UNIVERSIDADE DE SOROCABA
PRÓ-REITORIA ACADÊMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Elis Martin Granato

PREPARAÇÃO E AVALIAÇÃO DE UM SISTEMA GASTRORRETENSIVO FLUTUANTE COM CLORIDRATO DE CIPROFLOXACINO OBTIDO POR DISPERSÃO SÓLIDA BINÁRIA

Sorocaba/SP
2015

Elis Martin Granato

PREPARAÇÃO E AVALIAÇÃO DE UM SISTEMA GASTRORRETENSIVO FLUTUANTE COM CLORIDRATO DE CIPROFLOXACINO OBTIDO POR DISPERSÃO SÓLIDA BINÁRIA

Dissertação apresentada à Banca Examinadora do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade de Sorocaba, como exigência para a obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Orientador: Prof. Dr. Marco Vinícius Chaud

Sorocaba/SP

2015

[ficha catalográfica]

Elis Martin Granato

PREPARAÇÃO E AVALIAÇÃO DE UM SISTEMA GASTRORRETENSIVO FLUTUANTE COM CLORIDRATO DE CIPROFLOXACINO OBTIDO POR DISPERSÃO SÓLIDA BINÁRIA

Dissertação aprovada como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre no Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade de Sorocaba.

Aprovado em: ___/____/_____

BANCA EXAMINADORA:

Ass_____

Prof. Dr Marco Vinícius Chaud

Universidade de Sorocaba

Ass_____

Prof. Dr Robson Machado Oliveira

Universidade de Sorocaba

Ass_____

Prof.ª Drª Marta Maria Duarte Carvalho Vila

Universidade de Sorocaba

AGRADECIMENTOS

RESUMO

A proposta deste estudo foi desenvolver e avaliar um sistema gastrorretensivo flutuante (SGF) para liberação controlada de cloridrato de ciprofloxacino (CPX). O CPX usado neste estudo como fármaco modelo, pertence ao grupo das fluorquinolonas, apresenta um amplo espectro de ação, é melhor absorvido na cavidade estomacal e duodeno proximal. Em pH alcalino, há indicações de que sua biodisponibilidade é reduzida. O método empregado para obtenção do SGF foi por difusão e evaporação do solvente da emulsão. Os SGF foram avaliados, *in vitro*, quanto ao lag time e tempo de flutuação, taxa de carregamento e perfil de liberação do fármaco. A estabilidade do fármaco nas formulações foi avaliada por Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC) e Espectroscopia de Infravermelho com transformada de Forrier (IVTF). A morfologia das partículas foi avaliada por microscopia eletrônica de varredura (MEV). A polidispersidade e o potencial zeta foram medidos por espalhamento dinâmico de luz (DLS). O sistema foi caracterizado por suas propriedades físico-químicas, tais como: ângulo de repouso (Φ), densidade aparente (ρA), densidade forçada (ρF), Índice de Compactação de Carr (ICC) e fator de Hausner (FH). A análise dos resultados mostra que a técnica utilizada foi adequada para obtenção de partículas esféricas, flutuantes, com tamanho médio de 151 nm ±18,0, polidispersidade de 0,4 e potencial zeta de -18. A taxa de carregamento foi de 94,8% ±1,8, a flutuação foi imediata e o tempo de flutuação foi superior a 12 horas. A espectroscopia de IVTF sugere que a estrutura molecular do CPX não foi afetada enquanto as análises de DSC mostra mudança no estado cristalino do fármaco. A liberação do fármaco foi controlada e obedeceu a uma cinética de liberação de ordem zero até à terceira hora e de primeira ordem até vigésima quarta hora. O teste de concentração mínima inibitória mostra que o fármaco encapsulado tem efeito inibitório quando testados em culturas bacterianas, sendo menos eficiente que o fármaco livre. Os ensaios de citotoxicidade mostram uma viabilidade celular de 70%, e que uma maior concentração do fármaco encapsulado pode ser utilizada para causar o mesmo efeito citotóxico do CPX livre em células de fibroblastos de ratos (3T3). A dispersão sólida de Eudragit S100® e álcool polivinílico favoreceu a preparação de nanocarreadores para liberação controlada do cloridrato de ciprofloxacino.

Palavras-chave: Liberação prolongada. Sistemas gastrorretensivos. Dispersão sólida binária. Cloridrato de ciprofloxacino.

ABSTRACT

The purpose of this study was to develop and evaluate a floating gastrorretensivo system (FMS) for controlled release of ciprofloxacin hydrochloride (CPX). The CPX used in this study as a model drug, belongs to the group of fluoroquinolones, presents a broad spectrum of action, is better absorbed in the stomach cavity and proximal duodenum. In alkaline pH, there are indications that its bioavailability is reduced. The method used to obtain the SGF was by diffusion and evaporation of the solvent emulsion. The SGF was evaluated in vitro as lag time and the floating time, loading rate and drug release profile. The stability of the drug in the formulations was evaluated by Differential Scanning Calorimetry (DSC) and Infrared Spectroscopy Forrier transform (FTIR). The particle morphology was evaluated by scanning electron microscopy (SEM). The polydispersity and zeta potential were measured by dynamic light scattering (DLS). The system was characterized by its physical and chemical properties, such as angle of repose (Φ), bulk density (ρA), forced density (ρF), Carr Compression (ICC) and Hausner factor (FH). The analysis shows that the technique is suitable for obtaining spherical, floating particles with an average size of 151 ± 18.0 nm, polydispersity of 0.4 and zeta potential of -18. The loading rate was 94.8% ± 1.8, the fluctuation was immediate and the floating time was over 12 hours. FTIR spectroscopy suggests that the molecular structure of CPX is not affected while the DSC analysis shows a change in the crystalline state of the drug. The drug release was controlled and followed a kinetic of zero order release to the third hour of the first order to the twenty-fourth hour. The minimum inhibitory concentration test shows that the encapsulated drug when tested has an inhibitory effect on bacterial cultures, which are less efficient than the free drug. Cytotoxicity assays show a cell viability of 70% and a higher concentration of encapsulated drug can be used to cause the same cytotoxic effect of free CPX in mouse fibroblast cells (3T3). The solid dispersion of Eudragit S100® and polyvinyl alcohol favored nanocarriers for the preparation of controlled release of ciprofloxacin hydrochloride.

Keywords: Prolonged release. Gastrorretentive systems. Binary solid dispersion. Ciprofloxacin hydrochloride.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Representação esquemática, resumida, dos transportadores nas células do epitélio intestinal. 17
Figura 2 - Fórmula estrutural do cloridrato de ciprofloxacino (CPX). 24
Figura 3 - Microscopia eletrônica de varredura (MEV) das nanoesferas (Magnitude de 1,0 Kx) 44
Figura 4 - Resultados da Espectroscopia de IVTF do CPX, das nanoesferas com o fármaco (NE CPX), nanoesferas sem o fármaco (NE), álcool polivinílico (PVA) e do Eudragit S100 46
Figura 5 - Resultados do DSC da mistura física (MF), álcool polivinílico (PVA), cloridrato de ciprofloxacino (CPX), Eudragit S100 (E-S100), nanoesfera sem o fármaco (NE) e das nanoesferas com o CPX (NE-CPX) 47
Figura 6 - Perfil de dissolução das nanoesferas contendo CPX em HCl 0,1 M adicionado de Tween 80® (0,02%) 48
Figura 7- Gráficos de viabilidade e morte celular. 50
Figura 8 - Resultados das análises de MTT para as nanoesferas (NANO), nanoesferas com o CPX (Fármaco - nano) e o CPX livre (Fármaco) utilizando células 3T3 51

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Micromerítica das nanoesferas com e sem CPX 43
Tabela 2 - Cinética de liberação in vitro das nanoesferas contendo CPX. 48
Tabela 3 - Resultados obtidos nos testes de concentração inibitória mínima (MIC) . 49

LISTA DE ABREVIATURAS

SFG – Sistema gastrorrentenisvo flutuante

CPX- Cloridrato de ciprofloxacino

DSC- Calorimetria exploratória diferencial

IVTF- Infravermelho com transformada

MEV- Microscopia eletrônica de varredura

DLS – Espalhamento dinâmico de luz

FH – Fator de Hausner

ICC – Índice de compactação de Carr

ρA – Densidade aparente

Pf – Densidade forçada

TGI – Trato gastrointestinal

MTT – Sal de brometo 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólico

ATCC- American Type Culture Collection

PVA – Álcool polivinílico

E-S100 – Eudragit S100®

NE – Nanoesfera

NE-CPX - Nanoesfera contendo o cloridrato de ciprofloxacino

MF- Mistura física

USP – Farmacopeia dos Estados Unidos da America

VA – Volume aparente

VF- Volume forçado

EE – Eficiência de encapsulação

MIC – Concentração mínima inibitória

IC50 – Metade da concentração máxima inibitória

LISTA DE SÍMBOLOS

® - Marca registrada

λ - comprimento de onda

λ_{max} - Comprimento de onda máximo

% - Porcentagem

~ - Aproximadamente

Φ - Ângulo de repouso

R^2 - Coeficiente de determinação

r - Constante de correlação linear

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO 12

2 REVISÃO DA LITERATURA 14
2.1 Biodisponibilidade de fármacos 14
2.2 Princípios da absorção de fármacos por via oral 15
2.2.1 Fatores fisiológicos que influenciam a absorção de fármacos 16
2.2.2 Componentes e propriedades dos fluídos gastrointestinais que influenciam na absorção 19
2.3 Esvaziamento gástrico e trânsito intestinal 20
2.4 Otimização das propriedades biofarmacêuticas 20
2.4.1 Sistemas gastrorretensivos para liberação modificada de fármacos 21
2.5 Ciprofloxacino (CPX) 24
2.6 Dispersões sólidas 25
2.6.1 Dispersões sólidas não moleculares 26
2.6.2 Método de evaporação do solvente para preparação de dispersões sólidas 27
2.6.3 Aspectos práticos da formulação de dispersões sólidas 28
2.7 Avaliação da citotoxidade e caracterização físico-química de sistemas particulados gastrorrentensivos flutuantes 29
2.8 Mecanismos de liberação do fármaco nas dispersões sólidas 31

3 OBJETIVOS 33
3.1 Objetivo geral 33
3.2 Objetivos específicos 33

4 MATERIAL E MÉTODOS 34
4.1 Material 34
4.2 Métodos 34
4.2.1 Preparação das dispersões sólidas, nanoesferas e mistura física 34
4.2.2 Teor do CPX por espectrofotometria por ultravioleta 35
4.2.3 Propriedades de fluxo e empacotamento 35
4.2.3.1 Estudo de micromerítica 35
4.2.3.2 Ângulo de Repouso (Φ) 36

4.2.3.3 Densidade aparente e forçada 36
4.2.3.4 Índice de Compressibilidade e Fator de Hausner 37
4.2.4 Microscopia eletrônica de varredura (MEV) 37
4.2.5 Medida de tamanho das nanoesferas e potencial zeta 37
4.2.6 Eficiência de encapsulação 38
4.2.7 Estudo de flutuação das nanoesferas 38
4.2.8 Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (IVTF) 39
4.2.9 Calorimetria exploratória diferencial (DSC) 39
4.2.10 Avaliação, in vitro, da liberação do fármaco nas nanoesferas e cinética de liberação 40
4.2.11 Concentração mínima inibitória (MIC) pela técnica de microdiluição em placa 40
4.2.12 Viabilidade celular por citometria de imagem –Teste de Tali 41
4.2.13 Redução de MTT 42

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO 43
5.1 Curva analítica de Ciprofloxacino usada para o Teor 43
5.2 Propriedades de fluxo e empacotamento 43
5.3 Microscopia eletrônica de varredura (MEV) 44
5.4 Tamanho das partículas e potencial zeta 44
5.5 Eficiência de encapsulação (EE) e flutuação das nanoesferas 45
5.6 Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (IVTF) 45
5.7 Calorimetria exploratória diferencial (DSC) 46
5.8 Avaliação, in vitro, da liberação do fármaco e cinética de liberação 47
5.9 Concentração mínima inibitória (MIC) 49
5.10 Análise de Tali – Viabilidade celular 49
..... 50
5.11 Redução de MTT 50

6 CONCLUSÃO 52

REFERÊNCIAS 53

1 INTRODUÇÃO

A via oral é a mais utilizada para administração de medicamentos, devido sua facilidade, comodidade e melhor adesão do paciente. Contudo, a administração oral envolve uma grande complexidade na interpretação de elementos importantes, tais como o fármaco, a forma farmacêutica e o sistema gastrointestinal. Alguns fármacos apresentam melhores efeitos quando ficam um maior tempo no local de melhor absorção. Assim, estes fármacos devem ser formulados em formas farmacêuticas de liberação modificada ou liberação prolongada. Os estudos com formas de liberação modificada progrediram nos últimos anos. As formas farmacêuticas de liberação prolongada permitem manter uma concentração sistêmica de fármaco dentro da janela terapêutica por um longo período de tempo, permitindo assim reduzir o número de administrações. Porém, o funcionamento desses sistemas está condicionado ao trânsito através do trato gastrointestinal (TGI), qual é variável, particularmente através do estômago e cólon.

Várias estratégias têm sido feitas para prolongar o tempo de retenção da forma de dosagem no estômago. As estratégias que utilizam sistemas baseados na densidade, expansão de volume e mucoadesão ganham maior destaque. Um sistema gastrorretensivo flutuante (SGF) é um modelo de liberação particularmente interessante para fármacos que têm ação local no estômago ou são primariamente absorvidos no estômago e no duodeno proximal, ou que degradam no pH mais alcalino do intestino.

O fármaco modelo escolhido para o estudo desenvolvido foi o cloridrato de ciprofloxacino (CPX), uma fluorquinolona de segunda geração, melhor absorvido em meio ácido (pKa 6,09) após a administração oral, a biodisponibilidade é de aproximadamente 70% e a meia vida é de 4 horas. Estas características fazem do CPX um fármaco candidato para sistemas de liberação controlada. No entanto a alta solubilidade do CPX em água é um fator limitante para controlar o perfil de liberação.

A tecnologia das dispersões sólidas tem sido tradicionalmente utilizada para melhorar a taxa de dissolução de fármacos. Quando a solubilidade do fármaco em água é alta um dispersante hidrofóbico é requerido para promover a liberação controlada.

O objetivo deste trabalho foi desenvolver um sistema gastrorretensivo flutuante com cloridrato de ciprofloxacino obtido por dispersão sólida binária com Eudragit S100® e álcool polivinílico.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Biodisponibilidade de fármacos

A biodisponibilidade de fármacos é a medida da taxa de absorção e da extensão de fármaco absorvido a partir de uma determinada forma farmacêutica. A finalidade dos sistemas de liberação para absorção controlada do fármaco é garantir melhor atividade terapêutica e maior segurança ao usuário de medicamentos (TIHANYI; VASTAG, 2011).

Cada via de administração de fármacos apresenta considerações biofarmacêuticas especiais. Um projeto de formulação de comprimidos para administração por via oral deve considerar as condições do trato digestório, os diferentes valores de pHs, complexos enzimáticos, a microbiota estomacal e intestinal, a taxa de esvaziamento gástrico e taxa de trânsito intestinal, o volume de fluído em cada compartimento e os sistemas celulares de efluxo (YOSHIDA et al., 2011).

A absorção sistêmica de fármacos a partir de um compartimento extravascular é influenciada tanto pela anatomia e propriedades fisiológicas do órgão como pelas propriedades físico-químicas do fármaco, da forma farmacêutica e do sistema de liberação. Essas características influenciam a biodisponibilidade do fármaco e, consequentemente a reprodutibilidade da ação terapêutica. A absorção pode variar de rápida e completa para uma taxa lenta e sustentada ou mesmo para nenhuma absorção, dependendo do objetivo final do produto terapêutico. Ao escolher a via de administração do fármaco, a forma farmacêutica ou o dispositivo de administração devem ser cuidadosamente projetados para que a biodisponibilidade possa ser adequada com vista ao efeito pretendido. A taxa de liberação do fármaco a partir da forma farmacêutica, e a taxa e extensão da absorção são importantes na determinação da distribuição, início, intensidade e duração da ação do fármaco (AMIDON et al., 1995).

Para uma forma farmacêutica sólida de liberação imediata os eventos incluem desintegração completa da forma farmacêutica e consequente liberação e dissolução do fármaco e passagem das moléculas através do epitélio do TGI para alcançar a circulação sistêmica. No processo de desintegração, dissolução e absorção, a taxa do fármaco que atinge o sistema circulatório é determinada pela

etapa mais lenta desta sequência de eventos. A etapa mais lenta de uma série de processos cinéticos é chamada de taxa limitante (COLOMBO et al., 1996).

Para fármacos que exibem uma boa solubilidade em água, a taxa de dissolução é frequentemente a etapa mais rápida do processo e, portanto um fator limitante na liberação controlada de fármacos (BALASUBRAMANIAM et al., 2010). Várias estratégias têm sido utilizadas para melhorar a biodisponibilidade de fármacos pouco solúveis em água. Entre estas destacam-se as dispersões sólidas com compostos pouco solúveis em água.

Em adição aos efeitos sobre a cinética de dissolução, as propriedades físicas e químicas do fármaco, assim como dos excipientes são importantes tanto no projeto como no desempenho da forma farmacêutica. Estratégias que modificam a solubilidade dos fármacos possibilitam alternativas para formulação de medicamentos (SETHIA; SQUILLANTE, 2003; RAMANA et al., 2011). Além da solubilidade intrínseca, propriedades físico-químicas como pH, pKa, coeficiente de partição, tamanho de partícula, polimorfismo, higroscopicidade e interação com excipientes, afetam tanto a taxa de dissolução como a permeação e a estabilidade do fármaco em meio biológico. Outras estratégias para melhorar a ação terapêutica e a segurança de fármacos envolvem ações de encapsulamento (CINTO et al., 2009; DA SILVA et al., 2009; FERRARI et al., 2012).

2.2 Princípios da absorção de fármacos por via oral

A via oral para administração de medicamentos é conhecida como aquela que apresenta resultados mais erráticos e menos eficientes entre as terapias medicamentosas. No entanto, a ampla maioria das formas farmacêuticas é projetada para administração por via oral, primariamente pela facilidade de administração e maior índice de adesão ao tratamento (SOUZA et al. 2007). Para a maior parte dos medicamentos administrados por via extravascular, os fatores primários que influenciam de forma mais decisiva a absorção dos fármacos e, portanto, governam a eficácia da terapia medicamentosa, são de origem físico-química, fisiológica e/ou anatômica são inerentes à forma farmacêutica usada. Em geral, quanto mais rápida e completa a absorção, mais uniforme e reprodutível é a resposta farmacológica. Por outro lado, quanto maior o tempo de retenção do fármaco no local ótimo de

absorção, maiores são as chances de alcançar e manter por longo tempo a concentração efetiva mínima, para o efeito terapêutico desejado.

O TGI é uma região altamente especializada do corpo humano cuja função primária envolve processos de secreção, digestão e absorção e exerce uma importante função de proteção contra a penetração de compostos xenobióticos. Embora clássica, a definição mais apropriada de absorção por via oral é aquela que reflete a permeação do fármaco através da membrana e o aparecimento do mesmo, na forma inalterada, na corrente circulatória. Esta definição, além de fazer uma distinção clara entre biodisponibilidade e absorção, destaca dois aspectos importantes (VAN ITALLIE; ANDERSON, 2006).

Embora a permeação através da membrana seja a primeira etapa da absorção, projeções sobre as propriedades do fármaco ou sobre os sistemas de liberação que o veiculam devem ser previamente estabelecidas. Portanto, durante a fase de desenvolvimento de formulações para fármacos conhecidos ou modificações nos sistemas de liberação existentes, é importante usar modelos de estudo*, in vitro*, que durante esta fase, confirmem ou não as projeções feitas com relação à permeação através das membranas do trato gastrointestinal (CHAUD et al., 2013).

2.2.1 Fatores fisiológicos que influenciam a absorção de fármacos

Qualquer fármaco, do ponto de vista biológico, é considerado um xenobiótico. Portanto, durante a rota percorrida antes da absorção, o destino do fármaco no corpo humano é modulado por fatores fisiológicos, anatômicos e/ou patológicos. Em condições normais, os fatores fisiológicos são, em última instância, os responsáveis pela absorção, degradação, transformação e eliminação do fármaco (AMIDON, 1995).

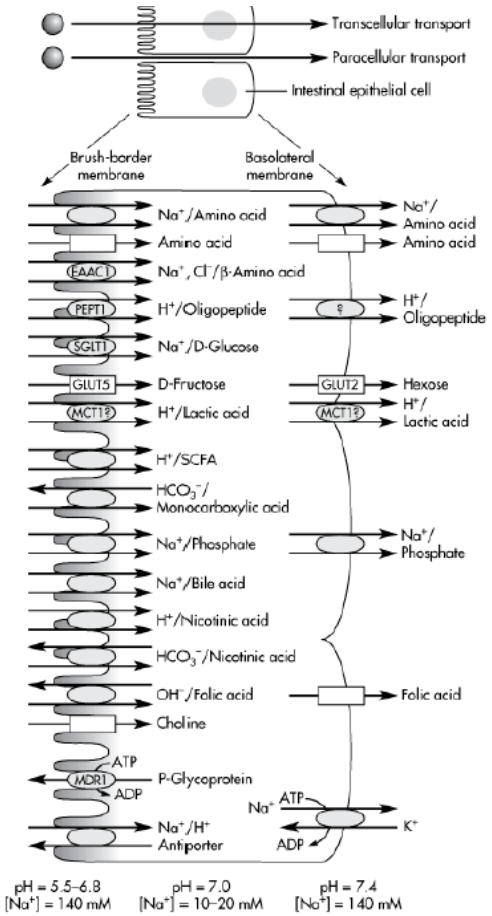
Junto com as propriedades físico-químicas do fármaco, a natureza do produto farmacêutico incluindo forma e fórmula farmacêutica, bem como as particularidades das vias de administração, precisam ser cuidadosamente investigadas. Todos estes aspectos são importantes no desenvolvimento, fabricação, controle e avaliação biofarmacêutica de medicamentos (ABDOU, 1989).

Embora a fisiologia das vias de administração difira entre si, o princípio geral e a cinética de absorção são semelhantes. Antes de induzir atividade biológica e terapêutica, a maioria dos fármacos administrados por via extravascular é destinada

a ser absorvida do local de administração para a circulação sistêmica, para em seguida difundir ou ser transportada para o local de ação (TSUJI; TAMAI, 1996).

A Figura 1 mostra, de forma esquemática, um esboço dos transportadores do epitélio intestinal. Os retângulos representam o transporte ativo, e as figuras ovais a forma facilitada de transporte. No caso dos transportadores ativos, as setas na direção da superficie basolateral da membrana, representam o transporte de substâncias e a força propulsora. Setas indicando sentido inverso significam entrada e saída das células, sem alcançarem a circulação sistêmica. Setas no sentido da superficie com vilosidades (*brush-border membrane*) representam efluxo do fármaco do interior da célula (SHARGEL et al., 2012).

Figura 1 - Representação esquemática, resumida, dos transportadores nas células do epitélio intestinal.



Nota: O retângulo representa o transporte ativo e a figura oval representa a forma facilitada de transporte.
Fonte: Shargel et al., 2012.

As formas de transporte representadas na Figura 1 não são as únicas a serem consideradas, sendo que outras formas como transporte vesicular (pinocitose e fagocitose), conectiva e formação íon-par (ligação molécula ionizada) também transportam moléculas de fármacos através da membrana epitelial (NIENBERT, 1989).

Os transportadores transmembranas também são elementos de proteção contra compostos não endógenos ou desnecessários à manutenção do equilíbrio vital. Em contraste direto com estes transportadores de absorção especializados, que transportam compostos para dentro das células epiteliais, encontram-se os transportadores de efluxo, os quais eliminam as substâncias nocivas ou desconhecidas do interior para fora das células (VAN ASPEREN; VAN TELLINGEN; BEIJNEN, 1998).

Os transportadores de efluxo influenciam negativamente a absorção de fármacos. Este fenômeno explica a resistências de células cancerosas a alguns agentes quimioterápicos e a absorção limitada de fármacos cujas características físico-químicas dão uma medida de boa absorção. Quarenta e oito diferentes tipos de transportadores deste tipo estão codificados no genoma humano, formando sete subfamílias. Estes transportadores estão presentes nas células epiteliais de praticamente todos os sistemas orgânicos, incluindo o trato gastrointestinal, fígado, pulmão, rim e cérebro (MIZUNO et al., 2003). O transportador de efluxo mais importante é a P-glicoproteína (P-gp), uma proteína multirresistente a fármacos, a qual é responsável pelo mecanismo de eliminação de fármacos do interior das células epiteliais (DRESCHER et al., 2003; GOTTESMAN; AMBUDKAR; XIA, 2009).

Utilizando estratégias biofarmacotécnicas, a eliminação de fármacos por esta via tem sido minimizada através da saturação do sistema de efluxo, interações fármaco-fármaco mediadas pelo citocromo P450 (CYP450), nutriente-fármaco ou coadministração de fármacos com excipientes que sejam substrato inibidor para as P-gp (CRIVORI; POGGESI, 2006; GHOBAD et al., 2010; VAN ASPEREN; VAN TELLINGEN; BEIJNEN, 1998). As células intestinais, também são ricas em enzimas metabolizantes, especialmente aquelas responsáveis pelo metabolismo oxidativo de fase I, dentre as quais a isoenzima CYP3A4. Tanto as isoenzimas como a P-gp concorrem pelo mesmo substrato e estão presentes nos mesmos locais, sendo que podem ser estrategicamente inibidas pelos mesmos mecanismos (WACHER; SALPHATI; BENET et al., 2001).

Alguns esforços com o objetivo de estabelecer uma relação entre a estrutura molecular e os principais sítios metabólicos, com maior probabilidade de alterações sobre a absorção, podem ser encontrados na literatura (CRIVORI; POGGESI, 2006; GOTTESMAN; AMBUDKAR; XIA, 2009; KORZEKWA; JONES; GILLETTE, 1990). Esta abordagem é de grande interesse biofarmacotécnico, uma vez que pode sugerir, durante a fase de projeto de desenvolvimento do medicamento, por exclusão, a via mais adequada para a sua administração (AFZELIUS et al., 2007).

2.2.2 Componentes e propriedades dos fluídos gastrointestinais que influenciam na absorção

Fármacos administrados oralmente passam através de vários compartimentos do TGI, incluindo a cavidade oral e esôfago. O tempo total de trânsito, incluindo o esvaziamento gástrico, intestino delgado e cólon, varia de 6,0 horas a 5,0 dias (KIRWAN; SMITH, 1974). O lúmen do trato gastrointestinal contém fluído digestivo, cujo volume varia, significativamente, em cada compartimento. A perda de volume e/ou do efeito solubilizante do quimo e dos fluídos digestivos contribuem para uma redução da taxa de absorção. As características aquosas do fluído do trato gastrointestinal ao qual o medicamento é exposto exercerá uma influencia significativa sobre os eventos que se sucederão sobre a forma farmacêutica e sobre o padrão de absorção. Para compreender como os fatores fisiológicos influenciam a absorção de fármacos, é preciso considerar a influência destas variáveis sobre a forma farmacêutica e como estas influenciam a taxa de dissolução do fármaco no fluído aquoso. A influência que estas variáveis exercem sobre a absorção pode ser abordada, por um lado, a partir das propriedades do fármaco e, por outro, a partir das propriedades fisiológicas (KIRWAN; SMITH, 1974).

Uma propriedade importante do fluído gastrointestinal é o gradiente de pH, o qual varia consideravelmente ao longo do trato digestivo. O pH do fluído gástrico varia entre 1,0 – 3,0, sendo mais ácido à noite do que no decorrer do dia. Durante a ingestão de alimentos, o pH pode chegar a 5,0. Este perfil de pH pode sofrer variações interindividuais, depender do estado de saúde, tipo de alimentação e terapia medicamentosa. O pH do fluído intestinal aumenta, gradualmente, em direção à porção distal, de 4,5-7,0, podendo chegar a 7,4 no íleo distal (ROUGE; BURI; DOELKER, 1996).

2.3 Esvaziamento gástrico e trânsito intestinal

O esvaziamento gástrico é um evento fisiológico que, na ausência de alimentos, é controlado por um complexo sistema mioelétrico. Este complexo resulta na geração de contrações que iniciam no estômago e terminam no íleo, e pode ser diferenciado em 4 fases (MINAMI; MCCALLUM, 1984; YOSHIDA et al., 2011). O interesse biofarmacotécnico no esvaziamento gástrico é baseado no fato de que, fármacos melhor absorvidos no estômago ou no duodeno proximal ou, ainda, aqueles que precisam ser dissolvidos no pH ácido do estômago antes de serem absorvidos no trato intestinal, podem ter sua biodisponibilidade comprometida em função do tempo decorrido entre a tomada do medicamento e o esvaziamento gástrico, sobretudo das formas farmacêuticas sólidas (COLLET; FELL; WHITEHEAD, 2000).

Formas farmacêuticas, líquidas e sólidas, são influenciadas de maneira diferente. As soluções podem deixar o meio gástrico em qualquer fase do complexo mioelétrico migratório. Cápsulas e especialmente comprimidos ingeridos em jejum permaneceriam no estômago por um dado período de tempo, necessário para completar o ciclo mioelétrico. Assim, se ingerido ao final do ciclo, o tempo de residência seria de aproximadamente 15 minutos; se ingerido após a 1ª fase do ciclo, o tempo de residência seria de no mínimo duas horas. Esta variabilidade no tempo de residência gástrica pode explicar algumas variações interindivíduos na absorção e também para um mesmo indivíduo nas doses ingeridas, em tempos diferentes, ou dias subsequentes (WILLMANN et al., 2009). Nestas condições, o medicamento ingerido estará submetido, duas ou três vezes ao dia, a condições de pH e tempo de residência variados em cada compartimento do trato gastrointestinal. Para um número maior de doses diárias, é possível que uma dose seja ingerida sem que a anterior tenha deixado o estômago (THELEN et al., 2012).

2.4 Otimização das propriedades biofarmacêuticas

As propriedades biofarmacêuticas das moléculas podem ser melhoradas por modificações químicas ou manipulação farmacêutica, tanto do estado sólido do fármaco como através de procedimentos farmacotécnicos e/ou tecnológicos.

A modificação química inclui a incorporação de grupos polares e ionizáveis, criação de pró-fármacos ou formação de sais, com intenção de alterar as propriedades físico-químicas do composto, no entanto, sem alterar o efeito farmacológico (CHAUD et al., 2002). A manipulação farmacêutica do estado sólido tem como finalidade tanto a modificação do estado cristalino, com a redução granulométrica e aumento da molhabilidade, que na maioria das vezes envolve o uso de um agente carreador mais hidrossolúvel (CHAUD et al., 2010; CORREA et al., 2011; MEKA et al., 2012; SUN et al., 2008; TRAN et al., 2010). A manipulação da forma e fórmula farmacêutica usa diferentes excipientes e/ou procedimentos tecnológicos para melhorar a biodisponibilidade dos fármacos. A finalidade desta manipulação mais específica é modificar a via de administração, e modular a liberação, a taxa de dissolução e a absorção do fármaco (CINTO et al., 2009; FERRARI et al., 2012; YOSHIDA et al., 2011).

2.4.1 Sistemas gastrorretensivos para liberação modificada de fármacos

O tempo de permanência do fármaco no estômago e duodeno pode limitar a biodisponibilidade de compostos administrados por via oral e pode ser um grande obstáculo ao desenvolvimento de formulações de liberação controlada para um grupo importante de fármacos. Métodos para aumentar a residência de formulações de fármaco na, ou acima do, tempo de absorção, estão sendo discutidos (GATTANI, 2010).

Sistemas gastrorretensivo tem sido utilizado para melhorar a biodisponibilidade de fármacos que são melhor absorvidos em meio ácido. Sistemas gastrorretensivos ideais podem ser definidos como “sistemas de liberação modificada que retêm a forma farmacêutica no estômago durante um intervalo de tempo suficiente para evitar algumas barreiras fisiológicas desfavoráveis, e garantir em a liberação do fármaco de uma forma controlada (RATHEE et al., 2012).

A melhoria no desenvolvimento de sistemas de liberação modificada depende também da seleção de um agente apropriado capaz de controlar a liberação do fármaco, sustentar a ação terapêutica durante um longo período de tempo e/ou de liberar o fármaco ao nível de um determinado tecido ou órgão-alvo. Dentro das várias opções, os polímeros são adjuvantes farmacotécnicos versáteis e promissores para exercer tais funções (LOPES; LOBO; COSTA, 2005). Polímeros

naturais, naturais modificados e sintéticos, são empregados como excipientes farmacêuticos para a formulação de cosméticos e medicamentos de liberação convencional e liberação modificada. Atualmente, uma das funções dos polímeros é atuar como moduladores e direcionadores da liberação de fármacos em locais específicos no organismo (VILLANOVA; OREFICE; CUNHA, 2010).

A escolha adequada dos agentes controladores da liberação do fármaco deve fornecer uma combinação apropriada dos mecanismos de intumescimento, desintegração ou erosão, os quais determinarão a cinética de liberação a partir de formas farmacêuticas sólidas (BARROCAS et al., 2007).

Diferentes estratégias estão sendo estudadas para obtenção de um sistema gastrorretensivo para liberação prolongada de fármacos. Entre essas estratégias destacam-se a densidade maior ou menor que o do fluido gástrico, expansão do volume e mucoadesão (CHEN et al., 2012; CHAWLA et al., 2003; HOFFMAN et al., 2004; KLAUSNER et al., 2003; SINGH, 2000; TADROS, 2009; YOSHIDA et al., 2011).

O sistema gastrorretensivo flutuante (SGF) é um modelo de liberação particularmente interessante para fármacos que exercem ação local no estômago ou são primariamente absorvidos no estômago e duodeno proximal, ou são passiveis de degradação no duodeno distal, jejuno, íleo ou cólon (JAIN; AGRAWAL; JAIN 2006).

Os SGF têm densidades inferiores à do fluido gástrico, e por isso, flutuam no meio estomacal por períodos longos de tempo, sem serem afetado pela taxa de esvaziamento gástrico. Enquanto o sistema está flutuando no conteúdo gástrico, o fármaco é liberado de forma controlada, diminuindo a variação da concentração plasmática do fármaco (SHAH et al., 2009).

Por outro lado, os sistemas de alta-densidade têm como objetivo alojarem-se no ambiente do estômago e resistirem aos movimentos peristálticos. Estes sistemas possuem uma densidade superior ou igual a 1,3 $g.mL^{-1}$, que é superior à densidade do fluido gástrico (BECHGAARD; BAGGESEN, 1980).

A bioadesão tem sido referida como a adesão entre um material sintético ou natural e a superfície de um tecido, nomeadamente o epitélio da mucosa. O termo mucoadesão é utilizado quando a adesão ocorre entre o material e a camada de muco que reveste a mucosa (EDSMAN; HAGERSTROM, 2005; LEE; PARK; ROBINSON, 2000; PARK; ROBINSON, 1984; SMART, 2005).

As grandes vantagens da utilização deste conceito no desenvolvimento de formas farmacêuticas de administração oral residem na capacidade de prolongar o tempo de residência no local de absorção do fármaco, permitindo a sua completa dissolução e posterior absorção. Além disso, permitem criar um contacto mais próximo entre a forma farmacêutica e a membrana absorvente, reduzindo a barreira de difusão e protegendo o fármaco da degradação no lúmen do trato gastrointestinal (GRABOVAC; GUGGI; BERNKOP-SCHNURCH, 2005; HARRIS et al., 1990; PARK; ROBINSON, 1984). A vantagem final seria permitir um regime de administração única diária, aumentando a adesão à terapêutica e reduzindo os efeitos adversos (LEE; PARK; ROBINSON, 2000).

Os sistemas intumescíveis possuem polímeros que intumescem quando em contato com o fluído gástrico com expansão do volume, de modo que não consigam passar livremente pelo piloro. Assim, o sistema fica retido no estômago por um longo período de tempo. O equilíbrio entre o intumescimento e a velocidade de degradação do polímero é essencial para se obter uma boa resposta farmacológica e evitar efeitos secundários (BETTINI et al., 2001).

Microesferas ou nanoesferas flutuantes têm sido utilizadas para obtenção de liberação prolongada e uniforme, de fármacos no estomago (PANDYA; PANDYA; BHASKAL, 2011; DEO; ANDREAZZA; POSSAMAI, 2011), e também são utilizadas beneficamente para alterar a absorção de fármacos, melhorando a sua biodisponibilidade.

Segundo Kawashima et al. (1992), os sistemas multiparticulados flutuantes podem dispersar como unidades individuais no estômago, e por esta razão eles apresentam um longo tempo de permanência no meio estomacal em comparação com um sistema monolítico. Entre os sistemas multiparticulados, a microencapsulação em sistemas denominados de microbalões pode ser usada como um dos métodos para encapsular e liberar o fármaco de forma controlada (RAO; SENAPATI; DAS, 2005).

O método de difusão e evaporação do solvente tem sido muito utilizado na obtenção de microesferas e nanoesferas, na obtenção de sistemas de liberação prolongada de fármacos (GARUD; GARUD, 2012; KUMAR; RAI, 2012; SHAHZAD; UBAID; MURTAZA, 2012).

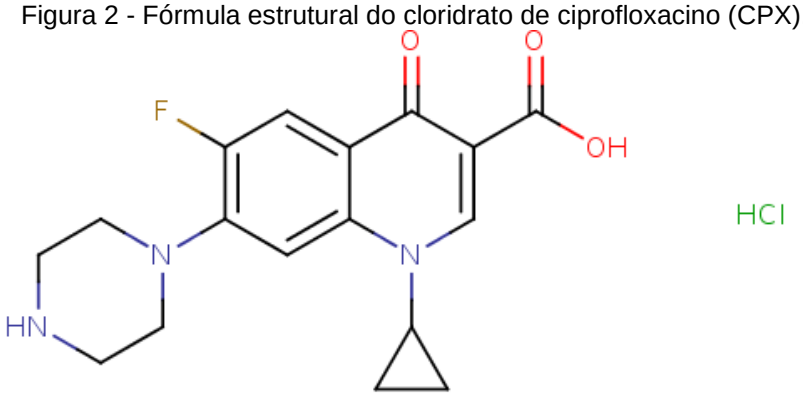
Kawashima et al. (1989; 1992) demonstraram que, fazendo uso do método de difusão e evaporação do solvente de uma quase-emulsão, podem ser produzidas

microesferas flutuantes de liberação controlada com polímeros coprecipitados com fármaco. Este método permite controlar o diâmetro das microesferas, independentemente das características do fármaco a ser encapsulado. A microesfera é produzida via gota coacervada, apresentando como fatores mais determinantes para o tamanho as concentrações de fármaco e de polímero na formulação e a velocidade de agitação do sistema. No processo de preparação das microesferas, o método de difusão e evaporação do solvente da quase-emulsão pode evitar tanto o aquecimento do sistema como o uso de solventes nocivos ao meio ambiente e surfactantes iônicos (KAWASHIMA et al., 1989; 1992; YOSHIDA, et al., 2011).

2.5 Ciprofloxacino (CPX)

O CPX faz parte do grupo das fluoroquinolonas (ver Figura 2), que são um grupo de compostos quimioterápicos de origem sintética, cujo nome químico é ácido 1-ciclopropil-6-flúor-1,4-diidro-4-oxo-7-(1-piperazinil)-3-quinolona carboxílico, também conhecido pela sigla BAY-O-9867. Seu sal, na forma de cloridrato, tem registro no *Chemical Abstracts Service* (CAS) com o número 86393-32-0 (O'NEIL, 2006). É caracterizado pela eficácia terapêutica e farmacológica promissora; tem sido aprovadas, inicialmente, para o tratamento de infecções oculares (STROMAN, 2005).

Figura 2 - Fórmula estrutural do cloridrato de ciprofloxacino (CPX).



Fonte: Drug Bank, 2014.

O ciprofloxacino apresenta amplo espectro de ação e é eficaz *in vitro* contra patógenos Gram-negativo, incluindo *Pseudomonas aeruginosa,* e contra Gram-positivos, como estafilococos e estreptococos. Os anaeróbios são, em geral, menos sensíveis a este fármaco (SILVA et al., 2003). O CPX é melhor absorvido em meio ácido (pKa 6,09) após a administração oral, a biodisponibilidade é de aproximadamente 70% e a meia vida é de 4 horas, e sua solubilidade em água é 1,35mg/L.

O ciprofloxacino é uma fluoroquinolona de segunda geração, disponível nas formas farmacêuticas solução oftálmica, pomada oftálmica, comprimido e comprimido revestido, solução para infusão e solução injetável (VADE-MÉCUM, 2014).

A importância de desenvolver novas formas farmacêuticas para este fármaco é justificada por seu potencial terapêutico, grande emprego em terapias antimicrobianas e seu baixo custo, assim como pelo conhecimento de que a baixa qualidade dos produtos anti-infecciosos está relacionada ao desenvolvimento de cepas microbianas resistentes, como consequência da administração de doses subterapêuticas.

2.6 Dispersões sólidas

A tecnologia das dispersões sólidas consiste em dispersar dois ou mais compostos químicos no estado sólido. Dependendo da finalidade, a formulação de uma dispersão sólida pode ocorrer entre fármaco e excipiente (também chamado de dispersante ou carreador), ou entre excipientes. Neste último caso, a dispersão é realizada com o objetivo de melhorar a funcionalidade dos excipientes dispersos entre si. Quando a dispersão é entre fármacos e excipientes, o objetivo é aumentar a taxa de dissolução, melhorar a estabilidade e/ou promover a liberação modificada de fármacos (BIKIARIS, 2011).

Atualmente, esta tecnologia engloba não apenas o tradicional processo de coprecipitação mas também a obtenção de nanopartículas, microcápsulas e outras dispersões de fármacos em polímeros (HU et al, 2004; MAHESHWARI; JAGWANI, 2011; SRINARONG et al., 2011). Entre estas técnicas, as formulações em nanosuspensão e dispersão sólida são aquelas que têm apresentado maior grau de interesse (BIKIARIS, 2011).

A primeira publicação sobre o conceito e as vantagens das dispersões sólidas foi publicada hà mais de 50 anos (SEKIGUCHI; OBI, 1961), e subsequentemente muitos estudos de pesquisa e trabalhos de revisão têm sido publicados sobre o assunto. Contudo, apesar das vantagens destas formulações, muitos problemas nesta área ainda precisam ser resolvidos (SERAJUDIN, 1999), principalmente o uso de solventes tóxicos e a formação de complexos. Por esta razão, o uso de novos procedimentos técnicos e novas matérias primas aumentará nos próximos anos (BIKIARIS, 2011).

O termo “coprecipitado” ou “coevaporado” tem sido frequentemente utilizado para descrever a preparação de dispersões sólidas pelo método do solvente. Entretanto, a definição deve ser ampliada para incluir certas nanopartículas, microcápsulas, microesferas e dispersões preparadas por fusão, fusão-solvente, extrusão, *electrospinning*, irradiação de micro-ondas, condições supercríticas e uso de nanopartículas inorgânicas (CHAUD et al., 2010; KAROLEWICZ et al., 2012; SETHIA; SQUILLANTE, 2003; WANG et al., 2005).

O termo “dispersão sólida” descreve uma família de formas farmacêuticas onde um ou mais fármacos estão dispersos em um carreador ou matriz biologicamente inerte no estado sólido (SERAJUDIN, 1999). Desta forma, com base nas características físico-químicas do fármaco após interação com o carreador, as dispersões sólidas foram classificadas em seis grupos: mistura eutética, solução sólida, solução vítrea, precipitado amorfo, complexo e a combinação destes grupos (CHIOU; RIEGELMAN, 1971). No entanto, os conceitos que tentam explicar o comportamento destes grupos não são muito claros, exceto para a diferença entre mistura eutética e solução sólida.

2.6.1 Dispersões sólidas não moleculares

As dispersões sólidas não moleculares são denominadas somente por dispersões sólidas (DS).

As DS diferem das soluções sólidas quando o fármaco está presente como uma fase separada dentro do carreador. Chokshi et al. (2007), em estudo comparativo de soluções sólidas e dispersões sólidas concluiram que a taxa de dissolução do fármaco nas soluções sólidas é maior do que nas dispersões sólidas. No entanto, a biodisponibilidade *in vivo* usando cães da raça beagle foi maior nas

dispersões sólidas, bem como a estabilidade química destas formulações após teste de envelhecimento forçado. Embora estes autores tenham utilizado carreadores diferentes para as formulações de solução sólida (polivinilpirrolidona K30) e dispersão sólida (poloxâmero 188), concluíram que “as dispersões sólidas seriam mais adequadas para melhorar a taxa de dissolução e, consequentemente, a biodisponibilidade de fármacos pouco solúveis em água” (CHOKSHI et al., 2007).

Estudo com carbamazepina, utilizando como carreador a hidroxipropilmetilcelulose 6 Cp, polivinilpirrolidona K30 e poloxâmero 407, mostrou que para uma formulação 1:1 (carbamazepina:carreador), o retículo cristalino da carbamazepina na dispersão sólida com poloxâmero se manteve inalterado. Com os outros dois carreadores, a formulação apresentou segundo os autores, uma tendência para interação molecular, e converteu o fármaco para um estado amorfo estável (RONI et al., 2011).

2.6.2 Método de evaporação do solvente para preparação de dispersões sólidas

No método de evaporação do solvente, o fármaco e o carreador são dissolvidos em um solvente comum seguido da evaporação do solvente para obtenção de um precipitado (resíduo sólido). O coprecipitado é seco para eliminar resíduo de solvente aderido na superfície das partículas. Entretanto, há a possibilidade de formação de solvato com qualquer um dos constituintes, retendo solvente no interior das partículas (ASSIS et al., 2012).

A natureza do solvente, a taxa de cisalhamento e temperatura de evaporação do solvente são particularmente críticas neste método. A evaporação do solvente a taxas maiores ou menores depende da técnica utilizada para secagem. Geralmente, a remoção do solvente é realizada por aquecimento a baixa pressão, por liofilização, *spray drying* ou extração supercrítica (ASSIS et al., 2012).

A principal vantagem do método de evaporação é que a degradação térmica pode ser prevenida, uma vez que a temperatura requerida para a evaporação do solvente é relativamente baixa. Por outro lado, é difícil selecionar um solvente comum ao fármaco hidrofóbico e ao carreador hidrofílico (ASSIS et al., 2012).

2.6.3 Aspectos práticos da formulação de dispersões sólidas

Na formulação das dispersões sólidas, por qualquer técnica, é necessário considerar a escolha do carreador, a proporção entre fármaco e carreador, as propriedades físico-químicas para caracterização do produto e permeação transmembranar. Os critérios básicos de escolha do carreador estão direcionados para compostos que possam aumentar a taxa de dissolução do fármaco, sejam atóxicos, farmacologicamente inativos, física e quimicamente estáveis ou que possam controlar a liberação do fármaco. Os carreadores poliméricos como a polivinilpirrolidona, o álcool polivinílico, o polietilenoglicol, o óleo de castor hidrogenado, os derivados da celulose, os Poloxamer, o glicolato sódico de amido, o Kollidon R^{R}, a gelucire, a crospovidona, e o glicolato sódico de amido, têm sido preferidos em relação a outros com moléculas menores de ácidos orgânicos ou açúcares (BIKIARIS, 2011).

A formulação ótima de fármaco-carreador(es) requer conhecimentos sobre a solubilidade do fármaco no carreador e o mecanismo de inibição de crescimento do cristal, os quais em última análise devem controlar a estabilidade do produto. Parâmetros de solubilidade e análises térmicas fornecem informações úteis para prever a miscibilidade do fármaco com o excipiente dissolvido ou fundido (FORSTER et al., 2001; LANGER et al., 2003).

Não existe uma proporção definida entre o fármaco e o carreador para alcançar um resultado ótimo, sendo que as combinações binárias ou terciárias devem ser estudadas caso a caso (KARAVAS et al., 2007). Em geral uma taxa alta fármaco:carreador forma pequenos cristais de fármaco dentro da matriz com pouco resultado prático em relação à solubilidade. No entanto, quando a taxa fármaco:carreador é baixa, tendem a formar compostos onde o fármaco está molecularmente disperso e no estado amorfo (JANSSENS et al., 2008).

No entando, se a solubilidade do fármaco é muito baixa, uma fração alta do carreador é requerida para liberar o fármaco no estado solubilizado. Quando a solubilidade do fármaco em água é alta, um carreador menos solúvel em água é requerido, em maior concentração, para promover uma liberação controlada do fármaco (LEUNER; DRESSMAN, 2000).

2.7 Avaliação da citotoxidade e caracterização físico-química de sistemas particulados gastrorrentensivos flutuantes

A biocompatibilidade de um material pode ser definida como a capacidade do mesmo em desenvolver funções específicas sem causar danos ao organismo. O teste de citotoxicidade consiste na primeira fase de avaliação da biocompatibilidade de um material a ser utilizado no corpo humano (CHAI et al., 2010). Os testes *in vitro* podem não representar a situação clínica real de um material, mas introduzem resultados quanto à interação deste com o organismo (SAROT et al., 2010) evitando despendimento de pesquisas mais elaboradas e também de estudos que envolvam animais (CHAI et al., 2010).

Estes testes são realizados utilizando linhagens celulares permanentes ou culturas primárias (como fibroblastos), sendo que se acredita que as culturas primárias reflitam de forma mais precisa as situações *in vivo*. As linhagens de células utilizadas para cultura são adquiridas a partir de bancos celulares ou de tecidos, como a American Type Culture Collection (ATCC) (CHAI et al., 2010).

A citotoxicidade de um biomaterial pode ser investigada utilizando o ensaio de redução do sal de brometo 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólico (MTT), no qual é determinada a atividade mitocondrial de células vivas, sendo um teste laboratorial colorimétrico padrão para mensurar a proliferação celular, também utilizado para avaliar a citotoxicidade. O sal MTT de coloração amarela, é reduzido na mitocôndria das células vivas, através da clivagem da enzima succinato desidrogenase, em cristais de formazan, de coloração púrpura. A cor resultante da quantidade destes cristais é diretamente proporcional ao número de células viáveis (ISO, 2007).

As características físico-químicas de SGF podem ser analisadas através da flutuabilidade, *lag time* para flutuação, perfil de dissolução do fármaco, difração de raios-X, microscopia eletrônica de varredura, espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourrier e análise térmica. A avaliação da citotoxidade e biocompatibilidade pode ser investigada usando o ensaio de MTT (brometo 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólico), e testes de viabilidade celular.

Métodos como calorimetria exploratória diferencial e difração de raios X dão um indicativo do estado físico do fármaco (amorfo ou cristalino) na matriz (QIAN et al., 2010). Um método cada vez mais utilizado para determinar a solubilidade de um

fármaco em uma matriz polimérica é a espectroscopia de Raman (ZHU et al., 2012). O Quadro 1 compila as principais técnicas utilizadas na caracterização físico-química das dispersões sólidas (AGGARWAL; JAIN, 2011; AGGARWAL; SINGH, 2011; BAIRD; TAYLOR, 2012).

Quadro 1 - Principais técnicas físico-químicas usadas para caracterização de dispersões sólidas

Técnicas	Comentários
Dissolução	Fármacos com taxa de dissolução intrínseca menor que 0,1 mg/cm^2/min, biodisponibilidade é limitada pela taxa de dissolução. Comparação do perfil de dissolução do fármaco, da mistura física fármaco-carreador e da dispersão sólida pode ajudar a indicar o provável mecanismo de liberação do fármaco (solubilização, redução granulométrica, molhabilidade).
Microscopia Eletrônica de Varredura	Útil para estudar a morfologia e algumas vezes o polimorfismo do fármaco. Pode ser visualizada, se houver, uma dispersão micrométrica das partículas do fármaco no carreador.
Calorimetria Exploratória Diferencial	Mudanças no estado físico do fármaco podem ocorrer durante o aquecimento, e a presença do polímero pode influenciar o comportamento de fusão do fármaco. Os resultados precisam ser confirmados por outras técnicas. Cristalinidade abaixo de 2% (m/m) não podem ser detectadas por esta técnica.
Difração de raios X	Auxilia na determinação do estado sólido do fármaco (dispersão molecular, amorfa ou cristalina, ou mistura) no carreador, independentemente do estado do carreador. Cristalinidade abaixo de 5% (m/m) dificilmente é detectada.
Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourrier	Contribui na determinação de possíveis mudanças nas ligações entre grupos funcionais do fármaco. Indicativo de interações químicas entre fármaco e carreador.

Técnicas	Comentários
Espectroscopia de Raman	Fármacos contendo radicais aromáticos são frequentemente muito melhor dispersores que os polímeros, facilitando sua detecção em sistemas mistos. É um método não destrutivo, não sendo necessário preparação da amostra.
Espectroscopia Raman Confocal	Útil para avaliar o conteúdo e homogeneidade através de um processo de imagem do fármaco na matriz. Nova abordagem para a avaliação analítica de dispersões sólidas, através da resolução espacial que cobre o estado físico, bem como a distribuição do fármaco. É uma ferramenta promissora para a observação de alterações na formulação causadas por processos físicos, como por exemplo recristalização e, ao mesmo tempo para a localização da área onde ocorrem alterações.

2.8 Mecanismos de liberação do fármaco nas dispersões sólidas

Dois mecanismos, aparentemente conflitantes, têm sido estudados para a liberação controlada do fármaco nas dispersões sólidas: (i) liberação controlada pelo carreador; (ii) liberação controlada pelo fármaco. O primeiro decorre dos trabalhos pioneiros de Corrigan (1985); Dubois e Ford (1985) e Craig (2002) e pode ser modelado em termos de dissolução de sistemas multicomponentes, delineado por Higuchi (1967). Nesse mecanismo, alguns sistemas parecem mostrar liberação controlada pelo carreador, pelo menos para taxas mais baixas de carregamento de fármaco. Nesse caso a taxa de liberação é controlada pela solubilidade do carreador e é independente das propriedades do fármaco (KAROLEWICZ et al., 2012; MALLICK et al., 2004).

O segundo mecanismo mostra um comportamento de liberação mais dependente das propriedades do fármaco que do polímero, independentemente da taxa de carregamento (MARTINEZ-OHARRIZ et al., 2002; MEKA et al., 2012).

Meka, et al.,2012 sugeriram que os dois mecanismos não são excludentes, com o mecanismo predominante a ser determinado pela solubilidade do fármaco na

solução concentrada do carreador. A mesma observação havia sido feita por Craig em 2002 (CRAIG, 2002; MEKA et al., 2012).

Estudos mais recentes, utilizando análise matemática para avaliar a cinética de liberação, demonstram que a liberação do fármaco a partir de diferentes formulações em dispersões sólidas, usando cloranfenicol e sulfametoxazol como fármacos modelo, e polietilenoglicol 8000 como carreador, seguiram diferentes mecanismos (KHAN et al., 2012). Da mesma forma, dispersões sólidas com carreadores diferentes (PVP-VA e HPMC-AS) para um mesmo fármaco e mesma técnica de fabricação, também seguiram mecanismos diferentes (KHAN et al., 2012; QIAN et al., 2012).

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

O objetivo deste trabalho foi desenvolver um sistema gastrorretensivo flutuante com cloridrato de ciprofloxacino obtido por dispersão sólida binária com álcool polivinílico e Eudragit S100®.

3.2 Objetivos específicos

a) caracterizar fisicamente a dispersão sólida;
b) caracterizar fisicamente o sistema particulado;
c) avaliar a flutuabilidade das partículas produzidas;
d) avaliar a estabilidade do fármaco;
e) avaliar o perfil de liberação do fármaco;
f) avaliar a citotoxicidade da formulação.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Material

O Cloridrato de Ciprofloxacino foi adquirido à Zhejiang Xinhua Pharmaceutical CO. Ltd. (China), com um grau de pureza de 99,7%. Para a formulação das nanoesferas foi utilizado Eudragit® S100 (Degussa, Alemanha) cedido gentilmente pela empresa Amapal (Brasil), álcool polivinílico (Vetec, Brasil), etanol, isopropanol e diclorometano (Merck, Brasil), sal de MTT (brometo 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolico) e Resazurim (Sigma, E.U.A), células 3T3 obtidas do banco de células BRJ:0017.b. Os demais reagentes utilizados eram de grau analítico.

4.2 Métodos

4.2.1 Preparação das dispersões sólidas, nanoesferas e mistura física

As dispersões sólidas e nanoesferas foram preparadas em uma operação unitária. Para a preparação das nanoesferas, o Eudragit S100® (E-S100) foi previamente solubilizado em etanol 96% (v/v) na taxa de 1:8 (m/v) e misturado a uma solução de isopropanol com diclorometano 2:5 (v/v). O cloridrato de ciprofloxacino (CPX) foi dissolvido na solução aquosa de álcool polivinílico (PVA) (0,4% m/v) na concentração de 25 $mg.mL^{-1}$ (CPX-PVA). A solução de E-S100 foi adicionada, gota a gota, à solução de CPX-PVA na razão de 3,9 $mL.min^{-1}$ controlado por intermédio de uma bomba peristáltica (Minupuls-3, Gilson® França) adaptada com uma ponteira de polipropileno (T200-Y Axygen- E.U.A). A ponteira foi fixada, submersa na solução de CPX-PVA e posicionada a uma altura de 3 cm do fundo do bécker. Durante o processo de preparação das nanoesferas o sistema foi mantido a 39 ± 1ºC, em banho de ultrassom ajustado para uma frequência de 40 kHz (Unique US-3300, Brasil). Durante a adição da solução E-S100 o meio de dispersão foi continuamente agitado a 12.000 rpm (Ultra Turrax IKA® T25 DS32, Alemanha). A agitação foi interrompida imediatamente após a adição da solução de E-S100. As nanoesferas formadas foram separadas do meio de dispersão por filtração e mantidas em estufa (50ºC) com circulação forçada de ar (Tecnal TE394/2, Brasil),

até peso constante. A mistura física (MF) foi preparada pela mistura de CPX, PVA e E-S100 nas mesmas proporções usadas para preparação das nanoesferas.

4.2.2 Teor do CPX por espectrofotometria por ultravioleta

A determinação da massa de CPX nas amostras foi realizada por espectroscopia na região de comprimento de onda ultravioleta (UV). Para determinar o comprimento de onda com o máximo de absorção (ʎ max), uma análise de varredura na faixa entre 200 e 400nm foi realizada com uma solução aquosa de CPX (9,0 µg.mL^{-1}), uma solução etanólica de E-S100 e uma de PVA ambas a 18,0 µg.mL-1. A interferência dos polímeros durante a determinação do CPX por UV também foi investigada pela comparação de duas curvas padrão, uma com CPX puro e outra na presença dos polímeros (PVA e E-S100). Para construção da curva analítica soluções aquosas de CPX nas concentrações de 1,0; 3,0 ;6,0; 9,0; 12,0; 15,0 e 18,0 µg.mL-1 foram preparadas em duplicata. O software Oringin 8.5 (OriginLab Corporation) foi utilizado para calcular o coeficiente de correlação (r), o coeficiente angular e determinar o ponto de intersecção.

4.2.3 Propriedades de fluxo e empacotamento

4.2.3.1 Estudo de micromerítica

Sistemas sólidos particulados são sistemas físicos complexos. Em um material na forma de pó não há duas partículas idênticas. A natureza do momento e a troca de energia entre as partículas desafia qualquer descrição, exceto em termos idealizados e muito aproximados. As propriedades de volume dos pós são determinadas, em parte, pelas propriedades físicas e químicas das partículas e em parte pela forma como elas interagem entre si. As propriedades estáticas de um leito de partículas dependem, sobretudo, da interação partícula-partícula. Estas interações, por sua vez, são influenciadas pelo processo de produção e dependem do antecedente histórico do leito de fabricação dos pós, bem como das condições do ambiente em que foram produzidos (CHIME et al., 2013).

As propriedades de fluxo e compressibilidade das nanoesferas foram determinadas pelo ângulo de repouso, índice de compressibilidade (IC) e fator de Hausner (FH) conforme descrito por Sinha et al. (2010).

4.2.3.2 Ângulo de Repouso (Φ)

O ângulo de repouso das nanoesferas foi determinado pelo método do funil. Um funil de vidro (diâmetro 100mm, haste 100mm comprimento e diâmetro interno de 7mm) foi fixado em um suporte universal e posicionado a uma altura de 10 cm acima de uma placa de vidro plana, limpa e desengordurada. Uma massa de amostra das nanoesferas, cuidadosamente pesada, foi transferida para o funil e deixada escoar livremente pela haste do funil. O ângulo de repouso foi calculado a partir da medida do diâmetro (d) e da altura (h) do cone de nanoesferas formado sobre a base de vidro. O teste foi feito em triplicata.

$$\tan\theta = 2h/d \qquad \text{(Eq 1)}$$

Onde (h) é igual a altura do cone, e (d) é igual ao diâmetro da base do cone formado.

4.2.3.3 Densidade aparente e forçada

Ambas as densidades aparente (ρA) e forçada (ρF) foram determinadas. Uma massa de 2g de nanoesferas de cada formulação foi colocado dentro de uma proveta de vidro com capacidade para 10 mL e suavemente agitado para evitar qualquer aglomerado de partículas. O volume de partículas na proveta foi previamente determinado (VA), a proveta foi deixada cair sobre seu próprio peso sobre uma superfície rígida de uma altura de 3 cm. O movimento de queda foi repetido com intervalos de 3 s até que nenhuma mudança no volume fosse observada (VF). A ρA e a ρF foram calculadas usando as equações 4 e 5. Os testes foram feitos em triplicata.

4.2.3.4 Índice de Compressibilidade e Fator de Hausner

As medidas indiretas do fluxo dos excipientes podem ser mensuradas através do cálculo do índice de compressibilidade de Carr (ICC%) e do Fator de Hausner (FH), empregando as Equações 2 e 3, respectivamente (ANDREA SCHÜSSELE, 2003; STATIONERY, 2009).

O índice de compressibilidade das nanoesferas foi determinado pelo ICC e o FH foi determinado a partir da relação entre as ρA e ρF. As determinações foram feitas em triplicata.

$$ICC\ (\%) = (\rho A - \rho F)/\rho A.\ 100 \qquad \text{(Eq 2)}$$

$$FH = \rho A/\rho F \qquad \text{(Eq 3)}$$

$$\rho A = m/\ VA \qquad \text{(Eq 4)}$$

$$\rho F = m/\ VF \qquad \text{(Eq 5)}$$

Onde (ρA) é igual a densidade aparente, (ρF) é a densidade forçada, (VA) o volume aparente , (VF) é o volume forçado e (m) é a massa utilizada.

4.2.4 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

As amostras de nanoesferas com o CPX foram preparadas colocando uma pequena porção do pó ou das partículas em uma fita adesiva de carbono dupla face presa a um suporte de alumínio. Os suportes foram cobertos com íons de ouro no metalizador (SC7620 Spatter Coater) para obter um filme com espessura de recobrimento de aproximadamente 150 Å. Após a ionização da placa metálica a corrente foi ajustada para 3 mA durante 3 min. As imagens foram aleatoriamente capturadas e digitalizadas (Microscópio Eletrônico de Varredura-Leo 440i,Inglaterra).

4.2.5 Medida de tamanho das nanoesferas e potencial zeta

O tamanho médio, a polidispersidade e o potencial zeta foram determinados usando analisador de partículas (BrookHaven – NanoBrook-90 Plus,USA).

O tamanho médio e a polidispersidade das nanoesferas foram determinados por espectroscopia de espalhamento dinâmico de luz. Para a determinação do tamanho e da polidispersidade, as partículas foram dispersas em solução de HPMC K4M 1% (viscosidade de 177,2 cP e Índice de refração de 1,33). Para determinação do potencial zeta as nanoesferas foram dispersas em água e a mobilidade eletroforética foi determinada por microeletroforese. As medidas foram realizadas a um ângulo fixo de 90° e 25ºC. As determinações foram realizadas em triplicata.

4.2.6 Eficiência de encapsulação

A eficiência de encapsulação (EE) das nanoesferas com CPX foi determinada pela medida da concentração de fármaco livre no meio de dispersão, separado das partículas através da filtração. O fármaco livre foi determinada pela adição de 0,1mL do filtrado para 10mL de água e centrifugado por 120 min a 3.500 rpm. O sobrenadante foi examinado por espectroscopia UV (λ = 272 nm). A massa de CPX livre na amostra examinada foi determinada usando a equação 7. A EE foi calculada usando a equação 6.

$$Fi = \frac{Abs+0{,}0585}{101{,}38} \quad \text{(Eq 6)}$$

$$EE = \frac{Ft-Fi}{Fi}\ x\ 100 \quad \text{(Eq 7)}$$

Onde (Ft) é a massa de fármaco adicionada na formulação e (Fi) é a massa de fármaco livre (Fi).

4.2.7 Estudo de flutuação das nanoesferas

Para o estudo de flutuação das nanoesferas foi avaliado o lag time de flutuação, tempo de flutuação e porcentagem de partículas flutuando em função do tempo. Uma massa de 100mg das nanoesferas foi pesada (n=3) e dispersa em 900 mL de HCl 0,1M adicionado de Tween 80® (0,02% m/m) (pH 1,2), este estudo foi

conduzido usando aparato II de agitação (50rpm) descrito na USP 37. Este sistema foi mantido a 37º C com agitação suave. Neste estudo, foi avaliado o tempo necessário para a flutuação das nanoesferas após a adição das mesmas no meio de dispersão (lag time de flutuação). O tempo de flutuação das nanoesferas foi acompanhado durante 24 h, e ao final deste período as nanoesferas que permaneceram flutuando foram coletadas, colocadas sobre um papel de filtro e mantidas na estufa de ar circulante (Tecnal TE394/2, Brasil) à temperatura de 50 ºC até massa constante. A percentagem de nanoesferas que permaneceram flutuando após 24h foi determinada usando a equação 8.

$$Flutuabilidade(\%) = \frac{Mf+Fb}{Mi} x100 \qquad \text{(Eq 8)}$$

Onde (Mi) é a massa inicial das nanoesferas secas antes do ensaio e (Mf) é a massa final das nanoesferas secas após o ensaio e (Fb) é a massa de fármaco liberada.

4.2.8 Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (IVTF)

O espectro de IVTF do fármaco puro (CPX), do PVA, do E-S100, mistura física, das nanoesferas (NE) e das nanoesferas com o fármaco (NE-CPX) foram obtidos usando espectrofotômetro (IRAffinity 1S – Shimadzu Corp. Japão). A preparação das pastillhas de KBr foi feita pela mistura da amostra com brometo de potássio na taxa de 1:100. A faixa de escaneamento foi entre 400 e 4000 cm-1.

4.2.9 Calorimetria exploratória diferencial (DSC)

Para caracterização termoanalítica (DSC-60 Shimatzu Corp., Japão) do fármaco puro (CPX), PVA, E-S100 e das nanoesferas com e sem o fármaco, as amostras (3mg) foram colocadas em cadinhos de alumínio hermeticamente fechados, o teste foi realizado sob atmosfera dinâmica de nitrogênio (70 min $^{-1}$) e razão de aquecimento 5°C/min, na faixa de temperatura de 30 a 400°C.

4.2.10 Avaliação, in vitro, da liberação do fármaco nas nanoesferas e cinética de liberação

A avaliação do perfil de dissolução do CPX a partir das nanoesferas foi determinada utilizando método descrito na USP 37 com modificações no meio de dissolução. As nanoesferas foram dispersas em 900 mL do meio de dissolução (HCl 0,1M adicionado de Tween 80® (0,02%)) e a temperatura (37± 0,5 ºC), e a velocidade de rotação (50 rpm) foram mantidas constantes durante todo o experimento. O aparato de agitação utilizado foi o de número II. Alíquotas (5mL) foram retiradas em intervalos de tempo pré-determinados (1,2,3,4,5,6,7,8,9,10,11,12 e 24 horas) e filtradas. O volume do meio foi mantido constante, pela adição de 5mL do meio de dissolução mantido a mesma temperatura. A absorbância das amostras foi determinada por espectrofotometria UV (272 nm). A concentração de CPX foi calculada a partir da equação 6. Os resultados foram utilizados para avaliar o perfil de liberação, e a cinética de liberação do fármaco. Para caracterizar a cinética de liberação a massa de fármaco liberada em cada tempo foi aplicada as equações de ordem zero (Equação 9) e primeira ordem (Equação 10). Os modelos cinéticos foram avaliados por meio da linearização dos dados obtidos no estudo de dissolução. A constante de correlação linear (r), calculada através do coeficiente de determinação (R^2), foi utilizada para escolher o modelo cinético que melhor representasse o processo de liberação (COSTA; SOUSA LOBO, 2001).

$$Qt = Qo + Ko^t \qquad \text{Eq 9}$$

$$Ln\ Qt = LnQoK1^t \qquad \text{Eq 10}$$

Onde *Qt* a quantidade de fármaco liberada no tempo t, Qo é a quantidade inicial de fármaco na solução e Ko é a constante de liberação de ordem zero, e Ln é o logaritimo.

4.2.11 Concentração mínima inibitória (MIC) pela técnica de microdiluição em placa

Cepas (Cefar) de *Escherichia coli (E. coli) (*ATCC 25922), *Staphilococcus aureus (S. aureus)* (ATCC 25923), *Pseudomonas aeruginosa (P. aeruginosa)*(ATCC

10145) e *Cândida albicans (C.albicans)(*ATCC 10231) foram cultivadas previamente por 24h para alcançar uma concentração inicial de 5 × 106 UFC.mL^{-1}, e diluídas para atingir a concentração desejada para o teste. Todos os testes foram realizados em duplicata utilizando caldo de cultura (Hinton, TSB). O caldo de cultura foi distribuído em concentrações decrescentes para os poços da micro placa. A penúltima e a última coluna da micro placa (com 96 poços) foram reservadas, respectivamente, para o controle positivo (ausência de CPX, NE e NE-CPX) e para o controle de contaminação (sem a adição das cepas). O Resazurim, como indicador de crescimento bacteriano, foi utilizado na concentração de 6,75 mg/mL. Em cada poço foi adicionado 10 µL da suspensão de bactéria, 10 µL de Resazurin. A quantidade do caldo de cultura e das amostras (CPX, NE e NE-CPX) variou de acordo com as concentrações testadas, para que o volume final de cada poço fosse de 100 µL. Após a adição do caldo de cultura, das amostras e das cepas bacterianas a placa foi incubada por 24h a 35°C. Após esse período o Resazurin foi adicionado e a incubação foi mantida por mais 24h a 35ºC. Após a incubação, a alteração de cor de azul escuro para rosa indica o crescimento de bactérias. A ausência de alteração de cor indica inibição do crescimento das bactérias.

4.2.12 Viabilidade celular por citometria de imagem –Teste de Tali

Para análise da viabilidade celular (Tali), foram utilizadas células 3T3 (BRJ:0017). As células foram previamente descongeladas e colocadas em garrafas de cultura contendo meio sintético complexo (RPMI 1640) e suplementada com 10% de soro fetal bovino. Após 24 horas as células foram transferidas para placas de cultura celular com 6 poços com 1.10^5 células.mL^{-1}. As amostras (CPX livre, NE e NE-CPX) na concentração de 100µg/mL foram colocadas em contato com as células para avaliação da viabilidade celular em comparação com o controle negativo (ausência das amostras). Os testes de viabilidade celular foram realizados 6 e 24 horas após o inicio da exposição. A análise da viabilidade celular foi realizada utilizando o Tali® *image-based cytometry.* Um volume de 150 µL de cada amostra foi centrifugada durante 5 min a 1500 rpm, o material sobrenadante foi descartado e o resíduo da precipitação foi tratado com o Tali® *apoptosis kit*. A leitura no equipamento de citometria de imagem foi realizada com 25 µL do resíduo tratado

com Tali® *apoptosis kit* e a viabilidade celular para cada amostra foi avaliada através de fluorescência verde/vermelho.

4.2.13 Redução de MTT

O ensaio MTT foi utilizado para determinar a citotoxicidade do CPX, das nanoesferas (NE) e das nanoesferas contendo CPX (NE-CPX). Uma placa de cultura com 96 poços foi preparada com cerca de 10^6 células 3T3 (obtidas do banco de células BRJ:0017) por poço e encubada a 37◦C (TECNAL TE399,Piracicaba, Brasil) até que foi observada a aderência das células. As culturas foram então tratados durante 24h, utilizando diferentes concentrações de CPX, NE e NE-CPX (0-350µg/mL). As células, contidas em cada poço, foram tratadas com 100µL de uma solução contendo 5 mg/mL de MTT (brometo de 3- (4,5-dimetiltiazol-2-il) -2,5-difeniltetrazólio). A placa foi mantida durante 3h a 37ºC em atmosfera de CO2 (5%). Após esse tempo as células foram fixadas pela adição de 100µL de etanol. A leitura no equipamento de ELISA (Robonik Readwel Touch Navi Mundai, India) foi realizada a um comprimento de onda de 570 nm.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Curva analítica de Ciprofloxacino usada para o Teor

A curva analítica do CPX obtida por espectroscopia UV mostrou uma correlação linear entre as concentrações do fármaco e a absorbância (R^2 0,999). Os resultados mostram uma correlação linear entre as absorbâncias e a concentração do fármaco.

5.2 Propriedades de fluxo e empacotamento

Na Tabela 2 são apresentados os resultados do ângulo de repouso (Φ), densidade aparente (ρA), densidade forçada (ρF), índice de compactação de Carr (ICC) e fator de Hausner (FH). A análise desses resultados permite avaliar as propriedades de fluxo e de compactação das nanoesferas. Essas informações são fundamentais para a veiculação de sistemas particulados em formas farmacêuticas sólidas, especialmente cápsulas e comprimidos (LAMOLHA; SERRA, 2007; VILLANOVA et al., 2012).

Tabela 1 - Micromerítica das nanoesferas com e sem CPX

Parâmetro analisado	Nanoesferas sem CPX	Nanoesferas com CPX
Φ (°)	27,1±1,6	20,0±1,5
ρA (g.mL^{-1})	0,04±0,01	0,07±0,01
ρF (g.mL^{-1})	0,03±0,00	0,04±0,00
ICC (%)	34,7±19,3	73,9±25,3
FH	1,33	1,75

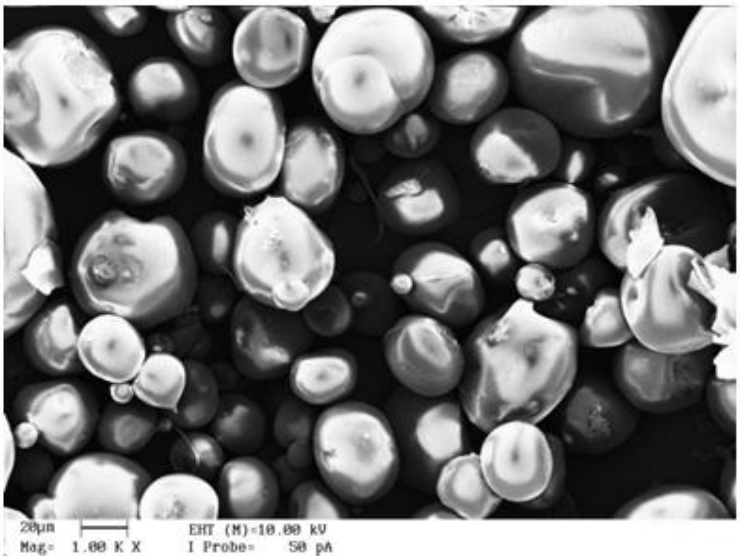
Nota: ângulo de repouso (Φ); densidade aparente (ρA); densidade forçada (ρF);índice de compactação de Carr (ICC); fator de Hausner (FH).
Fonte: elaboração do autor.

As nanoesferas com CPX apresentaram melhor fluxo, com ângulo de repouso entre 20 e 40º, e maior ICC. O FH das nanoesferas com CPX indica redução na taxa de empacotamento (KIBBE, 2000). A análise dos resultados do estudo de micromerítica (Tabela 2) indica que as nanoesferas com CPX poderiam ser veiculadas na forma de cápsulas ou comprimidos.

5.3 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

A Figura 3 mostra que as nanoesferas apresentam formato esférico, superfície lisa e ausência de porosidade para um aumento 1000 vezes e granulometria com índice de dispersão de 0,4 ± 0,1. O formato, tamanho e uniformidade das partículas é resultante da coacervação dos polímeros, do volume da gota de E-S100/CPX adicionada à solução de PVA e da taxa de agitação (KAWASHIMA et al., 1992). A técnica de preparação de quase emulsão é utilizada para formar partículas ocas de baixa densidade. No entanto essa característica não pôde ser observada na imagem apresentada na Figura 3.

Figura 3 - Microscopia eletrônica de varredura (MEV) das nanoesferas (Magnitude de 1,0 Kx)



Fonte: elaboração do autor.

5.4 Tamanho das partículas e potencial zeta

O tamanho das partículas foi em média 150,7 ± 18nm, com polidispersidade 0,4 e potencial zeta de -18,2mV. A medida da polidispersidade e do tamanho das nanoesferas foi possível usando como meio de dispersão a solução de HPMC K4M 1% (m/v) que reduziu o tempo de flutuação das nanoesferas. O potencial zeta de -18,2mV, associado ao fator de Hausner (1,75), é um indicativo de baixa possibilidade de empacotamento de partículas, característica necessária para

alcançar uma mistura homogênea, uniformidade de dose e de liberação do fármaco em medicamentos na forma sólida (AULTON, 2006.

5.5 Eficiência de encapsulação (EE) e flutuação das nanoesferas

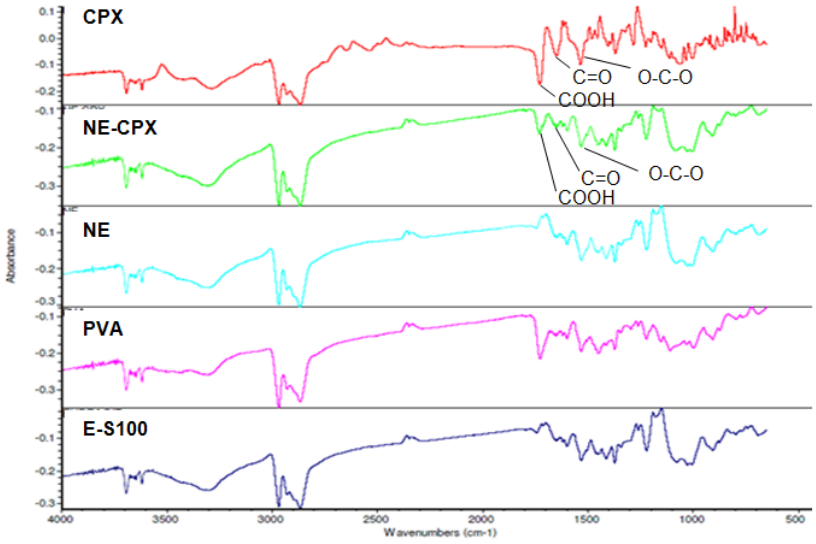
A EE foi de 94,8 ± 1,8% (n=3), esse resultado mostra que a técnica é reprodutível e apresenta alto índice de encapsulação do fármaco. Considerando que o CPX apresenta hidroficilidade elevada, a taxa de carregamento foi alta e melhor que os resultados apresentados em estudos com procedimentos técnicos semelhantes para fármacos hidrossolúveis (YOSHIDA et al, 2011). Yoshida et al. (2011) obtiveram uma taxa de carregamento de 81,1±14,7 % para o AZT em micropartículas PVA/Eudragit® S100. As nanoesferas tiveram flutuação imediata em água e HCl 0,1 M contendo Tween 80® (0,02%). A flutuação das nanoesferas foi de 100 % durante 12 h, ao final de 24h a taxa de flutuação foi de 62,15%.

5.6 Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (IVTF)

A Figura 4 mostra o resultado do IVTF para CPX, nanoesferas com o fármaco (NE CPX), nanoesferas sem o fármaco (NE), álcool polivinílico (PVA), Eudragit (E-S100) e mistura física (MF). Os picos característicos do PVP ocorrem na região de 1669 cm^{-1} e 3700 cm^{-1}. O espectro da mistura física mostrou que não ocorre alteração na posição das bandas de absorção na mistura física, indicando ausência de interação entre o CPX, PVA e Eudragit no processo de mistura simples. Os picos característicos do CPX podem ser observados na região de 1700 cm^{-1} correspondente ao estiramento do ácido carboxílico (COOH), 1620 cm^{-1} correspondente a carbonila (CO), 1510-1650 cm^{-1} correspondente ao carboxilato (OCO) (PSOMAS, 2008; TUREL, 2002) em 3375 cm^{-1} correspondente ao estiramento na amina secundária NH. Os picos correspondentes à dimerização COOH do CPX aparecem na faixa entre 2464.9 – 3091.7cm^{-1}. A dimerização é uma característica da funcionalidade ácida, quando o composto se apresenta na forma de dímeros de ácido devido a auto-associação das moléculas do fármaco através de forças fracas de van der Waals. O pico em 3535 cm^{-1} é devido ao estiramento OH que se encontra na faixa padrão de 3400-3600 cm^{-1}. A análise dos resultados sugere que o CPX foi encapsulado e a molécula não sofreu alteração química. Os principais

picos característicos do CPX podem ser observados na região de 1700 cm^{-1} correspondente ao estiramento do ácido carboxílico (COOH), 1620 cm^{-1} correspondente a carbonila (C= O) e 1510-1650 cm^{-1} correspondente ao carboxilato (O-C-O) (PSOMAS, 2008; TUREL, 2002).

Figura 4 - Resultados da Espectroscopia de IVTF do CPX, das nanoesferas com o fármaco (NE CPX), nanoesferas sem o fármaco (NE), álcool polivinílico (PVA) e do Eudragit S100



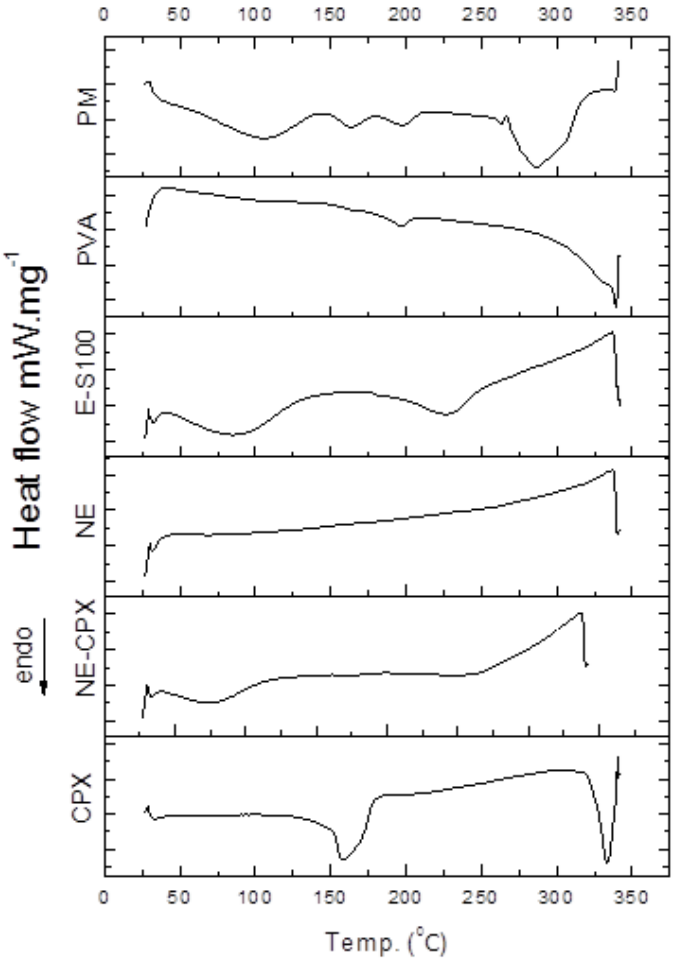
Fonte: elaboração do autor.

5.7 Calorimetria exploratória diferencial (DSC)

A Figura 5 mostra o resultado da análise térmica (DSC) para nanoesferas com o fármaco (NE CPX), nanoesferas sem o fármaco (NE), Eudragit (E-S100), CPX livre, álcool polivinílico (PVA) e da mistura física (FM) do CPX, E-S100 e PVA. O DSC do CPX apresenta duas endotermas de fusão, uma na região de 168ºC e outra na região de 325ºC correspondente, respectivamente, à perda de água de cristalização e fusão do fármaco puro (KIBBE, 2000; PISAL et al., 2004). O mesmo evento térmico de fusão do CPX pode ser observado para a FM na região de 280º C, esse evento mostra uma influência do PVA e do Eudragit no ponto de fusão do CPX. Os eventos térmicos na região de 168ºC e 325ºC correspondente a perda de água de cristalização e ponto de fusão do CPX não estão presentes nas NE CPX, indicando uma modificação no estado sólido do fármaco de cristalino para amorfo, e uma dissolução do mesmo no polímero. Essa modificação no estado sólido é

característica de dispersões sólidas obtidas por coprecipitação. O DSC do PVA mostra um evento endotérmico de fusão na região de 190ºC (KIBBE, 2000). O DSC do E-S100 e das NE mostram um evento endotérmico na região de 225º C, essa semelhança é um indicativo de que as nanoesferas são formadas predominantemente pelo E-S100. Essa interpretação é respaldada pelos resultados do IVTF.

Figura 5 - Resultados do DSC da mistura física (MF), álcool polivinílico (PVA), cloridrato de ciprofloxacino (CPX), Eudragit S100 (E-S100), nanoesfera sem o fármaco (NE) e das nanoesferas com o CPX (NE-CPX)



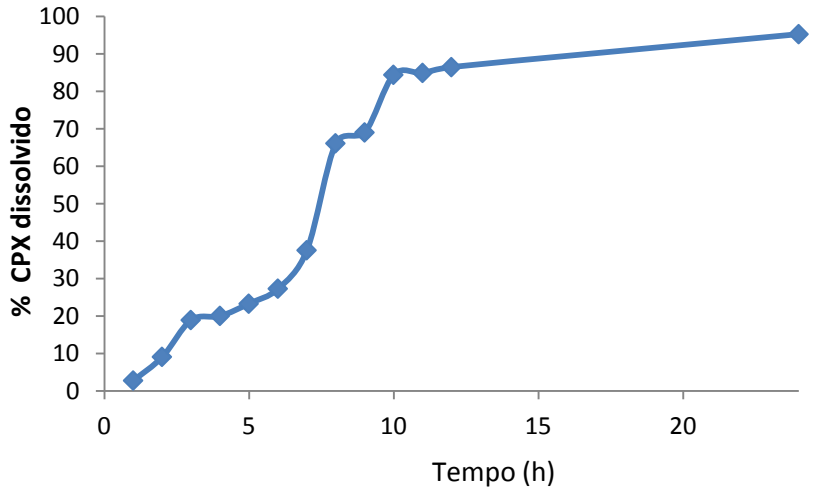
Fonte: elaboração do autor.

5.8 Avaliação, in vitro, da liberação do fármaco e cinética de liberação

A USP 37 indica como meio de dissolução do CPX o HCl 0,1M para avaliação de comprimidos convencionais. Nesse estudo, como o Eudragit S100 não é solúvel em meio ácido, o Tween 80® (0,02%) foi adicionado ao meio de dissolução. Nessa

condição o perfil de dissolução do CPX nas nanoesferas é apresentado na Figura 6. O Tween 80® foi utilizado para simular o efeito molhante dos tensoativos naturais presentes no trato gastrointestinal (SHAH et al., 1995; STOREY, 1995). A Figura 6 mostra o perfil de dissolução do CPX a partir das nanoesferas gastrorretensivas flutuantes.

Figura 6 - Perfil de dissolução das nanoesferas contendo CPX em HCl 0,1 M adicionado de Tween 80® (0,02%)



Fonte: elaboração do autor.

A análise dos resultados do perfil de dissolução do CPX nas nanoesferas mostra um sistema de liberação controlada do fármaco. Durante o período de estudo as nanoesferas mantiveram a integridade estrutural, essa observação sugere que a liberação do CPX foi por difusão. Os dados obtidos no estudo de dissolução foram utilizados para avaliar o perfil de liberação. Os resultados da cinética de liberação são apresentados na Tabela 3.

Tabela 2 - Cinética de liberação in vitro das nanoesferas contendo CPX.

Perfil de Liberação ***in vitro***	**Ordem zero** **R^2**	**Primeira ordem** **R^2**
Até a 3ªh	1,00	---------
Da 4ªh a 24ªh	0,627	0,915

Fonte: elaboração do autor.

A análise dos resultados apresentados na Tabela 3 mostra que nas 3 primeiras horas a liberação do CPX obedece uma cinética de ordem zero isto é, a liberação não depende das características da nanoesfera. A partir da 3ª hora a liberação do CPX obedece a uma cinética de primeira ordem. Esse perfil indica que a liberação depende da concentração de fármaco na nanoesfera. Como não ocorre alteração da integridade estrutural da nanoesfera (sistema matricial) a liberação do fármaco se dá por difusão.

5.9 Concentração mínima inibitória (MIC)

Os resultados referentes à concentração mínima de inibição (MIC) mostram que o fármaco encapsulado apresentou efeito inibitório quando testado em cultura com *E. coli*, *S. aureus* e *P. aeruginosa*, sendo menos eficiente que o fármaco livre. Podemos verificar que a melhor inibição ocorreu com *E. coli*, seguida de *S. aureus.* Não foram encontrados efeitos inibitórios para *C. albicans.*

Tabela 3 - Resultados obtidos nos testes de concentração inibitória mínima (MIC)

Microrganismos	**MIC (mg.mL^{-1})**		
	CPX	**NE + CPX**	**NE**
E. coli	1	6	50
S. aureus	10	10	50
P. aeruginosa	1	50	150
C. albicans	não inibição	não inibição	não inibição

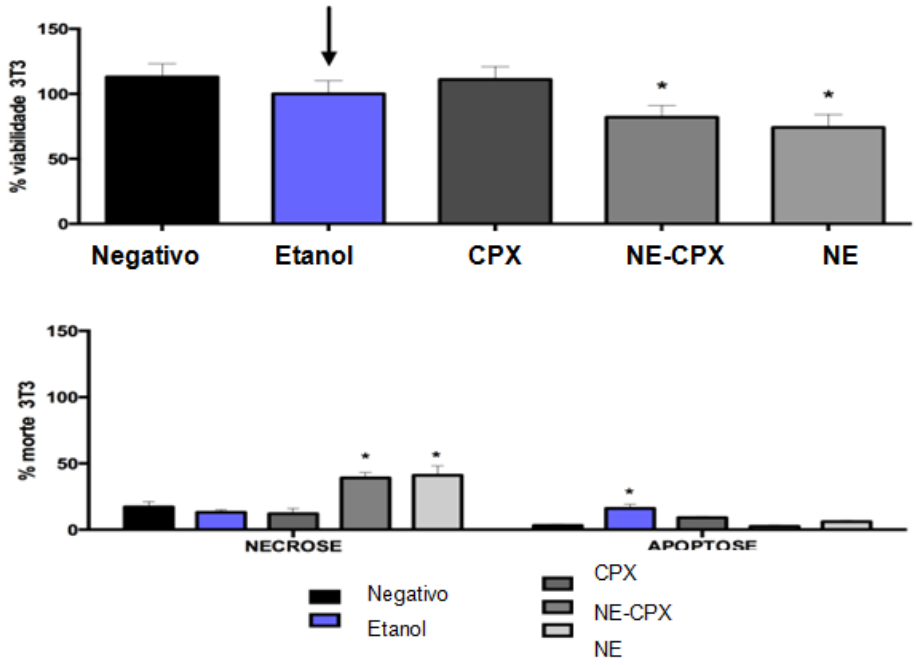
Nota: Onde (CPX) é o fármaco livre, (NE+CPX) são as nanoesferas com o fármaco e (NE) são as nanoesferas.
Fonte: elaboração do autor.

5.10 Análise de Tali – Viabilidade celular

Os resultados utilizando citometria de imagem (Figura 5) mostraram uma viabilidade celular de aproximadamente 70% para as NE e NE-CPX. No entanto há uma queda significativa ($p < 0,5$) da viabilidade celular quando comparado com controle negativo e com o CPX livre. A análise dos resultados indica que a morte celular provocada pelas NE na concentração de 100 µg.mL^{-1} é decorrente dos componentes utilizados na fabricação das NE. A análise mostra que a causa da morte celular para as NE com e sem CPX foi por necrose das células, indicando provável ruptura de membrana ou instabilidade celular. Podemos observar que a

citotoxicidade do material testado ficou em torno de 100 a 200ug/mL. Porém esta concentração testada é extremamente alta, se compararmos com a concentrações necessárias para que haja morte bacteriana, entre 1 a 50 ug/mL, logo deve-se avaliar as vantagens do uso do nanocomposto para que este seja uma opção de uso em comparação ao fármaco já existente no mercado (GRILLO et al., 2014; FERREIRA et al., 2014).

Figura 7- Gráficos de viabilidade e morte celular.

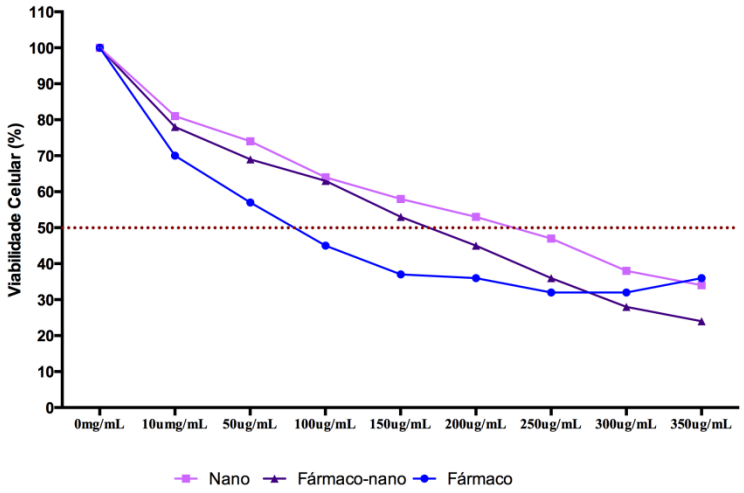


Fonte: elaboração do autor.

5.11 Redução de MTT

Os resultados de MTT realizados com linhagem celular 3T3 apresentados na figura 6 mostraram que a IC50 do CPX livre foi aproximadamente 75µg/mL. O IC50 para as nanoesferas com e sem CPX foi, respectivamente 150µg/mL e 225µg/mL. Esses resultados mostram uma proteção significativa das NE-CPX em relação ao CPX livre, indicando que uma maior concentração do NE-CPX pode ser utilizada para causar o mesmo dano citotóxico do CPX livre nas células 3T3.

Figura 8 - Resultados das análises de MTT para as nanoesferas (NANO), nanoesferas com o CPX (Fármaco - nano) e o CPX livre (Fármaco) utilizando células 3T3



Fonte: elaboração do autor.

6 CONCLUSÃO

As dispersões sólidas binárias de Eudragit® (S100/PVA) preparadas pela técnica de difusão e evaporação do solvente da quase emulsão, tendo como fármaco modelo o CPX originou sistemas matriciais nanoestruturados, esféricos, flutuantes e de liberação controlada. As nanoesferas contendo CPX obtidas por dispersão sólida binária apresentaram boas propriedades de fluxo indicando que poderiam ser facilmente encapsuladas ou compactadas. A taxa de carregamento foi considerada alta quando comparadas com outros estudos, assim como apresentou liberação controlada que se dá por difusão. As propriedades químicas do CPX não foram alteradas pelos processos de fabricação das nanoesferas, bem como pelos componentes da formulação. O teste de concentração mínima inibitória mostra que o fármaco encapsulado tem efeito inibitório quando testados em culturas bacterianas, sendo menos eficiente que o fármaco livre. Os ensaios de citotoxicidade mostram uma viabilidade celular de 70%, e que uma maior concentração do fármaco encapsulado pode ser utilizada para causar o mesmo efeito citotóxico do CPX livre em células de fibroblastos de ratos (3T3). A dispersão sólida de Eudragit S100® e álcool polivinílico favoreceu a preparação de nanocarreadores para liberação controlada com cloridrato de ciprofloxacino.

REFERÊNCIAS

ABDOU, H. M. **Dissolution, bioavailability and bioequivalence**. Easton: Mack Printing, 1989.

AFZELIUS, L. et al. State-of-the-art tools for computational site of metabolism predictions: Comparative analysis, mechanistical insights, and future applications. **Drug Metabolism Reviews**, New York, v. 39, n. 1, p. 61-86, 2007.

AGGARWAL, A. K.; JAIN, S. Physicochemical characterization and dissolution study of solid dispersions of ketoconazole with nicotinamide. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**, Tokyo, v. 59, n. 5, p. 629-638, 2011.

AGGARWAL, A. K.; SINGH, S. Physicochemical characterization and dissolution study of solid dispersions of diacerein with polyethylene glycol 6000. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, New York, v. 37, n. 10, p. 1181-1191, 2011.

AMIDON, G. L. et al. Theoretical basis for a biopharmaceutic drug classification: correlation of in vitro drug product dissolution and in vivo bioavailability. **Pharmaceutical Research**, Stuttgart, v. 12, n. 3, p. 413-420, 1995.

ANDREA SCHÜSSELE, A. B. Note on the measurement of flowability according to the European Pharmacopoeia. **International Journal of Pharmaceutics**, Amsterdam, v. 257, n. 1-2, p. 301-304, 2003.

ASSIS, L. M. Et al. Revisão: características de nanopartículas e potenciais aplicações em alimentos. **Brazilian Journal of Food Technology**, Campinas, v. 15, n. 2, p. 99-109, 2012.

AULTON, M. **Delineation of dosage forms**. 2. ed. Porto Alegre: Artmed, 2006.

BAIRD, J. A.; TAYLOR, L. S. Evaluation of amorphous solid dispersion properties using thermal analysis techniques. **Advanced Drug Delivery Reviews**, Amsterdam, v. 64, n. 5, p. 396-421, 2012.

BALASUBRAMANIAM, J. et al. Enhanced dissolution and bioavailability of raloxifene hydrochloride by co-grinding with different superdisintegrants. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**, Tokyo, v. 58, n. 3, p. 293-300, 2010.

BARROCAS, P. M. C. et al. Sistemas farmacêuticos gastrorretensivos flutuantes. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, São Paulo, v. 43, n. 3, p. 325-334, 2007.

BECHGAARD, S.; BAGGESEN, H. Propoxyphene and norpropoxyphene: influence of type of controlled realese formulation on intra-and inter-subject variations. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, Easton, v. 69, n. 1, p. 1327-1330, 1980.

BETTINI, R. et al. Translocation of drug particles in HPMC matrix gel layer: effect of drug solubility and influence on release rate. **Journal of Controlled Release**, Amsterdam, v. 70, n. 3, p. 383-391, 2001.

BIKIARIS, D. N. Solid dispersions, part I: recent evolutions and future opportunities in manufacturing methods for dissolution rate enhancement of poorly water-soluble drugs. **Expert Opinion on Drug Delivery**, London, v. 8, n. 11, p. 1501-1519, 2011.

CHAI, W. L. et al. Development of a novel model for the investigation of implant–soft tissue interface. **Journal of Periodontology**, Chicago, v. 81, n. 8, p. 1187-95, 2010.

CHAUD, M. V. et al. Development and evaluation of praziquantel solid dispersion in sodium starch glycolate. **Tropical Journal of Pharmaceutical Research**, Benin City, v. 12, n. 2, p. 163-168, 2013.

CHAUD, M. V. et al. Iron derivatives from casein hydrolysates as a potential source in the treatment of iron deficiency. **Journal of Agricultural Food Chemistry**, Washington, v. 50, n. 4, p. 871-877, 2002.

CHAUD, M. V. et al. Solid dispersions with hydrogenated castor oil increase solubility, dissolution rate and intestinal absorption of praziquantel. **Brazilian Journal Pharmaceutical Science**, São Paulo, v. 46, n. 3, p. 473-481, 2010.

CHAWLA, G. Et al. Gastroretention: a means to address regional variability in intestinal drug absorption. **Pharmaceutical Technology**, [s.l.], v. 27, p. 50-68, 2003

CHEN, L. et al. Improved dissolution and anti-inflammatory effect of ibuprofen by solid dispersion. **Frontiers of Medicine**, Beijing, v. 6, n. 2, p. 195-203, 2012.

CHIME, S. A. et al. Evaluation of Alstonia boonei Stem Bark Powder Tablets. **Indian Journal Pharmaceutics Science**, New Delhi, v. 2, p. 226-230, 2013.

CHIOU, W. L.; RIEGELMAN, S. Increasing dissolution rate of water insolble cardiac glycosides and steroids via solid dispersion in polyetileneglycol 6000. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, Easton, v. 60, n. 10, p. 1569-1571, 1971.

CHOKSHI, R. J. et al. Improving the dissolution rate of poorly water soluble drug by solid dispersion and solid solution: pros and cons. **Drug Delivery**, Orlando, v. 14, n. 1, p. 33-45, 2007.

CINTO, P. O. et al. LC Evaluation of intetstinal transport of praziquantel. **Chromatographia**, Braunschweig, v. 69, n. 2, p. S213-S217, 2009.

COLLET, L.; FELL, J. T.; WHITEHEAD, J. R. Prolonged gastric retention using floating dosage forms. **Pharmaceutical Technology**, [s.l.], v. 24, n. 3, p. 82-90, 2000.

COLOMBO, P. et al. Analysis of the swelling and release mechanisms from drug delivery systems with emphasis on drug solubility and water transport. **Journal of Controlled Release**, Amsterdam, v. 39, n. 2-3, p. 231-237, 1996.

CORREA, E. M. et al. Assessment of solubility and intestinal absorption in vitro of praziquantel in solid dispersions of polyethylene glycol 6000. **Journal of Latin American Pharmaceutical Science**, [s.l.], v. 30, n. 10, p. 1910-1915, 2011.

CORRIGAN, O. I. Mechanisms of dissolution of fast release solid dispersion. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, New York, v. 11, n. 2-3, p. 697-724, 1985.

COSTA, P.; SOUSA LOBO, J. M. Modeling and comparison of dissolution profiles. **European Journal of Pharmaceutcs Sciences**, Amsterdam, v. 13, n. 2, p. 123-133, 2001.

CRAIG, D. Q. The mechanisms of drug release from solid dispersions in water-soluble polymers. **International Journal of Pharmaceutics**, Amsterdam, v. 231, n. 2, p. 131-144, 2002.

CRIVORI, P.; POGGESI, I. Computational approaches for predicting CYP-related metabolism properties in the screening of new drugs. **European Journal of Medicinal Chemistry**, Paris, v. 41, n. 3, p. 795-808, 2006.

DA SILVA, C. F. et al. The intestinal permeation of didanosine from granules containing microspheres using the everted gut sac model. **Journal of Microencapsulation**, London, v. 26, n. 6, p. 523-528, 2009.

DEO, S. C.; ANDREAZZA, I. F.; POSSAMAI, J. C. Development of mesalazine pellets coated with methacrylic-derived polymer. **Brazilian Journal Pharmaceutical Science**, São Paulo, v. 47, n. 1, p. 103-109, 2011.

DRESCHER, S. et al. P-glycoprotein-mediated intestinal and biliary digoxin transport in humans. **Clinical Pharmacology and Therapeutics**, St. Louis, v. 73, n. 3, p. 223-231, 2003.

DRUG BANK. **Ciprofloxacin**. [2014]. Disponível em: <http://www.drugbank.ca/drugs/DB00537>. Acesso em: 15 mar. 2015.

DUBOIS, J. L.; FORD, J. L. Similarities in the release rates of different drugs from polyethylene glycol 6000 solid dispersions. **The Journal of Pharmacy and Pharmacology**, London, v. 37, n. 7, p. 494-495, 1985.

EDSMAN, K.; HÄGERSTRÖM, H. Pharmaceutical applications of mucoadhesion for the non-oral routes. **The Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 57, n. 1, p. 3-22, 2005.

FERRARI, P. C. et al. In vitro drug permeation from chitosan pellets. **Carbohydrate Polymers**, London, v. 87, n. 4, p. 2526-2531, 2012.

FERREIRA, N. et al. Development of hydrophilic nanocarriers for the charged form of the local anesthetic articaine. **Colloids and Surfaces. B, Biointerfaces**, Amsterdam, v. 121, p. 66-73, 2014.

FORSTER, A. et al. Selection of excipients for melt extrusion with two poorly water-soluble drugs by solubility parameter calculation and thermal analysis. **International Journal of Pharmaceutics,** Amsterdam, v. 226, n. 1-2, p. 147-161, 2001.

GARUD, N.; GARUD, A. Preparation and In-vitro Evaluation of Metformin Microspheres Using Non-Aqueous Solvent Evaporation Technique. **Tropical Journal of Pharmaceutical Research**, Benin City, v. 4, n. 11, p. 577, 2012.

GATTANI, Y. S. Floating multiparticulate drug delivery systems: an overview. **International Journal of Pharma and Bio Sciences**, Guntur, v. 1, n. 2, 2010.

GHOBAD, M. et al. Reciprocal powered ime model for release kinetic analysis of ibuprofen solid dispersions in oleaster powder, microcrystalline cellulose and crospovidone. **Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Science**, Edmonton, v. 13, n. 2, p. 152-161, 2010.

GOTTESMAN, M. M.; AMBUDKAR, S. V.; XIA, D. Structure of a multidrug transporter. **Nature Biotechnology**, New York, v. 27, n. 6, p. 546-547, 2009.

GRABOVAC, V.; GUGGI, D.; BERNKOP-SCHNURCH, A. Comparison of the mucoadhesive properties of various polymers. **Advanced Drug Delivery Reviews**, Amsterdam, v. 57, n. 11, p. 1713-1723, 2005.
GRILLO, R. et al. Chitosan / tripolyphosphate nanoparticles loaded with paraquat herbicide : An environmentally safer alternative for weed control. **Journal of Hazardous Materials**, Amsterdam, v. 278, p. 163-171, 2014.

HARRIS, D. et al. GI transit of potential bioadhesive formulations in man: A scintigraphic study. **Journal of Controlled Release**, Amsterdam, v. 12, n. 1, p. 45-53, 1990.

HIGUCHI, W. I. Diffusional models useful in biopharmaceutics. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, Easton, v. 56, n. 3, p. 315-324, 1967.

HOFFMAN, A. et al. Pharmacokinetic and pharmacodynamic aspects of gastroretentive dosage forms. **International Journal of Pharmaceutics**, Amsterdam, v. 277, n. 1, p. 141-153, 2004.

HU, J. et al. Nanoparticle engineering processes for enhancing the dissolution rates of poorly water soluble drugs. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, New York, v. 30, n. 3, p. 233-245, 2004.

ISO. **Document 10993-12:2007**. Biological evaluation of medical devices, Part 12, Sample preparation and reference materials. 2007.

JAIN, S. K.; AGRAWAL, G. P.; JAIN, N. K. Evaluation of porous carrier-based floating Orlistat microspheres for gastric delivery. **AAPS PharmSciTech**, Arlington, v. 7, n. 4, p. E1-E9, 2006.

JANSSENS, S. et al. Formulation and characterization of ternary solid dispersions made up of Itraconazole and two excipients, TPGS 1000 and PVPVA 64, that were

selected based on a supersaturation screening study. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, Stuttgart, v. 69, n. 1, p. 158-166, 2008.

KARAVAS, E. et al. Investigation of the release mechanism of a sparingly water-soluble drug from solid dispersions in hydrophilic carriers based on physical state of drug, particle size distribution and drug-polymer interactions. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, Stuttgart, v. 66, n. 3, p. 334-347, 2007.

KAROLEWICZ, B. et al. Solid dispersions in pharmaceutical technology. Part I. Classification and methods to obtain solid dispersions. **Polimery w Medycynie**, Wrocław, v. 42, n. 1, p. 17-27, 2012.

KAWASHIMA, Y. et al. Hollow microspheres for use as a floating controlled drug delivery system in the stomach. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, Easton, v. 81, n. 2, p. 135-140, 1992.

KAWASHIMA, Y. et al. Preparation of controlled-release microspheres of Ibuprofen with acrylic polymers by a novel quasi-emulsion solvent diffusion method. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, Easton, v. 13, n. 78, p. 68-72, 1989.

KHAN, S. et al. Dissolution rate enhancement, in vitro evaluation and investigation of drug release kinetics of chloramphenicol and sulphamethoxazole solid dispersions. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, New York, v. 39, n. 5, p. 704-715, 2013.

KIBBE, A. H. **Handbook of pharmaceutical excipients**. London: [s.n.], 2000.

KIRWAN, W. O.; SMITH, A. N. Gastrointestinal transit estimated by an isotope capsule. **Scandinavian Journal of Gastroenterology**, Oslo, v. 9, n. 8, p. 763-766, 1974.

KLAUSNER, E. A. et al. Expandable gastroretentive dosage forms. **Journal of Controlled Release**, Amsterdam, v. 90, n. 2, p. 143-162, 2003.

KORZEKWA, K. R.; JONES, J. P.; GILLETTE, J. R. Theoretical studies on cytochrome P-450-mediated hydroxylation: a predictive model for hydrogen atom abstractions. **Journal of the American Chemical Society**, Washington, v. 112, n. 19, p. 7042-7046, 1990.

KUMAR, K.; RAI, A. K. Development and Evaluation of Floating Microspheres of Curcumin. **Tropical Journal of Pharmaceutical Research**, Benin City, v. 5, n. 11, p. 713, 2012.

LAMOLHA, M. A.; SERRA, C. H. R. Avaliação das propriedades de fluxo dos granulados e dissolução de comprimidos de hidroclorotiazida 50 mg obtidos por granulação úmida. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, São Paulo, v. 43, n. 3, p. 435-446, 2007.

LANGER, M. et al. Investigations on the predictability of the formation of glassy solid solutions of drugs in sugar alcohols. **International Journal of Pharmaceutics**, Amsterdam, v. 252, n. 1-2, p. 167-179, 2003.

LEE, J.W.; PARK, J.H.; ROBINSON, J.R. Bioadhesive-based dosage forms: The next generation. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, Easton, v. 89, n. 7, p. 850-866, 2000.

LEUNER, C.; DRESSMAN, J. Improving drug solubility for oral delivery using solid dispersions. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, Stuttgart, v. 50, n. 1, p. 47-60, 2000.

LOPES, C. M.; LOBO, J. M. S.; COSTA, P. Formas farmacêuticas de liberação modificada: polímeros hidrifílicos. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, São Paulo, v. 41, n. 2, p. 143-154, 2005.

MAHESHWARI, R. K.; JAGWANI, Y. Mixed Hydrotropy: Novel Science of Solubility Enhancement. **Indian Journal Pharmaceutical Science**, New Delhi, v. 73, n. 2, p. 179-183, 2011.

MALLICK, S. et al. Dissolution behavior of nalidixic acid solid dispersion using water soluble dispersion carriers. **Acta Poloniae Pharmaceutica**, Warszawa, v. 61, n. 1, p. 21-30, 2004.

MARTINEZ-OHARRIZ, M. C. et al. Solid dispersions of diflunisal-PVP: Polymorphic and amorphous states of the drug. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, New York, v. 28, n. 6, p. 717-725, 2002.

MEKA, A. K. et al. Development, evaluation and characterization of surface solid dispersion for solubility and dissolution enhancement of Irbesartan. **International Journal of Drug Development & Research**, New Delhi, v. 4, n. 1, p. 263-273, 2012.

MINAMI, H.; MCCALLUM, R. W. The physiology and pathophysiology of gastric emptying in humans. **Gastrenterology**, Baltimore, v. 86, n. 6, p. 1592-1610, 1984.

MIZUNO, N. T. et al. Impact of drug transporter studies on drug discovery and development. **Pharmacological Reviews**, Baltimore, v. 55, n. 3, p. 425-461, 2003.

NIENBERT, R. Ion pair transport across membranes. **Pharmaceutical Research**, Stuttgart, v. 6, n. 9, p. 743-747, 1989.

PANDYA, N.; PANDYA, M.; BHASKAR, V. H. Preparation and in vitro Characterization of Porous Carrier–Based Glipizide Floating Microspheres for Gastric Delivery. **Journal of Young Pharmacists**, Mumbai, v. 3, n. 2, p. 97-104, 2011.

PARK, K.; ROBINSON, J. R. Bioadhesive polymers as platforms for oral-controlled drug delivery: method to study bioadhesion. **International Journal of Pharmaceutics**, Amsterdam, v. 19, n. 2, p. 107-127, 1984.

PISAL, S. et al. Drug release properties of polyethylene-glycol-treated ciprofloxacin-Indion 234 complexes. **AAPS PharmSciTech**, Arlington, v. 5, n. 4, p. e64, 2004.

PSOMAS, G. Mononuclear metal complexes with ciprofloxacin: synthesis, characterization and DNA-bindingproperties. **Journal of Inorganic Biochemistry**, New York, v. 102, n. 9, p. 1798-1811, 2008.

O'NEIL, M. J. **The Merck index: an encyclopedia of chemicals, drugs and biologicals**. 14. ed. London: Whitehouse Station, 2006.

QIAN, F. et al. Is a distinctive single Tg a reliable indicator for the homogeneity of amorphous solid dispersion? **International Journal of Pharmaceutics**, Amsterdam, v. 395, n. 1-2, p. 232-235, 2010.

QIAN, F. et al. Solution Behavior of PVP-VA and HPMC-AS-Based Amorphous Solid Dispersions and Their Bioavailability Implications. **Pharmaceutical Research**, Stuttgart, v. 29, n. 10, p. 2765-2776.

RAMANA, G. et al. Sustained release of nipedipine from matrix tablets of its solid dispersion employing superdisintegrants. **International Research Journal of Pharmacy,** Rampur, v. 2, n. 9, p. 166-169, 2011.

RAO, K. R.; SENAPATI, P.; DAS, M. K. Formulation and in vitro evaluation of ethyl cellulose microspheres containing zidovudine. **Journal of Microencapsulation**, London, v. 22, n. 8, p. 863-876, 2005.

RATHEE, P. et al. Gastroretentive drug delivery systems: a review of formulation approaches. **The Pharma Innovation**, Rohtak, v. 1, n. 8, 2012.

RONI, M. A. et al. Dissolution enhancement of poorly soluble carbamazepine by using polymeric solid dispersion. **International Journal of Pharmaceutical Science and Research**, New Delhi, v. 2, n. 1, p. 49-57, 2011.

ROUGE, N.; BURI, P.; DOELKER, E. Drug absortion sites in gastrointestinal tract and dosage forms for site- specific delivery. **International Journal of Pharmaceutics**, Amsterdam, v. 136, n. 1-2, p. 117-139, 1996.

SAROT, J. R. et al. Evaluation of the stress distribution in CFR-PEEK dental implants by the three-dimensional finite element method. **Journal of Materials Science. Materials in Medicine**, London, v. 21, n. 7, p. 2079-2085, 2010.

SEKIGUCHI, K.; OBI. Studies on absorption of eutectic mixture: comparison of the behavior of eutectic mixture of sulfathiazole and that of ordinary sulfathiazole in man. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**, Tokyo, v. 9, n. 11, p. 866-872, 1961.

SERAJUDIN, A. T. M. Solid Dispersion of poorly water-soluble drugs: Early promises subsequent problems, and recent breakthroughs. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, Easton, v. 88, n. 10, p. 1058-1066, 1999.

SETHIA, S.; SQUILLANTE, E. Solid dispersions: revival with greater possibilites and applications in oral drug delivery. **Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems**, Boca Raton, v. 20, n. 2-3, p. 215-247, 2003.

SHAH, V. P. et al. In vitro dissolution of sparingly water soluble drug dosage forms. **International Journal of Pharmaceutics**, Amsterdam, v. 125, n. 1, p. 99-106, 1995.

SHAHZAD, M. K.; UBAID, M.; MURTAZA, G. Formulation and Optimization of Celecoxib-Loaded Microspheres Using Response Surface Methodology. **Tropical Journal of Pharmaceutical Research**, Benin City, v. 5, n. 11, p. 695, 2012.

SHARGEL, S.; et al. **Applied biopharmaceutics e phramacokinetics**. New York: McGraw-Hill's, 2012.

SILVA, C. et al. Administração oral de peptídeos e proteínas : II . Aplicação de métodos de microencapsulação. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, São Paulo, v. 39, n. 1, p. 1-20, 2003

SINGH, B. N. A quantitative approach to probe the dependence and correlation of food-effect with aqueous solubility, dose/solubility ratio, and partition coefficient (Log P) for orally active drugs administered as immediate-release formulations. **Drug Development Research**, Chichester, v. 65, n. 2, p. 55-75, 2005.

SINHA, S. et al. Solid dispersion as an approach for bioavailability enhancement of poorly water-soluble drug ritonavir. **AAPS PharmSciTech**, Arlington, v. 11, n. 2, p. 518-527, 2010.

SMART, J. D. The basics and underlying mechanisms of mucoadhesion. **Advanced Drug Delivery Reviews**, Amsterdam, v. 57, n. 11, p. 1556-1568, 2005.

SOUZA, J. et al. Modelos in vitro para determinação da absorção de fármacos e previsão da relação dissolução/absorção. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, São Paulo, v. 43, n. 4, p. 515-527, 2007.

SRINARONG, P. et al. Improved dissolution behavior of lipophilic drugs by solid dispersions: the production process as starting point for formulation considerations. **Expert Opinion on Drug Delivery**, London, v. 8, n. 9, p. 1121-1140, 2011.

STATIONERY, H. M. **British pharmacopoeia**. 9. ed. London: [s.n.], 2009.

STOREY, D. E. The role of dissolution testing in the design of immediate release dosage forms. **International Journal of Pharmaceutics**, Amsterdam, v. 125, p. 99-106, 1995.

STROMAN, D. W. et al. In vitro and in vivo potency of moxifloxacin and moxifloxacin ophthalmic solution 0.5%. A new topical fluoroquinolone. **Survey of Ophthalmology**, New York, v. 50, supl. 1, p. S16-S31, 2005.

SUN, Y. et al. Nimodipine semi-solid capsules containing solid dispersion for improving dissolution. **International Journal of Pharmaceutics**, Amsterdam, v. 359, n. 1-2, p. 144-149, 2008.

TADROS, M. I. Controlled-release effervescent floating matrix tablets of ciprofloxacin hydrochloride: Development, optimization and in vitro–in vivo evaluation in healthy human volunteers. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, Stuttgart, v. 74, n. 2, p. 332-339, 2010.

THELEN, K.; et al. Evolution of a detailed physiological model to simulate the gastrointestinal transit and absorption process in humans, part II: extension to describe performance of solid dosage forms. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, Easton, v. 101, n. 3, p. 1267-1280, 2012.

TIHANYI, K.; VASTAG, M. **Solubility, delivery and ADME problems of drugs and drug candidates**. Budapest: Bentham e-Books, 2011.

TRAN, T. D. et al. The roles of acidifiers in solid dispersion and physical mixtures. International Journal of Pharmaceutics, Amsterdam, v. 384, n. 1, p. 60-66, 2010.
TSUJI, A.; TAMAI, I. Carrier-mediated intestinal transport of drugs. **Pharmaceutical Research**, Stuttgart, v. 13, n. 7, p. 963-967, 1996.

TUREL, I. The interactions of metal íons with quinolone antibacterial agents. **Coordination Chemistry Reviews**, Amsterdam, v. 232, N. 1-2, p. 27-47, 2002.

VADE-MÉCUM DE MEDICAMENTOS. 17. ed. São Paulo: Soriak, 2014.

VAN ASPEREN, J.; VAN TELLINGEN, O.; BEIJNEN, J. H. The pharmacological role of p-glycoprotein in the intestinal epithelium. **Pharmacological Research**, London, v. 37, n. 6, p. 429-435, 1998.

VAN ITALLIE, C. M.; ANDERSON, J. M. Claudins and epithelial paracellular transport. **Annual Review of Physiology**, Palo Alto, v. 68, p. 403-429, 2006.

VILLANOVA, J. C. O. et al. Síntese e caracterização de beads acrílicos preparados por polimerização em suspensão visando aplicação como excipiente farmacêutico para compressão direta. **Quimica Nova**, São Paulo, v. 35, n. 1, p. 124-131, 2012.

VILLANOVA, J. C. O.; ORÉFICE, R. L.; CUNHA, A. S. Aplicações Farmacêuticas de Polímeros. **Polímeros: Ciência e Tecnologia**, São Carlos, v. 20, n. 1, p. 51-64, 2010.

WACHER, J.; SALPHATI, L.; BENET, L. Z. Active secretion and enterocytic drug metabolism barriers to drug absorption. **Advanced Drug Delivery Reviews**, Amsterdam, v. 46, n. 1-3, p. 89-102, 2001.

WANG, L. et al. Preparation and Evaluation of Solid Dispersion for Nitrendipine–Carbopol and Nitrendipine–HPMCP Systems using a twin screw extruder. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**, Tokyo, v. 53, n. 10, p. 1240-1245, 2005.

WILLMANN, S. et al. Whole-body physiologically based pharmacokinetic population modelling of oral drug administration: inter-individual variability of cimetidine absorption. **The Journal of Pharmacy and Pharmacology**, London, v. 61, n. 7, p. 891-899, 2009.

YOSHIDA, V. M. H. et al. Development and Development and evaluation of a floating multiparticulate gastroretentive system for modified release of AZT. **AAPS PharmSciTech**, Arlington, v. 12, n. 2, p. 658-664, 2011.

ZHU, Q. et al. Modification of crystallization behavior in drug/polyethylene glycol solid dispersions. **Molecular Pharmaceutics**, Washington, v. 9, n. 3, p. 546-553, 2012.