, n. 1/2, p. 202-209, Mar. 2009.

MERISKO-LIVERSIDGE, E. Formulation and antitumor activity evaluation of nanocrystalline suspensions of poorly soluble anticancer drugs. **Pharmaceutical Research**, v. 13, n. 2, p. 272-278, Feb. 1996.

MERISKO-LIVERSIDGE, E.; LIVERSIDGE, G. G.; COOPER, E. R. Nanosizing: a formulation approach for poorly-water-soluble compounds. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 18, n. 2, p. 113-120, Feb. 2003.

MERISKO-LIVERSIDGE, E.; MCGURK, S. L.; LIVERSIDGE, G. G. Insulin nanoparticles: a novel formulation approach for poorly water soluble Zn-insulin. **Pharmaceutical Research**, v. 21, n. 9, p. 1545-1553, Sept. 2004.

MERKUS, H. G. **Particle size measurements**: fundamentals, practice, quality. New York: Springer, 2009.

MILLER, J. M.; DAHAN, A. Predicting the solubility–permeability interplay when using cyclodextrins in solubility-enabling formulations: Model validation. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 430, n. 1/2, p. 388-391, July 2012.

MILLER, N. et al. Development of a physiologically based pharmacokinetic (PBPK) model for predicting position and disposition following inhaled and intranasal

administration. **Respiratory Drug Delivery**, v. 2, p. 579-584, 2010.

MISHRAA, P. R. et al. Production and characterization of hesperetin nanosuspensions for dermal delivery. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 371, 1/2, p.182–189, April 2009.

MISSION IR. **FDA adds licenses of simulations plus (SPL) GastroPlus Software**. Oct. 2013. Disponível em: <<http://missionir.com/blog/small-cap-news/fda-adds-licenses-of-simulations-plus-slp-gastroplus-software/>>. Acesso em: 22 de fevereiro de 2014.

MITRI, K. et al. Lutein nanocrystals as antioxidant formulation for oral and dermal delivery. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 420, n. 1, p. 141-146, Nov. 2011.

MÖLLER, W. Deposition, retention, and translocation of ultrafine particles from the central airways and lung periphery. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, v. 117, n. 4, p. 426-432, Feb. 2008.

MOU, D. et al. Potent dried drug nanosuspension for oral bioavailability enhancement of poorly soluble drugs pH-dependent solubility. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 413, n. 1-2, p. 237-224, Jul. 2011.

MOSHARRAF, M.; NYSTRÖM, C. The effect of particle size and shape on the surface specific dissolution rate of micro-sized practically insoluble drugs. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 122, n. 1/2, p. 35-47, Aug. 1995.

MÖSCHWITZER, J. et al. Development of an intravenously injectable chemically stable aqueous omeprazole formulation using nanosuspension technology. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 58, n. 3, p. 615-619, Nov. 2004.

MÖSCHWITZER, J., LEMKE, A. **Method for carefully producing ultrafine particle suspensions and ultrafine particles and use thereof**: EP000001868574B1, 2005.

MÖSCHWITZER, J.; MÜLLER, R. H. Spray coated pellets as carrier system for mucoadhesive drug nanocrystals. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 62, n. 3, p. 282-287, April 2006.

MÖSCHWITZER, J. Drug nanocrystal in the commercial pharmaceutical development process. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 453, n. 1, p. 142-156, Aug. 2013.

MOTZ, S. A. **Combined assessment of dissolution and epithelial permeability of solid oral dosage forms**. 2007. 151 f. (Thesis) - Universität Saarland, Saarbrücken, 2007. Disponível em: <http://scidok.sulb.uni-saarland.de/volltexte/2007/1023/pdf/dissertation_Stephan_Motz.pdf>. Acesso em: 23 mar. 2014.

MOU, D. et al. Potent dried drug nanosuspensions for oral bioavailability

enhancement of poorly soluble drugs with pH-dependent solubility. **International journal of pharmaceutics**, v. 413, n. 1, p.237-244, Jul. 2011.

MOUTON, J. W. et al. Pharmacokinetics of itraconazole and hydroxyitraconazole in healthy subjects after single and multiple doses of a novel formulation. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 50, n. 12, p. 4096-4102, Dec. 2006.

MÜLLER, R. H.; BÖHM, B. H. L. Nanosuspensions. In: MÜLLER, R. H.; BENITA, S.; BÖHM, B. H. L. (Eds.). **Emulsions and nanosuspensions for the formulation of poorly soluble drugs**. Stuttgart: Medpharm Scientific, 1998. p. 149-174.

MÜLLER, R. H.; BÖHM, B. H. L.; GRAU, M. J. Nanosuspensions – formulations for poorly soluble drugs with poor bioavailability – 1st communication: production and properties. **Pharmaceutical Industries**, v. 61, p. 74-78, 1999a.

_____. Nanosuspensions – formulations for poorly soluble drugs with poor bioavailability – 2nd communication: stability, biopharmaceutical aspects, possible drug forms and registration aspects. **Pharmaceutical Industries**, v. 61, 175-178, 1999b.

_____. Nanosuspensions: a formulation approach for poorly soluble and poorly bioavailable drug. In: WISE, D. L. (Ed.). **Handbook of pharmaceutical controlled release technology**. New York: Marcel Dekker, Inc., 2000a. p. 345-357.

MÜLLER, R. H.; GOHLA, S.; KECK, C. M. State of the art of nanocrystals - Special features, production, nanotoxicology aspects and intracellular delivery. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 78, n. 1, p. 1-9, May 2011.

MÜLLER, R. H.; JACOBS, C.; KAYSER, O. Nanosuspensions for the formulation of poorly soluble drugs. In: NIELLOUD, F.; MARTI-MESTRES, G. (Eds.). **Pharmaceutical emulsions and suspensions, drugs and the pharmaceutical sciences**. New York: Marcel Dekker, Inc., 2000b. v. 105, p. 383-407.

_____. Nanosuspensions as particulate drug formulations in therapy—rationale for development and what we can expect for the future. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 47, n. 1, p. 3-19, Mar. 2001.

_____. DissoCubes - a novel formulation for poorly soluble and poorly bioavailable drugs. In: RATHBORN, M. J.; HADGRAFT, J.; ROBERTS, M. S. (Eds.). **Modified-release drug delivery technology**. Drugs and the pharmaceutical sciences, New York: Marcel Dekker, Inc., 2003. v. 126, p. 135-149.

MÜLLER, R. H.; JACOBS, C. Buparvaquone mucoadhesive nanosuspension: preparation, optimisation and long-term stability. **International Journal Pharmaceutics**, v. 237, n. 1/2, p. 151-161, April 2002.

MÜLLER, R. H.; KECK, C. M. **Improvement of delivery & solubility of poorly soluble drugs by nanonisation**. Petersberg: LTS Academy, 2007. p. 12-17.

_____. Challenges and solutions for the delivery of biotech drugs—a review of drug

nanocrystal technology and lipid nanoparticles. **Journal of Biotechnology**, v. 113, n. 1/3, p. 151-170, Sept. 2004.

MÜLLER, R. H.; MÖSCHWITZER, J.; BUSHRAB, F. N. Manufacturing of nanoparticles by milling and homogenization techniques. In: GUPTA, R. B.; KOMPELLA, U. B. (Eds.). **Nanoparticle technology for drug delivery, drugs and the pharmaceutical sciences**. New York: Taylor & Francis Group, LLC, 2006, v. 159, p. 21-51.

MÜLLER, R. H.; PETERS, K. Nanosuspensions for the formulation of poorly soluble drugs I. Preparation by a size-reduction technique. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 160, n. 2, p. 229-237, Jan. 1998.

MYRDAL, P. B.; YALKOWSKY, S. H. Solubilization of drugs in aqueous media. In: _____. **Encyclopedia of pharmaceutical technology**. 3 ed. New York: Informa Health, 2007. cap. 239, p. 3311-3333.

NA, G. C. et al. Physical stability of ethyl diatrizoate nanocrystalline suspension in steam sterilization. **Pharmaceutical Research**, v. 16, n. 4, p. 569-574, April 1999.

NAKARANI, M., et al. Cyclosporine nanosuspension: formulation, characterization and in vivo comparison with a marketed formulation. **Scientia pharmaceutica**, v. 78, n.2, p. 345-361, Jan. 2010.

NANOSYSTEMS Llc. Gary George Liversidge et al. **Formulations of nanoparticle naproxen tablets**: WO 1998035666. World Patent, 11 Feb.1998, 20 Aug. 1998.

NASEEM, A. et al. Effects of oxygen plasma treatment on the surface wettability and dissolution of furosemide compacts. **The Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 55, n. 11, p. 1473-1478, Nov. 2003.

NIELSEN, L. H. et al. Preparation of an amorphous sodium furosemide salt improves solubility and dissolution rate and leads to a faster T_{max} after oral dosing to rats. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, 85, n. 3, pt. B, p. 942-951, Nov. 2013.

NISHINO, T. et al. Inhaled furosemide greatly alleviates the sensation of experimentally induced dyspnea. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, v. 161, n. 6, p. 1963-1967, June 2000.

NOYES, A. A.; WHITNEY, W. R. The rate of solution of solid substances in their own solutions. **Journal of the American Chemical Society**, v. 19, n. 12, p. 930-934, 1897.

OBERDORSTER, G.; FERIN, J. LEHNERT, B. E. Correlation between particle size, in vivo particle persistence, and lung injury. **Environmental Health Perspectives**, v. 102, sup. 5, p. 173-179, Oct. 1994.

OBERDORSTER, G.; OBERDORSTER, E.; OBERDORSTER, J. Nanotoxicology: an emerging discipline evolving from studies of ultrafine particles. **Environmental Health Perspectives**, 113, n. 7, p. 823-839, July, 2005.

OKUMU, A.; DiMASO, M.; LÖBENBERG, R. Computer simulations using GastroPlus™ to justify a biowaiver for etoricoxib oral drug products, v. 72, n. 1, p. 91-98, May. 2009.

ONG, K. C. et al. Effects of inhaled furosemide on exertional dyspnea in chronic obstructive pulmonary disease. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, v. 169, n. 9, p. 1028-1033, May 2004.

OSTRANDER, K. D.; BOSCH, H. W.; BONDANZA, D. M. An in-vitro assessment of a NanoCrystal™ beclomethasone dipropionate colloidal dispersion via ultrasonic nebulization. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 48, n. 207-215, 1999.

PACIFICI, G. M. Clinical pharmacology of furosemide in neonates: a review. **Pharmaceutics**, v. 6, n. 9, p. 1094-1129, Sept. 2013.

PADE, V.; STAVCHANSKY, S. Estimation of the relative contribution of the transcellular and paracellular pathway to the transport of passively absorbed drugs in Caco-2 cell culture model. **Pharmaceutical Research**, v. 14, n. 9, p. 1210–1215, Sept. 1997.

PARDEIKE, J.; MÜLLER, R. H. Nanosuspensions: a promising formulation for the new phospholipase A2 inhibitor PX-18. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 391, n. 1/2, p. 322-329, May 2010.

PARK, S. H. et al. Characterization of human insulin microcrystals and their absorption enhancement by protease inhibitors in rat lungs. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 339, n. 1/2, 205-212, July 2007.

PATEL, R. C.; KERALIYA, R. A. Commonsensical predetermine dissolution time of furosemide achieve by preparing inclusion complex. **International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**, v. 2, sup. 3, p. 142, 2010.

PATHAK, Y.; THASSU, D. **Drug delivery nanoparticles formulation and characterization**. New York: Informa Healthcare, 2009.

PATRAVALE, V. B.; DATE, A. A.; KULKARNI, R. M. Nanosuspensions: a promising drug delivery strategy. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 56, n. 7, p. 827-840, July 2004.

PATTON, J. S.; BYRON, P. R. Inhaling medicines: delivering drugs to the body through the lungs. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 6, p. 67-74, Jan. 2007.

PENDINO, J. C. et al. Effect of inhaled furosemide in acute asthma. **The Journal of Asthma**, v. 35, n. 1, p. 89-93, 1998.

PERIOLI, L.; D'ALBA, G.; PAGANO, C. New oral solid dosage form for furosemide oral administration. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 80, n. 3, p. 621-629, April 2012.

PETERS, K. et al. Preparation of a clofazimine nanosuspension for intravenous use and evaluation of its therapeutic efficacy in murine mycobacterium avium infection. **The Journal of Antimicrobiol Chemotheraphy**, v. 45, n. 1, p. 77-83, Jan. 2000.

PHARMACIA & Upjohn Company. Royal J. Hansell. **Laboratory scale milling process**: US 6814319 B2. 5 Dec. 2001, 9 Nov. 2004.

PRANDOTA, J.; WITKOWSKA, M. Pharmacokinetics and metabolism of furosemide. **European Journal of Drug Metabolism and Pharmacokinetics**, n. 4, p. 177-181, 1976.

RABINOW, B. E. Nanosuspensions in drug delivery. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 3, n. 9, p. 785-796, Sept. 2004.

RABINOW, B. E. et al. Formulation of water-insoluble antineoplastic agents as nanosuspensions using NANOEDGE formulation technology. **Proceedings of the American Association for Cancer Research**, v. 45, 2004.

RABINOW, B. E.; CHAUBAL, M. V. Injectable nanoparticles for efficient drug delivery. In: GUPTA, R. B.; KOMPELLA, U. B. (Eds.). **Nanoparticle technology for drug delivery, drugs and the pharmaceutical sciences**. New York: Taylor & Francis Group, LLC, 2006. v. 159, p. 199-229.

RABINOW, B. et al. Itraconazole IV nanosuspension enhances efficacy through altered pharmacokinetics in the rat. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 339, n. 1/2, p. 251-260, July 2007.

RADTKE, M. Nanopure: pure drug nanoparticles for the formulation of poorly soluble drugs. **New Drugs**, v. 3, p. 62-68, 2001

RAO, G. C. S. et al. Nanosuspensions as the most promising approach in nanoparticulate drug delivery systems. **Die Pharmazie**, v. 59, n. 1, p. 5-9, Jan. 2004.

REGE, B. D. et al. Effect of common excipients on Caco-2 transport of low-permeability drugs. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 90, n. 11, p. 1776-1786, Nov. 2001.

ROGUEDA, P. G.; TRAINI, D. The nanoscale in pulmonary delivery. Part 1: deposition, fate, toxicology and effects. **Expert Opinion on Drug Delivery**, v. 4, n. 6, p. 595-606, Nov. 2007.

SADIGHI, A. et al. Mathematical modelling of the transport of hydroxypropyl- β -cyclodextrin inclusion complexes of ranitidine hydrochloride and furosemide loaded chitosan nanoparticles across a Caco-2 cell monolayer. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 422, n. 1-2, p.479-488, Jan. 2012.

SAHNI, J.; PHELPS, S. J. Nebulized furosemide in the treatment of bronchopulmonary dysplasia in preterm infants. **The Journal of Pediatric Pharmacology and Therapeutics**, v. 16, n. 1, p. 14-22, Jan./Mar. 2011.

SALAZAR, J. et al. Process optimization of a novel production method for nanosuspensions using design of experiments (DoE). **International Journal of Pharmaceutics**, v. 420, n. 2, p. 395-403, Nov. 2011.

_____. Nanocrystals: Comparison of the size reduction effectiveness of a novel combinative method with conventional top-down approaches. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 81, n. 1, p. 82-90, May 2012.

SALAZAR, J.; MÖSCHWITZER, J. P.; MÜLLER, R. H. Performance comparison of two novel combinative particle size reduction technologies. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 102, n. 5, p. 1636-1649, May 2013.

SALAZAR, J.; MÜLLER, R. H.; MÖSCHWITZER, J. P. Application of the combinative particle size reduction technology H 42 to produce fast dissolving glibenclamide tablets. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 49, n. 4, p. 565-577, July 2013.

SANDOZ Ltd. Peter Gassmann; Heinz Sucker. **Improvements in pharmaceutical compositions**: EP 0580690 A1. EP 19920908795, 16 April. 1992, 2 Feb. 1994.

SAVJANI, K.T; GAJJAR, A. K; SAVJANI, J. K. Drug Solubility: Importance and Enhancement Techniques. **International Scholarly Research Network Pharmaceutics**, v. 2012, p. 1-10, 2012.

SCHEUCH, G. et al. Clinical perspectives on pulmonary systemic and macromolecular delivery. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 58, n. 9/10, p. 996-1008, Oct. 2006.

SCHMITZ, M.; JOHNSON, S. B.; SANTI, P. A. Kanamycin-furosemide ototoxicity in the mouse cochlea: A 3-dimensional analysis. [online]. **Otolaryngology - Head and Neck Surgery**, 8 p., Jan. 2014.

SCHÖLER, N. et al. Atovaquone nanosuspensions show excellent therapeutic effect in a new murine model of reactivated toxoplasmosis. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 45, n. 6, p. 1771-1779, June 2001.

SCHOLZ, P. et al. ARTcrystal[®] process for industrial nanocrystal production - Optimization of the ART MICCRA pre-milling step. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 46, n. 1/2, p. 388-395, April 2014.

SHAWAHNA, R.; RAHMAN, N. U. Evaluation of the use of partition coefficients and molecular surface properties as predictors of drug absorption: a provisional biopharmaceutical classification of the list of national essential medicines of Pakistan. **DARU**, v. 19, n. 2, p. 83-99, 2011.

SHEGOKAR, R.; MÜLLER, R. H. Nanocrystals: industrially feasible multifunctional formulation technology for poorly soluble actives. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 399, n. 1/2, p. 129-139, Oct. 2010.

SHIN, S. C.; KIM, J. Physicochemical characterization of solid dispersion of furosemide with TPGS. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 251, n. 1/2, p. 79-84, Jan. 2003.

SIEPMANN, J.; SIEPMANN, F. Mathematical modeling of drug dissolution. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 453, n. 1, p. 12-24, Aug. 2013.

SIERRA-JOHNSON, J. Inhaled furosemide: a whole new mechanism of action. **Medical Hypotheses**, v. 58, n. 2, p. 529-530, June 2002.

SIGFRIDSSON, K. et al. A formulation comparison, using a solution and different nanosuspensions of a poorly soluble compound. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 67, n. 2, p. 540-547, Sept. 2007

_____. A formulation comparison between micro-and nanosuspensions: the importance of particle size for absorption of a model compound, following repeated oral administration to rats during early development. **Drug development and industrial pharmacy**, v.37, n. 2, p. 185-192, Feb. 2011.

SILVA, R. C. et al. Thermal behavior of furosemide. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, v. 111, n. 3, p. 1933-1937, Mar. 2011.

SILVA, P. **Farmacologia**. 4. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1994. p. 697.

SINGHAL, D.; CURATOLO, W. Drug polymorphism and dosage form design: a practical perspective. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 56, n. 3, p. 335-347, Feb. 2004.

SMITH, H. **ICRP Publication 66**: human respiratory tract model for radiological protection. London: Pergamon, 1995.

SOLYMOSIA, E. A. et al. Chloride transport-driven alveolar fluid secretion is a major contributor to cardiogenic lung edema. **Proceedings of the National Academic of Sciences of the United States of American**, v. 110, n. 25, p. E2308-E2316, June, 2013.

SPAMER, E. et al. Characterization of the complexes of furosemide with 2-hydroxypropyl- β -cyclodextrin and sulfobutyl ether-7- β -cyclodextrin. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 16, n.4-5, p.247-253, Sep, 2002.

SPRICIGO, R. et al. Obtenção e avaliação de complexos de inclusão de furosemida com β -ciclodextrina e hidroxipropil- β -ciclodextrina: efeitos sobre as propriedades de dissolução do fármaco. **Latin American Journal of Pharmacy**, v. 27, n. 5, p. 645-653, 2008.

STEGEMANN, S. et al. When poor solubility becomes an issue: from early stage to

proof of concept. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 31, n. 5, p. 249-261, Aug. 2007.

STERLING Winthrop Inc. Kenneth C. Cundy; Gary G. Liversidge; Christopher P. Phillips. **Method to reduce particle size growth during lyophilization**: US 502401 A. World Patent, 9 Dec. 1992.

SUN, J. et al. Effect of particle size on solubility, dissolution rate and oral bioavailability: evaluation using coenzyme Q10 as naked nanocrystals. **International Journal of Nanomedicine**, v. 7, p. 5733-5744, Nov. 2012.

SWARBRICK, J.; RUBINO, J. T.; RUBINO, O. P. Coarse Dispersion In: REMINGTON: the science and practice of pharmacy. 20. ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2000. p. 316-334, il.

SWEETMAN, S. C. **Martindale**: the complete drug reference. London: Pharmaceutical Press, 2004.

TAKATSUKA, T. et al. Nanosizing of poorly water soluble compounds using rotation/revolution mixer. **Chemical & Pharmaceutical Bulletin**, v. 57, n. 10, p. 1061-1067, Oct. 2009.

TEERANACHAIDEEKUL, V. et al. Development of ascorbyl palmitate nanocrystals applying the nanosuspension technology. **International journal of Pharmaceutics**, v. 354, n.1, p. 227-234, Apr. 2008.

TEMTEM, M.; NEVES, F.; WINTERS, C. Bridging api manufacturing and formulation through particle design. **European Industrial Pharmacy**, v. 17, p. 13-17, June 2013.

THERAPEUTIC SYSTEMS RESEARCH LABORATORIES **BCS Classification System**. Disponível em: <<http://166.78.14.201/tsrlinc.com/services/bcs/results.cfm>>. Acesso em: 23 mar. 2013.

THORNELOE, K.S. et al. An Orally Active TRPV4 Channel Blocker Prevents and Resolves Pulmonary Edema Induced by Heart Failure. **Science Translational Medicine**, v.4, n. 159, p.148-159, Nov. 2012.

TRASI, N. S. Investigating the effect of dehydration conditions on the compactability of glucose. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 406, n. 1/2, p. 55-61, Mar. 2011.

U. S. FOOD and Drug Administration. **Orange book**: approved drug products with therapeutic equivalence evaluations. 2014. Disponível em: <<http://www.accessdata.fda.gov/scripts/cder/ob/default.cfm>>. Acesso em: 06 jan. 2014.

_____. **Guidance for industry**: waiver of in vivo bioavailability and bioequivalence studies for immediate-release solid oral dosage forms based on a biopharmaceutics classification system. 2000. Disponível em: <<http://www.fda.gov/downloads/Drugs/.../Guidances/ucm070246.pdf>>. Acesso em:

06 jan. 2014.

_____. **Considering whether an FDA-regulated product involves the application of nanotechnology:** guidance for industry. 2011. Disponível em: <<http://www.fda.gov/RegulatoryInformation/Guidances/ucm257698.htm>>. Acesso em: 06 jan. 2014.

_____. **Draft guidance for industry:** safety of nanomaterials in cosmetic products. 2012. Disponível em: <<http://www.fda.gov/Cosmetics/GuidanceRegulation/GuidanceDocuments/ucm300886.htm>>. Acesso: 06 jan. 2014.

UJWAL, N. B. et al. Lung epithelial permeability and inhaled furosemide: added dimensions in asthmatics. **Annals of Nuclear Medicine**, v. 23, n. 6, p. 549–557, Aug. 2009.

UNITED STATES. Department of Health & Human Services. Food and Drug Administration. Center for Drug Evaluation and Research. **Guidance for industry: waiver of *in vivo* bioavailability and bioequivalence studies for immediate release solid oral forms based on a biopharmaceutics classifications system** Rockville: FDA, 2000. P. 1-13. Disponível em: <<http://www.fda.gov/downloads/Drugs/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/ucm070246.pdf>>. Acesso em: 20 jun. 2013.

United States Pharmacopeia and National Formulary (USP 36-NF 32). v. 2. Rockville, MD: United States Pharmacopeia Convention; 2013.

VAHEDI, H. S. M. et al. Effect of nebulized furosemide in acute treatment of patients with chronic obstructive pulmonary disease exacerbation: a randomized controlled clinical trial. **Respiratory Care**, v. 58, n. 11, p. 1873-1877, Nov. 2013.

VAN DE WATERBEEMD, H.; TESTA, B. Drug bioavailability: **estimation of solubility, permeability, absorption and bioavailability**. London: John Wiley & Sons, 2009.

VAN EERDENBRUGH, B., MOOTER G. V., AUGUSTIJNS, P. Top-down production of drug nanocrystals: nanosuspension stabilization, miniaturization and transformation into solid products. **International journal of pharmaceutics**, v. 364, n.1, p. 64-75, Nov. 2008.

VAN EERDENBRUGH, B. et al. Characterization of physico-chemical properties and pharmaceutical performance of sucrose co-freeze-dried solid nanoparticulate powders of the anti-HIV agent loviride prepared by media milling. **International Journal Pharmaceutics**, v. 338, n. 1/2, p. 198-206, June 2007.

VAN EERDENBRUGH, B. et al. Drying of crystalline drug nanosuspensions-the importance of surface hydrophobicity on dissolution behavior upon redispersion. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 35, n. 1/2, p. 127-135, 2008a.

_____. Alternative matrix formers for nanosuspension solidification: dissolution

performance and X-ray microanalysis as an evaluation tool for powder dispersion. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 35, n. 4, p. 344-353, Nov. 2008b.

_____. Drying of crystalline drug nanosuspensions - the importance of surface hydrophobicity on dissolution behavior upon redispersion. **European Journal of Pharmaceutical Science**, v. 35, n. 1/2, p. 127-135, Sept. 2008c.

_____. Microcrystalline cellulose, a useful alternative for sucrose as a matrix former during freeze-drying of drug nanosuspensions—a case study with itraconazole. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 70, n. 2, p. 590-596, Oct. 2008d.

_____. A Screening Study of Surface Stabilization in the Production of Drug Nanocrystals. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 98, n. 6, p. 2091-2103, June 2009a.

_____. Scaling down of drug nanosuspension production: process aspects and physico-chemical characterization. **AAPS Pharm SciTech**, v. 10, n. 1, p. 44-53, Mar. 2009b.

VAN WART, S. A. et al. Population-based meta-analysis of furosemide pharmacokinetics. **Biopharmaceutics & Drug Disposition**, v. 35, n. 2, p. 119-133, Mar. 2013.

VEBER, D. F. Molecular properties that influence the oral bioavailability of drug candidates. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 45, n.12, p. 2615-2623, June 2002.

VEHRING, R. Red-excitation dispersive raman spectroscopy is a suitable technique for solid state analysis of respirable pharmaceutical powders. **Applied Spectroscopy**, v. 59, n. 3, p. 286-292, Mar. 2005.

VEHRING, R. et al. High-sensitivity analysis of crystallinity in respirable powders using low frequency shift-raman spectroscopy. **Respiratory Drug Delivery**, v. 2, p. 641-644, 2012.

VERGOTE, G. J. et al. An oral controlled release matrix pellet formulation containing nanocrystalline ketoprofen. **International Journal Pharmaceutics**, v. 219, n. 1/2, p. 81-87, May 2001.

_____. In vivo evaluation of matrix pellets containing nanocrystalline ketoprofen. **International Journal Pharmaceutics**, v. 240, n. 1/2, p. 79-84, June 2002.

VERMA, S. et al. Quality by design approach to understand the process of nanosuspension preparation. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 377, n. 1/2, p. 185-198, July 2009.

VOGT, M., et al. Cogrounding enhances the oral bioavailability of EMD 57033, a poorly water soluble drug, in dogs. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v.68, n.2, p.338-345, Feb. 2008.

VÖLGYI, G. et al. Study of pH-dependent solubility of organic bases. Revisit of Handerson-Hasselbach relationship. **Analytica Chemica Acta**, v. 673, n. 1, p. 40-46, July 2010.

WAARD, H.; HINRICHS, W. L.; FRIJLINK, H. W. A novel bottom-up process to produce drug nanocrystals: controlled crystallization during freeze-drying. **Journal of Controlled Release**, v. 128, n. 2, p. 179-183, June 2008.

WAHLSTROM, J. L. et al. Pharmacokinetic evaluation of a 1,3-dicyclohexylurea nanosuspension formulation to support early efficacy assessment. **Nanoscale Research Letters**, v. 2, n. 6, p. 291-296, 2007.

WALTERS, W. P. et al. What do medicinal chemists actually make? A 50-year retrospective. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 54, n. 19, p. 6405–6416, Oct. 2011.

WATSON, M. Furosemide. **Journal of Exotic Pet Medicine**, v. 20, n. 1, p.60-63, Jan. 2011.

WARD , G. H; YALKOWSKY, S. H. Studies in Phlebitis. VI: Dilution-induced precipitatio of amiodarone HCL. **Journal of Parenteral Science and Technology** v. 47, n. 69, p. 161-165, Jul-Aug. 1993.

WEI, H. et al. Physicochemical characterization of five glyburide powders: a BCS based approach to predict oral absorption. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 69, n. 3, p. 1046-1056, Aug. 2008.

WIEDMANN, T.S., DECASTRO, L., WOOD, R.W. Nebulization of nanocrystalsTM: production of a respirable solid-in-liquid-in-air colloidal dispersion. **Pharmaceutical Research**, v. 14, p. 112-116, 1997.

WINIWARTER, S. et al. Correlation of human jejunal permeability (*in vivo*) of drugs with experimentally and theoretically derived parameters. A multivariate data analysis approach. **Journal of Medical Chemistry**, v. 41, n. 25, p. 4939-4949, Dec. 1998.

_____. Hydrogen bonding descriptors in the prediction of human *in vivo* intestinal permeability. **Journal of Molecular Graphics & Modelling**, v. 21, n. 4, p. 273-287, Jan. 2003.

WORLD HEALTH ORGANIZATION - WHO. **Proposal to waive in vivo bioequivalence requirements for WHO Model List of Essential Medicines immediate-release, solid oral dosage forms**. 40th Report, Annex 8 of WHO Expert Committee on Specifications for Pharmaceutical Preparations. 2006. Technical Report Series, n. 937.

WORLD HEALTH ORGANIZATION - WHO. **A Global Brief on Hypertension**. 2013. Disponível em: <http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/79059/1/WHO_DCO_WHD_2013.2_eng.pdf?ua=1> Acesso em: 23 mar. 2014.

WORLD HEALTH ORGANIZATION - WHO. **WHO model list of essential medicines**.

2013. Disponível em: <http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/93142/1/EML_18_eng.pdf?ua=1>. Acesso em: 23 mar. 2014.

WU, Y. et al. The role of biopharmaceutics in the development of a clinical nanoparticle formulation of MK-0869: a Beagle dog model predicts improved bioavailability and diminished food effect on absorption in human. **International journal of pharmaceutics**, v. 285, n.1, p.135-146, Nov. 2004.

XIONG, R. et al. Preparation and characterization of intravenously injectable nimodipine nanosuspension. **International Journal Pharmaceutics**, v. 350, n. 1/2, p. 338-343, Feb. 2008.

YAMASHITA, S. et al. Optimized conditions for prediction of intestinal drug permeability using Caco-2 cells. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 10, n. 3, p. 195-204, May 2000.

YEE, S. In vitro Permeability Across Caco-2 Cells (Colonic) Can Predict In Vivo (Small Intestinal) Absorption in Man - Fact or Myth. **Pharmaceutical Research**, v. 14, n. 6, p. 763-766, June 1997.

YOUAM, I.; MUROWCHICKB, J. B.; YOUANA, B. C. Entrapment and release kinetics of furosemide from pegylated nanocarriers. **Colloids and Surfaces B. Biointerfaces**, v. 94, p. 133-142, June 2012.

YU, L. X. et al. Biopharmaceutics classification system: the scientific basis for biowaiver extension. **Pharmaceutical Research**, v. 18, n. 7, 921-925, July 2002.

YU, L. X. et al. Feasibility studies of utilizing disk intrinsic dissolution rate to classify drugs. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 270, n. 1/2, p. 221-227, Feb. 2004.

YUMINOKI, K., et al. Nano-pulverization of poorly water soluble compounds with low melting points by a rotation/revolution pulverizer. **Die Pharmazie**, v.67, n. 8, p. 681-686, 2012.

ZHANG, D. et al. Preparation of azithromycin nanosuspensions by high pressure homogenization and its physicochemical characteristics studies. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, v. 33, n. 5, p. 569-575, May 2007.

ZHANG, J. et al. Enhanced bioavailability after oral and pulmonary administration of baicalein nanocrystal. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 420, n. 1, p. 180-188, Nov. 2011.

ZHAO, Y. H. et al. Evaluation of human intestinal absorption data and subsequent derivation of a quantitative structure-activity relationship (QSAR) with the Abraham descriptors. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 90, n. 6, p. 749-784, June 2001.

ZORDI, N. et al. Applications of supercriticalfluids to enhance the dissolution behaviors of Furosemide by generation of microparticles and solid dispersions.

European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutcs, v. 81, n. 1, p. 131-141, May 2012.

8. APÊNDICES

Apêndice A – Fármacos desenvolvidos na forma de nanocrystal utilizando as tecnologias de moagem à alta energia, homogeneização à alta energia e suas combinações.

Fármaco (Concentração %p/p)	Método	Controle (Tamanho médio de partícula)	Produto final (Tamanho médio de partícula)	Estabilizantes (Concentração %p/p em relação ao fármaco)	Avaliações	Resultados	Referências
1,3-Diciclohexil uréia (1%)	ME	NI	Nanossuspensão Intravenosa Subcutânea	Cremophor EL® (100%)	<i>Polarized intensity differential scattering</i> DRX TG/DTG Estudo farmacocinético em ratos.	Os nanocristais preservaram as características cristalinas do fármaco. A infusão de nanossuspensões manteve níveis no plasma três vezes maiores em relação ao controle.	WAHLSTROM et al., 2007; CHIANG et al., 2007, 2011.
301029	ME	Micropartículas (7 µm)	Nanossuspensão (280 nm)	Poloxamer 407® (1,4% em relação à nanossuspensão)	DL Estudo de permeabilidade em células Caco-2. Estudo farmacocinético <i>in vivo</i> em ratos.	As nanossuspensões apresentaram aumento em 4 vezes na permeabilidade em relação ao controle. Diminuição significativa no T _{máx} , aumento de 4 vezes no C _{máx} e AUC em relação ao controle.	JIA et al., 2002.
Albendazol (4%)	HP	NI	Nanocristais liofilizados (385,7–576,2 nm)	Poloxamer 188® (12,5%) Lauril sulfato de sódio (12,5%) Polissorbato 80® (12,5%) Poloxamer 188® e Lauril sulfato de sódio (12,5%) Poloxamer 188® e Polissorbato 80 (12,5%) Polissorbato e lauril sulfato de sódio (12,5%)	PCS Potencial zeta Estudo farmacocinético <i>in vivo</i> em ratos.	As nanossuspensões apresentaram valores de potencial zeta entre -23,5 e -40,5 mV. Em relação aos estudos farmacocinéticos, as nanossuspensões apresentaram biodisponibilidade de 2,14 a 2,96 vezes maior após administração oral, em relação à suspensão controle. Adicionalmente, as liofilizações realizadas com os crioprotetores manitol e sacarose (25–250 %p/p em relação ao fármaco) não apresentaram aglomerações na presença de hidroxipropil metilcelulose e carboxipol® (12,5 e 2,5 %p/p, respectivamente, em relação ao fármaco).	KUMAR et al., 2008.
Anfotericina B	HP	NI	Nanossuspensão (528nm)	Polissorbato 80 (0,5%), Pluronic F68® (0,25%) e Colato de sódio (0,05% em relação à nanossuspensão)	PCS DL Estudo de estabilidade do tamanho de partícula por 21 dias a 20°C.	O potencial zeta e o tamanho de partícula das nanossuspensões mantiveram-se estáveis após 21 dias de avaliação.	KAYSER et al., 2003.
Apigenina (5%)	CT	Micropartículas	Nanossuspensão (413nm)	Plantacare 2000® (20%)	PCS DL DRX Microscopia ótica Potencial zeta Solubilidade de saturação Avaliação <i>in vitro</i> da atividade antioxidante.	A nanossuspensão apresentou valor de potencial zeta de -38 mV e o dobro de efeito antioxidante comparada a microssuspensão controle.	SHAAL; SHEGOKAR; MÜLLER, 2011.

Continua.

Moagem à alta energia = ME; Homogeneização à alta pressão = HP; Combinação de tecnologia = CT; Liofilização = LF; Espectroscopia de Correlação de Fótons = PCS; Difração de raio laser = DL; espalhamento de luz dinâmico = DLS; Microscopia eletrônica de varredura = MEV; Microscopia de transmissão eletrônica = TEM; Calorimetria exploratória diferencial = DSC; Termogravimétrica/termogravimétrica derivada TG/DTG; Difração de raios-X = DRX; Não informado = NI; Tempo no qual a concentração plasmática máxima é atingida = T_{máx}; Concentração plasmática máxima C_{máx} e área sob a curva = AUC; tempo de meia vida = T_{1/2}.

Fármaco (Concentração %p/p)	Método	Controle (Tamanho médio de partícula)	Produto final (Tamanho médio de partícula)	Estabilizantes (Concentração %p/p em relação ao fármaco)	Avaliações	Resultados	Referências
Asulacrina (5%)	HP	Micropartículas (55,3µm)	Nanocristal liofilizado (702 nm)	Polaxamer 188® (20%)	PCS MEV DRX Solubilidade de saturação Velocidade de dissolução Estudo de estabilidade do tamanho de partícula, por 3 meses a 4 e 25 °C.	Os nanocristais preservaram as características cristalinas do fármaco, apresentaram estabilidade adequada no período de 3 meses e aumento de solubilidade em 42%.	GANTA et al., 2009.
Atovaque	HP	Micropartículas	Nanossuspensão (279 nm)	Polissorbato 80 (1,0% em relação à nanossuspensão) Poloxamer 188®, Polissorbato 80 e colato de sódio (1,0% em relação à nanossuspensão)	PCS DL Estudos farmacocinéticos e farmacodinâmicos em ratos infectados com <i>T. gondi</i> .	A mortalidade dos ratos tratados com doses intravenosas de nanossuspensão, variando de 0,1 a 1,0 mg/kg, não apresentou diferenças em relação ao grupo controle tratado com doses orais de 100mg/kg.	SCHÖLER et al., 2001.
AZ68 (10%)	ME	Micropartículas	Nanocristais amorfos e cristalinos liofilizados (200 nm)	Polivinilpirrolidona K15® (11,3%) e lauril sulfato de sódio (0,57%)	DL Solubilidade de saturação. Estudo de estabilidade do tamanho de partícula, por 90 dias, armazenados à temperatura ambiente, refrigerador e freezer. Estudo farmacodinâmico <i>in vivo</i> em ratos.	O $T_{máx}$ da nanossuspensão amorfa é menor quando comparado à nanossuspensão cristalina, entretanto a AUC de ambas nanossuspensões apresentou-se similar. Os nanocristais não apresentaram aglomeração utilizando a tecnologia de solidificação por liofilização e manitol como agente crioprotetor (2632 %p/p em relação ao fármaco)	SIGFRIDSSON et al., 2007.
Azitromicina (1%)	HP	Micropartículas (<2µm)	Nanocristal liofilizado (400 nm)	Poloxamer 188® (30%/100% p/p)	LD TEM DSC Velocidade de dissolução Estudo de estabilidade do tamanho de partícula, por 1 ano a 4 °C.	Os nanocristais apresentaram alteração na forma cristalina do fármaco, para a forma amorfa. Foi observada pequena aglomeração de nanocristais após liofilização sem crioprotetor. Adicionalmente, a dissolução dos nanocristais foi de 65% contra 20% em relação às micropartículas, após 5 horas.	ZHANG et al., 2007.
Budenosida	HP	Micropartículas (<2 µm)	Nanossuspensão (500 nm)	Lecitina (0,5% em relação à nanossuspensão) Tiloxapol® (0,2% em relação à nanossuspensão)	PCS LD Estudo de Nebulização. Estudo de estabilidade do tamanho de partícula, por 1 ano à temperatura ambiente.	As nanossuspensões apresentaram valor de potencial zeta igual -41,1 mV, estabilidade adequada e preservaram o tamanho de partícula dos nanocristais, após nebulização.	JACOBS; MÜLLER, 2002.

Continuação.

Moagem à alta energia = ME; Homogeneização à alta pressão = HP; Combinação de tecnologia = CT; Liofilização = LF; Espectroscopia de Correlação de Fótons = PCS; Difração de raio laser = DL; espalhamento de luz dinâmico = DLS; Microscopia eletrônica de varredura = MEV; Microscopia de transmissão eletrônica = TEM; Calorimetria exploratória diferencial = DSC; Termogravimétrica/termogravimétrica derivada TG/DTG; Difração de raios-X = DRX; Não informado = NI; Tempo no qual a concentração plasmática máxima é atingida = $T_{máx}$; Concentração plasmática máxima $C_{máx}$ e área sob a curva = AUC; tempo de meia vida = $T_{1/2}$.

Fármaco (Concentração %p/p)	Método	Controle (Tamanho médio de partícula)	Produto final (Tamanho médio de partícula)	Estabilizantes (Concentração %p/p em relação ao fármaco)	Avaliações	Resultados	Referências
Bupravaquone (2,5%)	HP	NI	Nanossuspensão mucoadesiva (400 nm)	Polaxamer 188® (50%) Lecitina (25%)	PCS LD Estudo de estabilidade do tamanho de partícula, por 3 meses após incorporação em gel mucoadesivo.	Foi observada pequena quantidade de micropartículas nas nanossuspensões e adequada estabilidade física.	JACOBS; KAYSER; MÜLLER, 2001 MÜLLER; JACOBS, 2002.
Camptotecina (2%)	ME	Micropartículas	Nanossuspensão intravenosa (202 nm)	Polaxamer 338® (50%)	PCS Estabilidade no plasma sanguíneo. Estudo farmacodinâmico <i>in vivo</i> em ratos infectados com adenocarcinoma.	As nanossuspensões apresentaram estabilidade física adequada e foram farmacodinamicamente eficazes na forma de injeção intravenosa.	MERISKO-LIVERSIDGE et al., 1996.
Cetoconazol (5–10%)	ME	Micropartículas (110 µm)	Nanossuspensão (121 nm) Comprimidos obtidos por via úmida.	Lauril sulfato de sódio (25–75%) e Hidroxipropil metilcelulose (10–60%) Lauril sulfato de sódio (25–75%) e Poloxamer 188® (20%) Lauril sulfato de sódio (25–75%) e Polivinilpirrolidona (20%)	DL DSC XRD Solubilidade Velocidade de dissolução	Os nanocristais não apresentaram alteração na forma cristalina do fármaco. O processo de granulação com lactose não apresentou aglomeração dos nanocristais. Adicionalmente, os comprimidos produzidos com nanocristais comparados aos comprimidos produzidos com micropartículas, apresentaram 65% contra 45% de dissolução, após 60 minutos.	BASA et al., 2008.
Cinarizina (20%)	ME	NI	Nanocristais liofilizados e obtidos por <i>spray drying</i> (366 nm)	succinato de d-alfa tocoferol polietilenoglicol 1000 (25%)	DLS Velocidade de dissolução. Estudo de estabilidade do tamanho de partícula, por 3 meses a 4 e 40°C.	Nanocristais submetidos aos processos de solidificação sem crioprotetores. Verificou-se que fármacos com superfície mais hidrófoba apresentaram aglomerados mais difíceis de desintegrar. O mesmo foi encontrado para compostos com elevados valores de <i>logP</i> .	VAN EERDENBRUGH et al., 2008.
Cilostazol (0,25%)	ME	NI	Nanocristais obtidos por <i>spray drying</i> (220 nm)	Hidroxipropil celulose (6.400%) e docusato de sódio (320%)	DL XRD Solubilidade Velocidade de dissolução Estudo farmacocinético e farmacodinâmico <i>in vivo</i> em cães.	Os nanocristais não apresentaram alteração na forma cristalina do fármaco. Foi observada total dissolução dos nanocristais, após 1 minuto, nos meios: água, fluido intestinal simulado no estado alimentado e não alimentado. Também foi identificado aumento significativo na biodisponibilidade oral, sem interferência do estado alimentado ou não alimentado.	JINNO et al. 2006.

Continuação.

Moagem à alta energia = ME; Homogeneização à alta pressão = HP; Combinação de tecnologia = CT; Liofilização = LF; Espectroscopia de Correlação de Fótons = PCS; Difração de raio laser = DL; espalhamento de luz dinâmico = DLS; Microscopia eletrônica de varredura = MEV; Microscopia de transmissão eletrônica = TEM; Calorimetria exploratória diferencial = DSC; Termogravimétrica/termogravimétrica derivada TG/DTG; Difração de raios-X = DRX; Não informado = NI; Tempo no qual a concentração plasmática máxima é atingida = $T_{\max}$; Concentração plasmática máxima $C_{\max}$ e área sob a curva = AUC; tempo de meia vida = $T_{1/2}$.

Fármaco (Concentração %p/p)	Método	Controle (Tamanho médio de partícula)	Produto final (Tamanho médio de partícula)	Estabilizantes (Concentração %p/p em relação ao fármaco)	Avaliações	Resultados	Referências
Clofazimina (2%)	HP	Micropartículas (55 µm)	Nanocristais lioofilizados Nanossuspensão Intravenosa (381 nm)	Poloxamer 188® (25%), Lecitina (30%) e Colato de sódio (12,5%)	PCS DL Estudo farmacocinético e farmacodinâmico <i>in vivo</i> em ratos.	A liofilização realizada na ausência de crioprotetores demonstrou melhor reconstituição e manutenção do tamanho de partícula. Após administração intravenosa, as nanossuspensões apresentaram mesmo comportamento farmacocinético e farmacodinâmico, quando comparadas com formulações de lipossomas. Nanocristais não apresentaram aglomeração quando com a tecnologia de solidificação por liofilização utilizando como agentes crioprotetores manitol e trealose (280 e 100%p/p, respectivamente, em relação ao fármaco).	PETERS et al., 2000.
Danazol (1%)	HP	Micropartículas	Nanossuspensão (280 nm)	Poloxamer 407® (50%)	DL Solubilidade de saturação Velocidade de dissolução utilizando método turbidimétrico.	A nanossuspensão apresentou solubilidade de saturação e velocidade de dissolução superiores ao controle.	CRISP et al., 2007.
Danazol (5%)	ME	Suspensão (10 µm)	Nanossuspensão (169 nm)	Povidona K15® (30%)	Estudo farmacocinético <i>in vivo</i> em cães.	Aumento de 15 vezes na concentração plasmática, aumento de 16 vezes na biodisponibilidade e aumento da absorção em relação à suspensão convencional.	LIVERSIDGE; CUNDY, 1995.
Danazol (1%)	ME	Micropartículas (7,2 µm)	Nanossuspensão (676 nm)	Metilcelulose (30%)	DL MEV DSC DRX Avaliação dos melhores parâmetros do processo de ME. Avaliação da uniformidade das nanossuspensões, no período de 1 hora após preparo.	Os nanocristais preservaram as características cristalinas do fármaco. Os menores e mais estáveis nanocristais foram obtidos nas seguintes condições: diâmetros das esferas de zircônia 0,1mm, quantidade das esferas de zircônia 2,4g, velocidade de revolução 2.000 rpm, tempo de homogeneização 2 minutos, volume da solução 0,6 mL e concentração do estabilizante 30% p/p.	TAKATSUKA et al., 2010.
Dexametasona (2,5%)	HP	Micropartículas	Nanossuspensão para administração oftálmica (930 nm)	Pluronic F68® (4%)	PCS DL Estudo farmacocinético e farmacodinâmico <i>in vivo</i> em coelhos.	A nanossuspensão apresentou aumento na absorção e na eficiência de ação oftálmica. Na maioria dos casos, houve significativo aumento no tempo de duração do efeito farmacológico.	KASSEM et al. 2007.

Continuação.

Moagem à alta energia = ME; Homogeneização à alta pressão = HP; Combinação de tecnologia = CT; Liofilização = LF; Espectroscopia de Correlação de Fótons = PCS; Difração de raio laser = DL; espalhamento de luz dinâmico = DLS; Microscopia eletrônica de varredura = MEV; Microscopia de transmissão eletrônica = TEM; Calorimetria exploratória diferencial = DSC; Termogravimétrica/termogravimétrica derivada TG/DTG; Difração de raios-X = DRX; Não informado = NI; Tempo no qual a concentração plasmática máxima é atingida = T_{max} ; Concentração plasmática máxima C_{max} e área sob a curva = AUC; tempo de meia vida = $T_{1/2}$.

Fármaco (Concentração %p/p)	Método	Controle (Tamanho médio de partícula)	Produto final (Tamanho médio de partícula)	Estabilizantes (Concentração %p/p em relação ao fármaco)	Avaliações	Resultados	Referências
Diclofenaco (10%)	HP	Micropartículas de dois polimorfos cristalinos	Nanossuspensão (<800 nm)	Pluronic F68® (10–50%)	PCS DSC DRX MEV Solubilidade de saturação. Velocidade de dissolução.	Os resultados demonstraram que a velocidade de dissolução do fármaco é fortemente influenciada por sua solubilidade, pela forma do cristal e pelo procedimento de preparação. Os resultados demonstraram que a HP transformou parcialmente o polimorfo metaestável no polimorfo de maior estabilidade.	LAI et al., 2009.
Dipropionato de Beclometasona (10%)	ME	Micropartículas (2 µm)	Nanossuspensão aerolizada (164 nm)	Tiloxapol® (20%)	DL MEV Avaliação <i>in vitro</i> da deposição de partículas e fração inalável.	A nanossuspensão apresentou aumento de 56 para 72% na fração inalável e menor deposição na região da garganta, em relação ao produto comercial Vancerilw®.	OSTRANDER et al. 1990.
Dipropionato de Beclometasona (5%)	ME	Micropartículas (10,5 µm)	Nanossuspensão (267 nm)	Álcool polivinílico (50%)	DL MEV Solubilidade de saturação. Avaliação <i>in vitro</i> da deposição de partículas e fração inalável.	A nanossuspensão apresentou estabilidade adequada durante 7 meses em temperatura ambiente, maior solubilidade de saturação e fração inalável do fármaco, em relação às microssuspensões.	WIEDMANN; DECASTRO; WOOD, 1997.
EMD (5%)	ME	Micropartículas (227,6 µm)	Nanocristais obtidos por <i>Spray drying</i> (4,5 µm)	Lactose (100%) e lauril sulfato de sódio (10%)	DL DRX Velocidade de dissolução. Estudo farmacocinético <i>in vivo</i> em cães.	Após secagem da nanossuspensão, utilizando a técnica <i>Spray drying</i> , não foi observada aglomeração. Os nanocristais, em relação ao fármaco micronizado, apresentaram 60% contra 20%, após 30 minutos. Entretanto, não foi observada melhora na biodisponibilidade absoluta.	VOGT et al., 2008.
Espironolactona	HP	Micropartículas (4 µm)	Nanossuspensão (400nm)	Dioctil Sulfosuccinato (0,5% em relação à nanossuspensão)	PCS DL Velocidade de dissolução.	As nanossuspensões apresentaram dissolução de 80% em menos de 15 minutos.	LANGGUTH et al., 2005.
Etil diatrizoato (20%–30%)	ME	Micropartículas	Nanossuspensão (180–200nm)	Poloxamina 908® (10%)	PCS Potencial Zeta Estudo de estabilidade do tamanho de partícula após autoclavagem.	Após redispersão, as nanossuspensões apresentaram valor de potencial zeta igual a -3,4 mV. Foi observado que a estabilidade da nanossuspensão após esterilização, por calor úmido, depende do ponto de turvação do tensoativo. Ocorreu moderado aumento dos nanocristais após autoclavagem.	NA et al., 1999.
Etoposida (2%)	ME	Micropartículas	Nanossuspensão (256 nm)	Poloxamer 407® (50%)	PCS Estabilidade no plasma sanguíneo. Estudo farmacodinâmico <i>in vivo</i> em ratos infectados com adenocarcinoma.	As nanossuspensões apresentaram estabilidade física adequada e foram farmacodinamicamente eficazes na forma de injeção intravenosa.	MERISKO-LIVERSIDGE et al., 1996.

Continuação.

Moagem à alta energia = ME; Homogeneização à alta pressão = HP; Combinação de tecnologia = CT; Liofilização = LF; Espectroscopia de Correlação de Fótons = PCS; Difração de raio laser = DL; espalhamento de luz dinâmico = DLS; Microscopia eletrônica de varredura = MEV; Microscopia de transmissão eletrônica = TEM; Calorimetria exploratória diferencial = DSC; Termogravimétrica/termogravimétrica derivada TG/DTG; Difração de raios-X = DRX; Não informado = NI; Tempo no qual a concentração plasmática máxima é atingida = T_{max} ; Concentração plasmática máxima C_{max} e área sob a curva = AUC; tempo de meia vida = $T_{1/2}$.

Fármaco (Concentração %p/p)	Método	Controle (Tamanho médio de partícula)	Produto final (Tamanho médio de partícula)	Estabilizantes (Concentração %p/p em relação ao fármaco)	Avaliações	Resultados	Referências
Fenitoína (1%)	ME	Micropartículas (20,9 µm),	Nanossuspensão (272 nm)	Metilcelulose (30%)	DL MEV DSC DRX Avaliação dos melhores parâmetros do processo de ME. Avaliação da uniformidade das nanossuspensões, no período de 1 hora após preparo.	Os nanocristais preservaram as características cristalinas do fármaco. Os menores e mais estáveis nanocristais foram obtidos nas seguintes condições: diâmetros das esferas de zircônia 0,1mm, quantidade das esferas de zircônia 2,4g, velocidade de revolução 2.000 rpm, tempo de homogeneização 2 minutos, volume da solução 0,6 mL e concentração do estabilizante 30% p/p.	TAKATSUKA et al., 2010.
Fenilbutazona (20%)	ME	NI	Nanocristais liofilizados sem crioprotetores e obtidos por <i>spray drying</i>	succinato de d-alfa tocoferol polietilenoglicol 1000 (25%)	DLS Velocidade de dissolução. Estudo de estabilidade do tamanho de partícula, por 3 meses a 4 e 40°C.	Verificou-se que compostos com superfície mais hidrófoba apresentaram aglomerados mais difíceis de desintegrar. O mesmo foi encontrado para compostos com elevados valores de <i>logP</i> .	VAN EERDENBRUGH et al., 2008.
Glibenclamida (5%)	LF ME HP	Micropartículas	Nanocristal Liofilizado (160 nm)	Docusato de sódio (4%)	MEV DRX DSC	Liofilização prévia das micropartículas em dimetil sulfoxido e álcool terc-butilico (25:75) resultam em partículas mais porosas e menos resistentes à fragmentação. Após liofilização do fármaco, o tempo de homogeneização ou moagem diminuiu de forma significativa.	SALAZAR et al., 2011. SALAZAR et al., 2012.
Glibenclamida (1, 2 e 3%)	H42	Micropartículas (2,7 µm)	Nanocristais (236 nm) Comprimidos	Docusato de sódio (0, 10, 20, 30 e 40%)	PCS MEV Velocidade de dissolução dos comprimidos elaborados.	O melhor desempenho na velocidade de dissolução (90% em 10 minutos) foi observado em comprimidos contendo nanocristais obtidos pela técnica de <i>spray-drying</i> , em relação aos comprimidos produzidos utilizando a liofilização e a granulação úmida	SALAZAR; MÜLLER; MÖSCHWITZER, 2013.
Griseofulvina (20%)	ME	NI	Nanocristais liofilizados sem crioprotetor e obtidos por <i>spray drying</i> (256 nm)	succinato de d-alfa tocoferol polietilenoglicol 1000 (25%)	DLS Velocidade de dissolução. Estudo de estabilidade do tamanho de partícula, por 3 meses a 4 e 40°C.	Verificou-se que compostos com superfície mais hidrófoba apresentaram aglomerados mais difíceis de desintegrar. O mesmo foi encontrado para compostos com elevados valores de <i>logP</i> .	VAN EERDENBRUGH et al., 2008.

Continuação.

Moagem à alta energia = ME; Homogeneização à alta pressão = HP; Combinação de tecnologia = CT; Liofilização = LF; Espectroscopia de Correlação de Fótons = PCS; Difração de raio laser = DL; espalhamento de luz dinâmico = DLS; Microscopia eletrônica de varredura = MEV; Microscopia de transmissão eletrônica = TEM; Calorimetria exploratória diferencial = DSC; Termogravimétrica/termogravimétrica derivada TG/DTG; Difração de raios-X = DRX; Não informado = NI; Tempo no qual a concentração plasmática máxima é atingida = $T_{m\acute{a}x}$; Concentração plasmática máxima $C_{m\acute{a}x}$ e área sob a curva = AUC; tempo de meia vida = $T_{1/2}$.

Fármaco (Concentração %p/p)	Método	Controle (Tamanho médio de partícula)	Produto final (Tamanho médio de partícula)	Estabilizantes (Concentração %p/p em relação ao fármaco)	Avaliações	Resultados	Referências
Hesperidina (5%)	HP	Micropartículas (80 µm)	Nanossuspensão (300 nm)	Polissorbato 80 (20–40%) Polaxamer 188® (20–40%) Plantacare 2000® (20–40%) Inutec SP1® (20–40%)	PCS DL DSC Potencial zeta Estudo de estabilidade do tamanho de partícula, por 30 dias, à temperatura ambiente, 4 e 40 °C.	Os nanocristais preservaram a forma cristalina do fármaco. As nanossuspensões contendo Inutec® e Plantacare®, a 20% p/p, demonstraram estabilidade adequada e valor de potencial zeta igual a -16,9 e -29 mV, respectivamente.	MISHRA; SHAAL; MÜLLER; KECK, 2009.
Hidrocortisona (2,5%)	HP	Micropartículas	Nanossuspensão oftálmica (539 nm)	Pluronic F68® (4%)	PCS DL Estudo farmacocinético e farmacodinâmico <i>in vivo</i> em coelhos.	As nanossuspensões apresentaram aumento da eficiência terapêutica. Foi observado aumento significativo no tempo de duração do efeito farmacológico.	KASSEM et al. 2007.
Hidrocortisona acetato (1%)	HP	Micropartículas	Nanocristais e <i>pellets</i> obtidos em leite fluidizado (710–850 µm)	Polaxamer 188® (100%) e Quitosana (50%)	PCS DRX Solubilidade Velocidade de dissolução	Os nanocristais não preservaram as características cristalinas do fármaco, originando estrutura amorfa. Foi observado aumento significativo na solubilidade. O melhor desempenho na velocidade de dissolução foi observado nos <i>pellets</i> produzidos com 10%p/p (em relação ao fármaco) do revestimento entérico Eudragit L30 D55®.	MÖSCHWITZER; MÜLLER, 2006.
Insulina (2%)	ME	Micropartículas (16 µm)	Nanossuspensão subcutânea (150 nm)	Poloxamer 188 (50%) e sal sódico do ácido desoxicólico (5%)	DL MEV Estudo de estabilidade do tamanho de partícula a 70 °C por 100 minutos. Estudo farmacodinâmico <i>in vivo</i> em ratos hiperglicêmicos.	A nanossuspensão apresentou estabilidade física adequada após aquecimento. Doses subcutâneas de nanossuspensão foram efetivas, diminuindo os níveis sanguíneos de glicose, quando comparadas ao produto comercial.	MERISKO-LIVERSIDGE et al., 2004.
Itraconazol (1%)	ME	Micropartículas	Nanocristal liofilizado (294 nm)	Polaxamer 407® (50%) e Glicerina (50%)	DL MEV Velocidade de dissolução. Avaliação dos melhores parâmetros do processo de ME.	O fármaco manteve suas características cristalinas e apresentou aumento de 6 vezes na velocidade de dissolução. Os menores e mais estáveis nanocristais foram obtidos nas seguintes condições: 1:3:50; fármaco: tensoativo: meio de moagem. Não foi observada aglomeração dos nanocristais após liofilização utilizando manitol (100 %p/p em relação ao fármaco como crioprotetor).	NAKARANI; MISRA; PATEL; VAGHANI, 2010.

Continuação.

Moagem à alta energia = ME; Homogeneização à alta pressão = HP; Combinação de tecnologia = CT; Liofilização = LF; Espectroscopia de Correlação de Fótons = PCS; Difração de raio laser = DL; espalhamento de luz dinâmico = DLS; Microscopia eletrônica de varredura = MEV; Microscopia de transmissão eletrônica = TEM; Calorimetria exploratória diferencial = DSC; Termogravimétrica/termogravimétrica derivada TG/DTG; Difração de raios-X = DRX; Não informado = NI; Tempo no qual a concentração plasmática máxima é atingida = T_{max} ; Concentração plasmática máxima C_{max} e área sob a curva = AUC; tempo de meia vida = $T_{1/2}$.

Fármaco (Concentração %p/p)	Método	Controle (Tamanho médio de partícula)	Produto final (Tamanho médio de partícula)	Estabilizantes (Concentração %p/p em relação ao fármaco)	Avaliações	Resultados	Referências
Itraconazol	ME	Micropartículas	Nanossuspensão Intravenosa (300 nm)	Poloxamer 338®	Estudo farmacocinético <i>in vivo</i> em humanos.	As nanossuspensões apresentaram perfil farmacocinético semelhante ao das formulações contendo itraconazol complexado a ciclodextrinas.	MOUTON et al., 2006.
Itraconazol (1%)	HP	Micropartículas	Nanossuspensão (240 nm)	Dodecil sulfato de sódio (30%)	DL Solubilidade de saturação Velocidade de dissolução utilizando método turbidimétrico.	Desenvolvida técnica para avaliação da velocidade de dissolução utilizando método turbidimétrico.	CRISP et al., 2007.
Itraconazol	HP	Micropartículas	Nanossuspensão intravenosa (581 nm)	Poloxamer 188® e sal sódico do ácido desoxicólico	DL Potencial zeta Estudo de estabilidade do tamanho de partícula a 5 °C, por 24 meses e a 25 °C, por 6 meses. Estudo farmacocinético e farmacodinâmico <i>in vivo</i> em ratos imunocomprometidos.	A nanossuspensão apresentou estabilidade física adequada. Também demonstrou maior atividade antifúngica, diminuição no $C_{máx}$, aumento no $t_{1/2}$ e tolerabilidade de doses maiores, em relação à solução de itraconazol.	RABINOW et al., 2007.
Itraconazol (20%)	ME	Micropartículas	Nanocristais liofilizados (337 nm)	succinato de d-alfa tocoferol polietilenoglicol 1000 (10%)	DLS LD DRX MEV Velocidade de dissolução.	Foi observada agregação dos nanocristais após liofilização utilizando a sacarose como agente crioprotetor (50–100 %p/p em relação ao fármaco). Foi identificado que a velocidade de dissolução diminui com o aumento de concentração de sacarose. Entretanto, foi observado que a velocidade de dissolução dos nanocristais está diretamente relacionada com o aumento da concentração de celulose utilizada como agente crioprotetor (50–100 %p/p em relação ao fármaco).	VAN EERDENBRUGH et al., 2008.
Lovirida (17%)	ME	Micropartículas	Nanocristais Liofilizados (264 nm)	Poloxamer 188® (50%) e polissorbat 80 (50%)	DRX Velocidade de dissolução Estudo de permeabilidade em células Caco-2	Os nanocristais liofilizados com o agente crioprotetor sacarose (100 %p/p em relação ao fármaco) não demonstrou aglomeração, apresentaram maior velocidade de dissolução e maior permeabilidade em relação ao controle.	VAN EERDENBRUGH et al., 2007.

Continuação.

Moagem à alta energia = ME; Homogeneização à alta pressão = HP; Combinação de tecnologia = CT; Liofilização = LF; Espectroscopia de Correlação de Fótons = PCS; Difração de raio laser = DL; espalhamento de luz dinâmico = DLS; Microscopia eletrônica de varredura = MEV; Microscopia de transmissão eletrônica = TEM; Calorimetria exploratória diferencial = DSC; Termogravimétrica/termogravimétrica derivada TG/DTG; Difração de raios-X = DRX; Não informado = NI; Tempo no qual a concentração plasmática máxima é atingida = $T_{máx}$; Concentração plasmática máxima $C_{máx}$ e área sob a curva = AUC; tempo de meia vida = $T_{1/2}$.

Fármaco (Concentração %p/p)	Método	Controle (Tamanho médio de partícula)	Produto final (Tamanho médio de partícula)	Estabilizantes (Concentração %p/p em relação ao fármaco)	Avaliações	Resultados	Referências
Luteína	HP	Micropartículas	Nanocristais Liofilizados (429 nm) Pellets	Plantacare 2000® (20%)	PCS Potencial zeta Solubilidade de saturação. Velocidade de dissolução. Estudo de estabilidade do tamanho de partícula, a 4 °C, temperatura ambiente e 40 °C por 3 meses. Avaliação de permeabilidade <i>in vitro</i> e <i>ex vivo</i> em membranas de nitrato de celulose e pele de porco.	Apesar de as nanossuspensões apresentarem valor de potencial zeta igual a -17 mV, não houve aumento no tamanho de partículas. Foi observado aumento de 26,3 vezes na solubilidade de saturação. As cápsulas de gelatina dura, contendo <i>pellets</i> de luteína nanocristais produzidos com o dispersante lactose (500 %p/p em relação ao fármaco), apresentaram discreta aglomeração (429 para 629 nm). Entretanto, a velocidade de dissolução aumentou de 3 a 4 vezes em relação ao controle. A luteína liofilizada na presença da trealose (3 %p/p em relação ao fármaco) não apresentou aglomeração. Permeabilidade superior em modelo <i>in vitro</i> , entretanto similar em pele de orelha de porco.	MITRI et al., 2011.
Mebendazol (20%)	ME	NI	Nanocristais liofilizados e submetidos a <i>por spray drying</i> sem crioprotetor (190 nm)	succinato de d-alfa tocoferol polietilenoglicol 1000 (25%)	DLS Velocidade de dissolução. Estudo de estabilidade do tamanho de partícula, por 3 meses a 4 e 40°C.	Verificou-se que compostos com uma superfície mais hidrófoba apresentaram aglomerados mais difíceis de desintegrar. O mesmo foi encontrado para compostos com elevados valores de <i>logP</i> .	VAN EERDENBRUGH et al., 2008.
Naproxeno (1%)	ME	Micropartículas (16,7 µm)	Nanossuspensão (204 nm),	Metilcelulose (30%)	DL MEV DSC DRX Avaliação dos melhores parâmetros do processo de ME. Avaliação da uniformidade das nanossuspensões, no período de 1 hora após preparo.	Os nanocristais preservaram as características cristalinas do fármaco. Os menores e mais estáveis nanocristais foram obtidos nas seguintes condições: diâmetros das esferas de zircônia 0,1mm, quantidade das esferas de zircônia 2,4g, velocidade de revolução 2000 rpm, tempo de homogeneização 2 minutos, volume da solução 0,6 mL e concentração do estabilizante 30% p/p.	TAKATSUKA et al., 2010.
Naproxeno (8%)	ME	Micropartículas	Nanocristais Liofilizados (120 nm)	Hidroxipropil metilcelulose (10–50%)	DL MEV	Os nanocristais liofilizados com carregena ou gelatina (2,5–125% p/p em relação ao fármaco) não apresentaram aglomeração. Também foi observado que quanto maior era a concentração dos dispersantes menor era o tamanho das partículas após redispersão dos nanocristais.	KIM; LEE, 2010.

Continuação.

Moagem à alta energia = ME; Homogeneização à alta pressão = HP; Combinação de tecnologia = CT; Liofilização = LF; Espectroscopia de Correlação de Fótons = PCS; Difração de raio laser = DL; espalhamento de luz dinâmico = DLS; Microscopia eletrônica de varredura = MEV; Microscopia de transmissão eletrônica = TEM; Calorimetria exploratória diferencial = DSC; Termogravimétrica/termogravimétrica derivada TG/DTG; Difração de raios-X = DRX; Não informado = NI; Tempo no qual a concentração plasmática máxima é atingida = $T_{m\acute{a}x}$; Concentração plasmática máxima $C_{m\acute{a}x}$ e área sob a curva = AUC; tempo de meia vida = $T_{1/2}$.

Fármaco (Concentração %p/p)	Método	Controle (Tamanho médio de partícula)	Produto final (Tamanho médio de partícula)	Estabilizantes (Concentração %p/p em relação ao fármaco)	Avaliações	Resultados	Referências
NI (1,8, 6,1 e 11,5%)	ME	Micropartículas	Nanocristais liofilizados (150 nm)	Hidroxipropil metilcelulose (50–100%)	DL Microscopia de força atômica	Foi observado que quanto maior a velocidade de congelamento menor é a formação de aglomerados de nanocristais. O trabalho sugere velocidade de congelamento crítica mínima de 130 µm/s. Adicionalmente, a pesquisa descreve que a velocidade crítica de congelamento deve aumentar com a concentração do fármaco.	LEE; CHENG, 2006.
NI (15%)	ME	Micropartículas	Nanocristal liofilizado (400 nm)	Polivinilpirrolidona (23,3%) e lauril sulfato de sódio (1,67–3,33%)	DL MEV DRX Estudo farmacodinâmico <i>in vivo</i> em cães.	Foi observado que condições de fragmentação e diferentes quantidades de estabilizantes influenciam na aglomeração dos nanocristais. Os nanocristais apresentaram concentrações plasmáticas superiores ao controle.	DENG et al., 2008.
Nifedipina (1%)	ME	Nifedipina (32,3 µm)	Nanossuspensão (226 nm)	Metilcelulose (30%)	DL MEV DSC DRX Avaliação dos melhores parâmetros do processo de ME. Avaliação da uniformidade das nanossuspensões no período de 1 hora.	Os nanocristais preservaram as características cristalinas do fármaco. Os menores e mais estáveis nanocristais foram obtidos nas seguintes condições: diâmetros das esferas de zircônia 0,1mm, quantidade das esferas de zircônia 2,4g, velocidade de revolução 2.000 rpm, tempo de homogeneização 2 minutos, volume da solução 0,6 mL e concentração do estabilizante 30%.	TAKATSUKA et al., 2010.
Nifedipina (5%)	HP	Micropartículas (100 µm)	Nanocristais obtidos por <i>spray drying</i> (291 nm)	Hidroxipropil metilcelulose (10–200%)	DL Estudo farmacocinético <i>in vivo</i> em ratos. Estudo de permeabilidade em células Caco-2.	Nanocristais obtidos utilizando tecnologia de solidificação <i>spray drying</i> , na presença do dispersante manitol (100 %p/p em relação ao fármaco), comparados com nanocristais solidificados, na ausência de dispersante, apresentaram 75% de dissolução contra 20%, após 2 minutos. Os nanocristais apresentaram permeabilidade 6 vezes maior em relação ao controle, entretanto não foi observado aumento significativo na absorção no estado alimentado.	HECQ et al, 2006.
Nimodipina	HP	Micropartículas	Nanocristais liofilizados com Manitol (4% p/v) (450nm)	Polaxamer 188® (0,6% em relação à nanossuspensão) e Colato de sódio(0,4% em relação à nanossuspensão)	PCS DSC MEV Solubilidade de saturação	Os nanocristais preservaram as características cristalinas do fármaco. Aumento significativo na solubilidade de saturação. Após liofilização, os tensoativos formaram camada amorfa ao redor dos nanocristais.	XIONG et al., 2008.

Continuação.

Moagem à alta energia = ME; Homogeneização à alta pressão = HP; Combinação de tecnologia = CT; Liofilização = LF; Espectroscopia de Correlação de Fótons = PCS; Difração de raio laser = DL; espalhamento de luz dinâmico = DLS; Microscopia eletrônica de varredura = MEV; Microscopia de transmissão eletrônica = TEM; Calorimetria exploratória diferencial = DSC; Termogravimétrica/termogravimétrica derivada TG/DTG; Difração de raios-X = DRX; Não informado = NI; Tempo no qual a concentração plasmática máxima é atingida = $T_{m\acute{a}x}$; Concentração plasmática máxima $C_{m\acute{a}x}$ e área sob a curva = AUC; tempo de meia vida = $T_{1/2}$.

Fármaco (Concentração %p/p)	Método	Controle (Tamanho médio de partícula)	Produto final (Tamanho médio de partícula)	Estabilizantes (Concentração %p/p em relação ao fármaco)	Avaliações	Resultados	Referências
Omeprazol (1–10%)	HP	Micropartículas (180 µm)	Nanossuspensão (920 nm)	Polaxamer 188® (10–100%)	DRX Estabilidade física e química, por 30 dias, a 4°C e protegido da luz.	A nanossuspensão apresentou estabilidade física e química adequada em relação ao controle.	MOSCHWITZER et al., 2004.
Oridonin (5%)	HP	Micropartículas	Nanossuspensão (103 nm) Nanocristal liofilizado (897 nm)	Poloxamer 188® (150%) e Lecitina (50%)	DL Velocidade de dissolução utilizando aparatos II USP Estudo <i>in vivo</i> em ratos	Não foi observada agregação após liofilização com manitol (20–100 % p/p em relação ao fármaco). A dissolução dos nanocristais em relação às micropartículas foi de 98%, após 24 minutos, contra 40,3% após 2 horas. A nanossuspensão com valor de tamanho médio igual a 103,3 nm apresentou farmacocinética semelhante à forma farmacêutica solução, enquanto que a nanossuspensão com valor de tamanho médio de 897,2 nm apresentou elevada captação pelos órgãos do retículo endotelial.	GAO et al., 2007 e 2008.
Palmitato de Ascorbila (5%)	HP	Micropartículas (1,7–11,2 µm)	Nanocristal liofilizado com trealose (2–10% p/p) (346 nm)	Polissorbato 80 (20%) Colato de sódio (10%)	PCS DL Potencial zeta, Microscopia de força atômica MEV Estabilidade por 3 meses a 4°C, 25°C, 40°C.	Os nanocristais preservaram as características cristalinas do fármaco. As nanossuspensões contendo polissorbato, como estabilizante, demonstraram estabilidade adequada e potencial zeta entre -56 e -48 mV.	TEERANACHAIDEE L et al., 2008.
Paclitaxel (2%)	ME	Micropartículas	Nanossuspensão intravenosa (279 nm)	Poloxamer 407® (50%)	PCS Estabilidade no plasma sanguíneo. Estudo farmacodinâmico <i>in vivo</i> em ratos infectados com adenocarcinoma.	As nanossuspensões apresentaram estabilidade física adequada e foram farmacodinamicamente eficazes na forma de injeção intravenosa.	MERISKO-LIVERSIDGE et al., 1996.
Prednisolona (3%)	HP	NI	Nanossuspensão (211 nm)	Lecitina (20%) e colato de sódio (16,7%)	PCS	Quanto maiores a pressão e o número de ciclos na HP, menor o tamanho dos nanocristais. O grau de fragmentação do fármaco está relacionado com sua forma cristalina.	MÜLLER;PETERS, 1998.
Prednisolona (2,5%)	HP	Micropartículas	Nanossuspensão para administração oftálmica (211 nm)	Pluronic F68 (4% p/p)	PCS DL Estudo farmacocinético e farmacodinâmico <i>in vivo</i> em coelhos.	As nanossuspensões apresentaram aumento na absorção e na eficiência de ação oftálmica. Na maioria dos casos, houve significativo aumento no tempo de duração do efeito farmacológico	KASSEM et al. 2007.

Continuação.

Moagem à alta energia = ME; Homogeneização à alta pressão = HP; Combinação de tecnologia = CT; Liofilização = LF; Espectroscopia de Correlação de Fótons = PCS; Difração de raio laser = DL; espalhamento de luz dinâmico = DLS; Microscopia eletrônica de varredura = MEV; Microscopia de transmissão eletrônica = TEM; Calorimetria exploratória diferencial = DSC; Termogravimétrica/termogravimétrica derivada TG/DTG; Difração de raios-X = DRX; Não informado = NI; Tempo no qual a concentração plasmática máxima é atingida = T_{max} ; Concentração plasmática máxima C_{max} e área sob a curva = AUC; tempo de meia vida = $T_{1/2}$.

Fármaco (Concentração %p/p)	Método	Controle (Tamanho médio de partícula)	Produto final (Tamanho médio de partícula)	Estabilizantes (Concentração %p/p em relação ao fármaco)	Avaliações	Resultados	Referências
PX18 (5%)	HP	Micropartículas (50 µm)	Nanossuspensão (<50 nm)	Polissorbato 80 (20%)	PCS DL Potencial zeta MEV Ângulo de contato Estudo de estabilidade do tamanho de partícula, por 30 dias à temperatura ambiente, 4 °C e 40 °C Solubilidade de saturação.	As nanossuspensões contendo polissorbato, a 20% p/p como estabilizante, demonstraram estabilidade adequada e valor de potencial zeta igual a -19 mV. Foi observado aumento da solubilidade de saturação em 60%.	PARDEIKE; MÜLLER, 2010.
Quercetina (5–10%)	HP ME CT	Micropartículas (50 µm)	Nanossuspensão (276–787 nm) Nanocristais obtidos por secagem à vácuo (240 nm)	Polissorbato 80 (20–40%) Pluronic F68® (15%) e Lecitina (5%)	PCS DL Potencial Zeta DRX Solubilidade de saturação Velocidade de dissolução	Os nanocristais preservaram as características cristalinas do fármaco nas três tecnologias utilizadas. Os nanocristais de menores tamanho foram obtidos utilizando o processo de moagem à alta energia e apresentaram aumento significativo na solubilidade e na velocidade de dissolução em relação ao controle. Também não foi observada aglomeração dos nanocristais.	GAO et al., 2011, KAKRAN et al., 2012.
RMKP 22	HP	Micropartículas (0,5–25 µm)	Nanossuspensão (502 nm)	Polissorbato 80 (0,3%) e Glicerol (2,2% em relação à nanossuspensão)	LD PCS	O processo de homogeneização foi reprodutível, produzindo nanossuspensões homôneas e estáveis.	KAYSER; MÜLLER, 2000.
RMKP 22 (3%)	HP	NI	Nanossuspensão (211 nm)	Lecitina (20%) e colato de sódio (16,7%)	PCS	Quanto maiores a pressão e o número de ciclos na HP, menor o tamanho dos nanocristais. O grau de fragmentação do fármaco apresenta relação com sua forma cristalina.	MÜLLER;PETERS, 1998.
RMKP 23 (3%)	HP	NI	Nanossuspensão (211 nm)	Lecitina (20%) e colato de sódio (16,7%)	PCS	Quanto maiores a pressão e o número de ciclos na HP, menor o tamanho dos nanocristais. O grau de fragmentação do fármaco está relacionado com sua forma cristalina.	MÜLLER; PETERS, 1998.
Rutina (5%)	HP	Micropartículas (118,6 µm)	Nanocristal liofilizado sem agente crioprotetor (727 nm)	Polaxamer 188®, Polissorbato 80 e álcool polivinílico (20 %) Docusato de sódio (1%)	PCS DSC DRX Solubilidade de saturação Velocidade de dissolução Avaliação da atividade antioxidante e protetora solar <i>in vitro</i> .	Os nanocristais preservaram as características cristalinas do fármaco. Foram observados aumento de 10% na solubilidade de saturação, aumento na atividade antioxidante e valores de fator de proteção solar duas vezes maiores em relação ao derivado solúvel em água.	MAULUDIN; MÜLLER; KECK, 2009.

Continuação.

Moagem à alta energia = ME; Homogeneização à alta pressão = HP; Combinação de tecnologia = CT; Liofilização = LF; Espectroscopia de Correlação de Fótons = PCS; Difração de raio laser = DL; espalhamento de luz dinâmico = DLS; Microscopia eletrônica de varredura = MEV; Microscopia de transmissão eletrônica = TEM; Calorimetria exploratória diferencial = DSC; Termogravimétrica/termogravimétrica derivada TG/DTG; Difração de raios-X = DRX; Não informado = NI; Tempo no qual a concentração plasmática máxima é atingida = T_{max} ; Concentração plasmática máxima C_{max} e área sob a curva = AUC; tempo de meia vida = $T_{1/2}$.

Fármaco (Concentração %p/p)	Método	Controle (Tamanho médio de partícula)	Produto final (Tamanho médio de partícula)	Estabilizantes (Concentração %p/p em relação ao fármaco)	Avaliações	Resultados	Referências
Rutina (5%)	ART MICCRA	Micropartículas	Nanossuspensão (650 nm)	Plantacare 2000® (20%)	PCS DL	Tecnologia ArtMicra demonstrou produzir nanocristais com tamanho semelhante aos obtidos por HP e ME, porém foi considerada mais rápida, eficiente e de fácil escalonamento.	SCHOLZ et al., 2014.
Tarazepida	HP	NI	Nanossuspensão (<500nm)	Lutrol F68® e Polissorbato 80 (2:1 p/p em relação à nanossuspensão)	PCS DL Estudo de estabilidade do tamanho de partícula, por 4 meses à temperatura ambiente.	As nanossuspensões apresentaram potencial zeta entre -30 mV e -33 mV e o tamanho de partícula se manteve estável durante o estudo de estabilidade.	JACOBS; KAYSER; MÜLLER, 2000.
ucb-35440-3 (5%)	HP	Micropartículas (140 µm)	Nanocristais liofilizados (200 nm)	Polaxamer 407® (40%) Álcool polivinílico (40%)	DL DRX Microscopia de luz polarizada Solubilidade de saturação Velocidade de dissolução Teste <i>in vivo</i> em ratos	Aumento significativo na solubilidade e na velocidade de dissolução, entretanto não foi observada melhora no perfil farmacocinético.	HECQ et al., 2006.

Conclusão.

Moagem à alta energia = ME; Homogeneização à alta pressão = HP; Combinação de tecnologia = CT; Liofilização = LF; Espectroscopia de Correlação de Fótons = PCS; Difração de raio laser = DL; espalhamento de luz dinâmico = DLS; Microscopia eletrônica de varredura = MEV; Microscopia de transmissão eletrônica = TEM; Calorimetria exploratória diferencial = DSC; Termogravimétrica/termogravimétrica derivada TG/DTG; Difração de raios-X = DRX; Não informado = NI; Tempo no qual a concentração plasmática máxima é atingida = $T_{máx}$; Concentração plasmática máxima $C_{máx}$ e área sob a curva = AUC; tempo de meia vida = $T_{1/2}$.

Apêndice B – Fármacos desenvolvidos na forma de nanossuspensões e suas respectivas contribuições farmacocinéticas.

Fármaco/Classe	Método	Forma (Tamanho médio de partícula)	Controle (Tamanho médio de partícula)	Farmacocinética	Animais	Referência
Diciclohexil ureia Classe II	ME	Nanossuspensão (950nm)	Suspensão (38,5 µm)	Aumento $C_{\text{máx}}$ em uma ordem de grandeza.	Ratos	GHOSH et al., 2008.
Substância BCS II	ME	Nanossuspensão (280 nm)	Suspensão (4 µm)	Aumento $C_{\text{máx}}$ 1,7~2,3 vezes aumento de 1,6~2,0 vezes na biodisponibilidade.	Ratos	SIGFRIDSSON et al., 2011.
Aprepitanto Classe II/IV	ME	Nanossuspensão (120 nm)	Suspensão (5 µm)	Estado alimentado não alterou a biodisponibilidade nas dosagens de 2 mg/kg, 80 mg/kg and 125 mg/kg.	Cães Beagles	WU et al., 2004.
AZ68 Classe II	ME PRE	Nanossuspensão cristalina (125 nm) Nanossuspensão amorfa (200 nm)	Solução	NS amorfas possuem maior $C_{\text{máx}}$ e menor $T_{\text{máx}}$, comparadas com as NS cristalinas. Biodisponibilidade semelhante.	Ratos	SIGFRIDSSON et al., 2007.
BMS-488043 Classe II	ME	Nanossuspensão (120 nm)	Comprimidos (<7 µm)	Aumento de 2,6 vezes na $C_{\text{máx}}$ e aumento de 2,5 vezes na biodisponibilidade.	Cães Beagle	FAKES et al., 2009.
Cilostazol Classe II	ME	Nanossuspensão (220 nm)	Suspensão (13 e 2,4 µm)	Razão $C_{\text{máx}}$, $T_{\text{máx}}$ e AUC, nos estados não alimentado e alimentado, reduziu significativamente.	Cães Beagle	JINNO et al. 2006.
Ciclosporina Classe II	HP	Nanossuspensão (962 nm)	Nanopartículas lipídicas (157 nm) Microemulsão Sandimmun®	Resultados não promissores.	Porcos	MÜLLER et al., 2006.
Danazol Classe II	ME	Nanossuspensão (169 nm)	Suspensões (10 µm)	Aumento de 15 vezes na $C_{\text{máx}}$ e aumento de 16 vezes na biodisponibilidade.	Cães Beagle	LIVERSIDGE; CUNDY, 1995.
EMD 57033 Classe II	ME	Nanocristais obtido por <i>spray drying</i> (4,5 µm)	Ciclodextrinas e mistura de micropartículas e lactose	Resultados não promissores. Biodisponibilidade dos nanocristais (26%) menor do que a apresentada pela mistura de micropartículas (39%).	Cães Beagle	VOGT et al., 2008.
Fenofibrato Classe II	HP	Nanossuspensão (356 nm) (194 nm)	Suspensões micronizadas (5 -10 µm) Suspensões grosseiras	Aumento de 1,8~12,5 vezes na $C_{\text{máx}}$, aumento de 1,7~17 vezes na biodisponibilidade, diminuição de 1,3~2,3 vezes no $T_{\text{máx}}$.	Ratos	LI et al., 2009.
Fenofibrato Classe II	HP	Nanossuspensão (340 nm)	Pó (5 µm)	Aumento de 1,67 vezes na $C_{\text{máx}}$, aumento de 1,3 vezes na biodisponibilidade e diminuição de 4,9 vezes no $T_{\text{máx}}$.	Ratos	HANAFY et al., 2007.
Itraconazol Classe II	PRE	Nanossuspensão (267 nm)	Pastilhas contendo micropartículas	Aumento de 1,2~1,8 vezes na $C_{\text{máx}}$, aumento de 1,5~1,8 vezes na biodisponibilidade. Redução significativa na razão da AUC nos estados não alimentado e alimentado.	Ratos	MOU et al., 2011.
Cetoprofeno Classe II	ME	Pastilhas contendo nanocristais (265 nm)	Pastilhas contendo pó microcristalino (65 µm)	Aumento de 1,2 vezes na $C_{\text{máx}}$, 1,1 vezes na biodisponibilidade e diminuição em 2 vezes no $T_{\text{máx}}$.	Cães	VERGOTE et al. 2002.
Naproxeno Classe I/II	ME	Nanossuspensão (270 nm)	Suspensões (20 µm)	Aumento de 1,5 vezes na $C_{\text{máx}}$ e 1,25 vezes na biodisponibilidade e diminuição no $T_{\text{máx}}$.	Ratos	LIVERSIDGE; CONZENTINO, 1995.
Espironolactona Classe II	ME	Nanossuspensão (400 nm)	Dispersões micronizadas (1~5 µm)	Aumento de 3,5~4,5 vezes na $C_{\text{máx}}$ e de 3,3~5,1 vezes na biodisponibilidade.	Ratos	LANGGUTH et al., 2005.
UG558 Classe II	ME	Nanossuspensão (190 nm)	Microsuspensões (12 µm)	Aumento de 3,5~3,7 vezes na $C_{\text{máx}}$ e aumento de 3,6~4,5 vezes na biodisponibilidade.	Ratos	SIGFRIDSSON et al., 2009.

Moagem à alta energia = ME; Homogeneização à alta pressão = HP; Precipitação = PRE; Tempo no qual a concentração plasmática máxima é atingida = $T_{\text{máx}}$; Concentração plasmática máxima $C_{\text{máx}}$ e área sob a curva = AUC. Adaptado de GAO et al., 2012.