

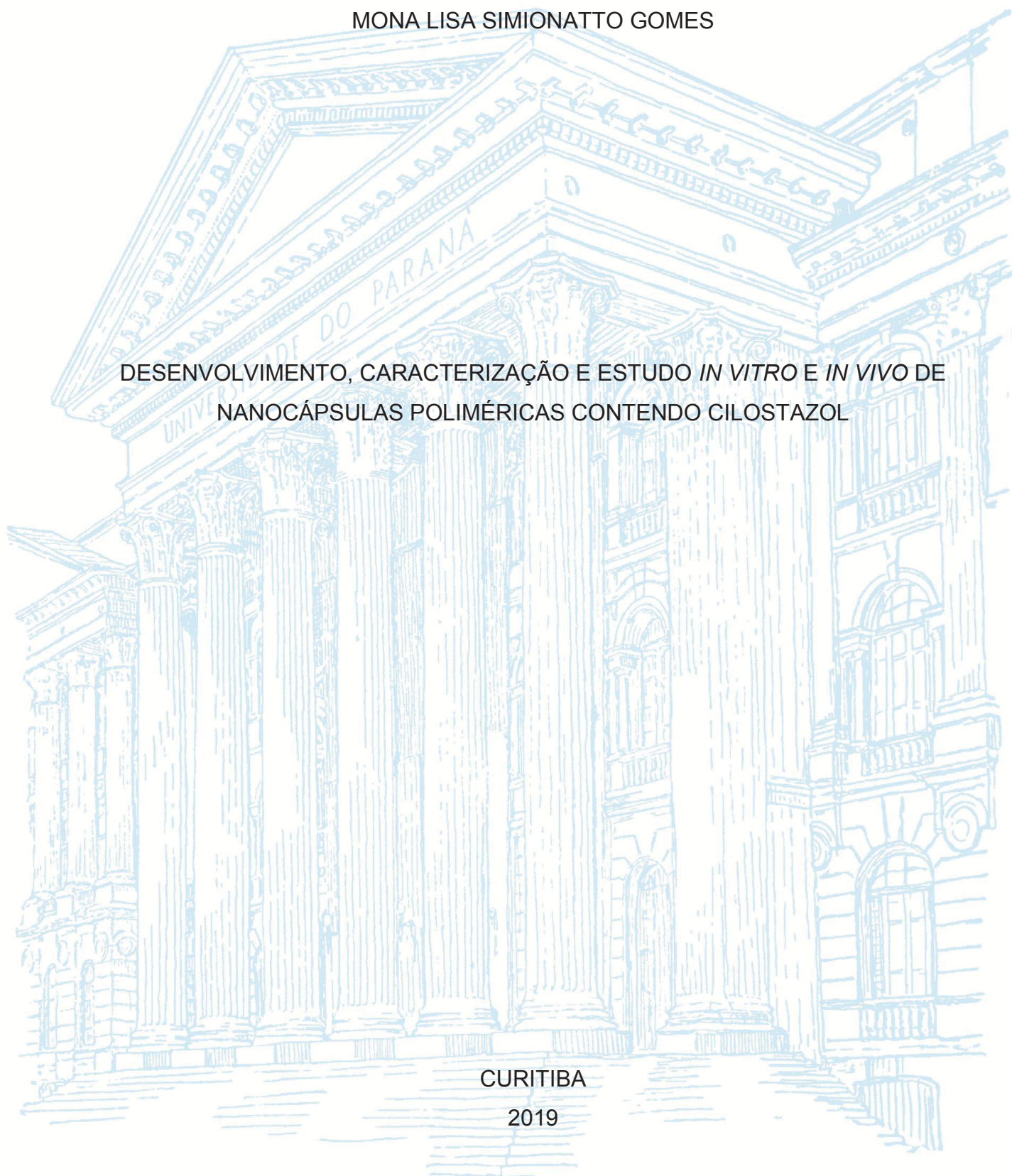
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

MONA LISA SIMIONATTO GOMES

DESENVOLVIMENTO, CARACTERIZAÇÃO E ESTUDO *IN VITRO* E *IN VIVO* DE
NANOCÁPSULAS POLIMÉRICAS CONTENDO CILOSTAZOL

CURITIBA

2019



MONA LISA SIMIONATTO GOMES

DESENVOLVIMENTO, CARACTERIZAÇÃO E ESTUDO *IN VITRO* E *IN VIVO* DE
NANOCÁPSULAS POLIMÉRICAS CONTENDO CILOSTAZOL

Tese apresentada como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor em Ciências Farmacêuticas do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, do Setor de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Paraná.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Sandra Maria Warumby Zanin

Coorientador: Prof. Dr. Paulo Vitor Farago

CURITIBA

2019

Gomes, Mona Lisa Simionatto

Desenvolvimento, caracterização e estudo *in vitro* e *in vivo* de nanocápsulas poliméricas contendo cilostazol [recurso eletrônico] / Mona Lisa Simionatto Gomes – Curitiba, 2019.

Tese (doutorado) – Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas. Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná, 2019.

Orientadora: Professora Dra. Sandra Maria Warumbi Zanin

Coorientador: Professor Dr. Paulo Vitor Farago

1. Cilostazol. 2. Agregação plaquetária. 3. Claudicação intermitente. 4. Liberação controlada de fármacos. 5. Nanopartículas. I. Zanin, Sandra Maria Warumbi. II. Farago, Paulo Vitor. III. Universidade Federal do Paraná. IV. Título.

CDD 615.1



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
SETOR DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO CIÊNCIAS
FARMACÊUTICAS - 40001016042P8

TERMO DE APROVAÇÃO

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da tese de Doutorado de **MONA LISA SIMIONATTO GOMES** intitulada: **DESENVOLVIMENTO, CARACTERIZAÇÃO E ESTUDO *IN VITRO* E *IN VIVO* DE NANOCÁPSULAS POLIMÉRICAS CONTENDO CILOSTAZOL**, que após terem inquirido a aluna e realizada a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua APROVAÇÃO no rito de defesa.

A outorga do título de doutor está sujeita à homologação pelo colegiado, ao atendimento de todas as indicações e correções solicitadas pela banca e ao pleno atendimento das demandas regimentais do Programa de Pós-Graduação.

CURITIBA, 17 de Dezembro de 2019.



PAULO VITOR FARAGO
Presidente da Banca Examinadora



DEISE PREHS MONTRUCCHIO
Avaliador Externo (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)



JOSIANE DE FÁTIMA GASPARI DIAS
Avaliador Interno (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)



JESSICA MENDES NADAL
Avaliador Externo (UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA)



DÉBORA MARIA BORSATO
Avaliador Externo (UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA)

AGRADECIMENTOS

Antes de tudo, agradeço a Deus, o maior dos amigos e o melhor dos mestres, por abençoar todos os dias da minha vida, por iluminar meu caminho e me dar forças para seguir sempre em frente para atingir meus objetivos.

À minha orientadora, Prof^a. Dr^a. Sandra Maria Warumby Zanin, por me aceitar como orientanda e principalmente pelo exemplo de jovialidade, respeito, humildade, carisma e profissionalismo. Foi uma honra tê-la como orientadora e exemplo de vida. Vou carregá-la sempre no meu coração.

Ao meu coorientador, Prof. Dr. Paulo Vitor Farago, exemplo de competência, generosidade, e de ir além do que o dever e a vida impõem. Gratidão eterna por tudo, principalmente pelo exemplo de que é muito mais fácil multiplicar quando sabemos dividir.

À minha irmã Mackelly Simionatto, confidente amorosa, pelo carinho, paciência e companheirismo e por estar sempre torcendo pelas minhas conquistas. Pela determinação e apoio incondicional. Obrigada!

Às amigas, Jéssica Mendes Nadal e Débora Maria Borsato, sempre com orientações significativas, generosidade e amizade enriquecedora nesta caminhada.

Aos meus filhos amados, Alyson Ernani Gomes e Alexandre José Gomes, pela paciência, incentivo, amor e confiança que sempre depositaram em mim. Vocês são a razão da minha vida!

Ao amigo Pedro Zanin, pelo exemplo de prestatividade e espontaneidade. Foi agradável e enriquecedor conhecê-lo.

Aos professores do Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Paraná pelos bons exemplos e ensinamentos compartilhados.

Meu carinho, respeito e gratidão pelas contribuições da banca do exame de qualificação e pela participação dos membros da banca examinadora da defesa.

Ao Complexo de Laboratórios Multiusuários da Universidade Estadual de Ponta Grossa.

À Universidade Federal do Paraná, especialmente ao Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, por permitir esta oportunidade de crescimento técnico-científico.

À Capes pela concessão da bolsa de estudo – código de financiamento 001.

Às demais pessoas que contribuíram direta ou indiretamente na elaboração deste trabalho ou participaram da minha vida, e que, por ventura, eu tenha me esquecido de agradecer.

“Você pode sonhar, projetar, criar e construir o lugar mais maravilhoso do mundo. Mas precisará de Deus e de pessoas especiais para tornar o seu sonho em realidade.”

Walt Disney

RESUMO

O cilostazol (CIL) é um inibidor seletivo da fosfodiesterase III. Atua como agente antiagregante plaquetário e vasodilatador. É o medicamento de primeira escolha para o tratamento clínico da claudicação intermitente (CI) por doença arterial obstrutiva periférica (DAOP). Pertence à classe II do Sistema de Classificação Biofarmacêutica e apresenta baixa solubilidade e elevada permeabilidade no trato gastrointestinal. A dose habitual é de 100 mg, via oral, duas vezes ao dia, o que representa uma desvantagem à adesão ao tratamento. Apresenta vários efeitos colaterais, tais como dor de cabeça, diarreia, coriza e tonturas. Como o CIL tem característica lipofílica, pode ser utilizado no desenvolvimento de sistemas de liberação modificada de fármaco, com a finalidade de melhorar sua biodisponibilidade. O uso de nanopartículas é uma estratégia promissora na promoção do aumento da solubilização aparente do cilostazol melhorando seu perfil de dissolução e, conseqüentemente, sua ação farmacológica. Com esse objetivo, foram obtidas nanocápsulas poliméricas preparadas a partir de blends de poli (ϵ -caprolactona) (PCL) e polietilenoglicol (PEG) contendo CIL, as quais apresentaram valores de pH entre 6,1 e 6,3, tamanho médio de partículas inferior a 137 nm, baixo índice de polidispersão ($\leq 0,22$) e potencial zeta negativo. As nanoformulações demonstraram forma esférica com superfície lisa. Os resultados obtidos por difração de raios X (DRX) e calorimetria exploratória diferencial (DSC) indicaram a amorfização do fármaco em relação ao CIL puro. A espectroscopia na região do infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) não apresentou ligações químicas entre o fármaco e os polímeros. As formulações apresentaram parâmetros de estabilidade adequados. A liberação *in vitro* do fármaco demonstrou liberação prolongada sem efeito de ruptura utilizando a técnica de difusão em sacos de diálise. A liberação do fármaco foi controlada por ambos os mecanismos de relaxamento/degradação do polímero e difusão de Fickian. Para o estudo *in vivo*, as nanocápsulas contendo CIL forneceram um efeito antiagregante plaquetário prolongado para o fármaco estatisticamente semelhante à Aspirina®. Na avaliação do efeito da nanoformulação na morfologia das túnicas da aorta abdominal de ratos Wistar, não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos quanto à celularidade e à espessura dessas túnicas arteriais. Quanto ao perfil lipídico, o grupo que recebeu CIL nanoencapsulado apresentou melhora estatística nos valores de HDL-c e de triglicérides em relação às nanocápsulas sem fármaco. Desse modo, estas formulações podem ser consideradas adequadas para a liberação controlada de CIL conduzindo a melhores perfis de dissolução e potencial efeito terapêutico no tratamento da DAOP.

Palavras-chave: Agregação plaquetária. Claudicação intermitente. Inibidor da fosfodiesterase. Liberação controlada. Nanopartículas poliméricas.

ABSTRACT

Cilostazol (CLZ) acts as a vasodilator and antiplatelet agent and is the main drug for the treatment of intermittent claudication (IC) related to peripheral arterial disease (PAD). This drug belongs to the class II of the Biopharmaceutical Classification System (BCS) and shows low solubility and high permeability in gastrointestinal tract. The usual oral dose is 100 mg twice a day, which represents a disadvantage in treatment compliance. CLZ presents several side effects, such as headache, runny nose, and dizziness. CLZ is a lipophilic drug and the development of controlled drug delivery systems can improve its bioavailability. The use of nanoparticles is a promising strategy to promote increased apparent solubilization of cilostazol improving its dissolution profile and, therefore, its pharmacological action. With this goal it was obtained polymeric nanocapsules prepared from poly(ϵ -caprolactone)-poly(ethylene glycol) blend (PCL-PEG) containing CLZ. Nanocapsules showed pH values between 6.1 and 6.3, average size lower than 137 nm, low polydispersity index (< 0.22) and negative zeta potential. These nanoformulations demonstrated spherical shape with smooth surface. Results achieved by X-ray diffraction (XRD) and differential scanning calorimetry (DSC) indicated drug amorphization compared to pure CLZ. Fourier-transformed infrared spectroscopy (FTIR) showed no chemical bonds between drug and polymers. Formulations presented suitable stability parameters. The *in vitro* drug release demonstrated prolonged release with no burst effect. Drug release was controlled by both mechanisms of polymer relaxation/degradation and Fickian diffusion. Moreover, chosen CLZ-loaded nanocapsules provided an *in vivo* prolonged antiplatelet effect for CLZ statistically similar to aspirin. There was no statistically significant difference among groups regarding the cellularity and thickness of abdominal aorta tunics of Wistar rats when the nanoformulation was evaluated against controls. Regarding the lipid profile, the group that received CLZ-loaded nanocapsules showed statistical improves in HDL-c and triglyceride values compared to unloaded nanocapsules. These formulations can be further used as a feasible oral drug delivery carrier for controlled release of CLZ in order to treat PAD events.

Keywords: Controlled release. Intermittent claudication. Phosphodiesterase inhibitor. Platelet aggregation. Polymeric nanoparticles.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 – ESTRUTURA BÁSICA DA PLACA ATEROMATOSA.....	23
FIGURA 2 – DISFUNÇÃO ENDOTELIAL NA ATEROSCLEROSE.....	24
FIGURA 3 – OBSTRUÇÃO SANGUÍNEA POR PLACAS DE ATEROMA NA DAOP.....	27
FIGURA 4 – ESTRUTURA QUÍMICA DO CILOSTAZOL	29
FIGURA 5 – REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DE NANOCÁPSULAS E NANOESFERAS POLIMÉRICAS.....	36
FIGURA 6 – ESTRUTURA QUÍMICA DA POLI(ε-CAPROLACTONA)	40
FIGURA 7 – FÓRMULA ESTRUTURAL DO POLIETILENOGLICOL.....	42
FIGURA 8 – FLUXOGRAMA DAS ETAPAS DA PESQUISA	47
FIGURA 9 – REPRESENTAÇÃO DO MÉTODO DE OBTENÇÃO DAS SUSPENSÕES DE NANOCÁPSULAS POLIMÉRICAS.....	48
FIGURA 10 – DESENHO ESQUEMÁTICO DA CUBA DE DISSOLUÇÃO	53
FIGURA 11 – FOTOMICROGRAFIAS OBTIDAS POR MEV E MET DAS NANOSUSPENSÕES	63
FIGURA 12 – DIFRATOGRAMAS DO CIL, PCL, PEG, MISTURA FÍSICA (MF) E DAS NANOSUSPENSÕES PREPARADAS COM BLENDS PCL/PEG EM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES (NC0, NC3, NC6 E NC12)	64
FIGURA 13 – ESPECTRO DE FTIR DO CIL, PCL, PEG, MISTURA FÍSICA (MF) E DAS NANOSUSPENSÕES EM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES (NC0, NC3, NC6 E NC12).....	66
FIGURA 14 – CURVAS DE DSC DO CIL, PCL, PEG, TCC, MISTURA FÍSICA (MF) E DAS NANOSUSPENSÕES EM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES (NC0, NC3, NC6 E NC12).....	68

LISTA DE GRÁFICOS

GRÁFICO 1 – VALORES DE PH, TAMANHO DE PARTÍCULA, ÍNDICE DE POLIDISPERSÃO E POTENCIAL ZETA DAS NANOSUSPENSÕES DE CIL AVALIADAS IMEDIATAMENTE À PREPARAÇÃO E 60 DIAS APÓS	69
GRÁFICO 2 – PERFIL DE LIBERAÇÃO IN VITRO EM UMA SOLUÇÃO DE 30% ETANOL-ÁGUA DE CIL E NANOCÁPSULAS DE PCL-PEG (NC3, NC6 E NC12)	71
GRÁFICO 3 – PORCENTAGEM DE INIBIÇÃO DA AGREGAÇÃO PLAQUETÁRIA DE NC0 (CONTROLE), DE CIL LIVRE, DA FORMULAÇÃO NC12 E DA ASPIRINA®.....	73
GRÁFICO 4 – MÉDIA (DP) DA CELULARIDADE DA ARTÉRIA AORTA PARA OS GRUPOS NC12, NC0 (CONTROLE), VEÍCULO E CIL LIVRE	74
GRÁFICO 5 – MÉDIA (DP) DA ESPESSURA DA ARTÉRIA AORTA PARA OS GRUPOS NC12, NC0 (CONTROLE), VEÍCULO E CIL LIVRE	75

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 – COMPOSIÇÃO DAS FORMULAÇÕES DAS SUSPENSÕES DE NANOCÁPSULAS POLIMÉRICAS	49
TABELA 2 – CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DAS NANOSUSPENSÕES ...	60
TABELA 3 – TEOR DE CIL ENCAPSULADO E EFICIÊNCIA DE ENCAPSULAÇÃO (EE) DAS NANOCÁPSULAS DE BLENDS PCL-PEG	62
TABELA 4 – VALORES DE MÉDIA (DP) PARA OS PARÂMETROS DO PERFIL LIPÍDICO PARA OS GRUPOS NC12, NC0 (CONTROLE), VEÍCULO E CIL LIVRE	76

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

α e β	Constante cinética de dissolução para a equação biexponencial
λ	Comprimento de onda
%D	Porcentagem de dissolução
a e b	Constantes que incorporam as características estruturais e geométricas da forma farmacêutica
A e B	Concentrações iniciais do fármaco que contribuem para as duas fases de dissolução na equação biexponencial
ANOVA	Análise de variância
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
CI	Claudicação intermitente
CIL	Cilostazol
CV%	Coeficiente de variação porcentual
DM	<i>Diabetes mellitus</i>
DP	Desvio padrão
DPR	Desvio padrão relativo
DSC	<i>Differential Scanning Calorimeter</i> – Calorimetria exploratória diferencial
EE	Eficiência de encapsulação
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
FTIR	<i>Fourier Transform Infrared Spectroscopy</i> – Infravermelho com transformada de Fourier
HPLC	<i>High performance liquid chromatography</i> – Cromatografia líquida de alta eficiência
IPD	Índice de polidispersão
KBr	Brometo de potássio
kV	Quilovolts
mA	Miliampere
MEV	Microscopia eletrônica de varredura
MF	Mistura física

mV	Milivolt
$\overline{Mw}$	Massa molar numérica média
N	Número de repetições
<i>N</i>	Expoente de liberação
NC0	Suspensões de nanocápsulas de PCL/PEG sem cilostazol
NC3	Suspensões de nanocápsulas de PCL/PEG com cilostazol (3 mg.mL ⁻¹)
NC6	Suspensões de nanocápsulas de PCL/PEG com cilostazol (6 mg.mL ⁻¹)
NC12	Suspensões de nanocápsulas de PCL/PEG com cilostazol (12 mg.mL ⁻¹)
nm	Nanômetro
PCL	Poli(ϵ -caprolactona)
PEG	Polietilenoglicol
pH	Potencial hidrogeniônico
PLA	Poli(ácido láctico)
PTFE	Politetrafluoroetileno
PZ	Potencial zeta
<i>R</i>	Coeficiente de correlação
Span® 80	Monooleato de sorbitano
<i>T</i>	Tempo
TCC	Triglicerídeos dos ácidos cáprico /caprílico
<i>Td</i>	Tempo no qual 63,2% do fármaco está dissolvido
Tween® 80	Polissorbato 80, monooleato de sorbitano etoxilado
u.a.	Unidades arbitrárias
μm	Micrômetro

LISTA DE SÍMBOLOS

A	Alfa
B	Beta
E	Épsilon
%	Por cento
°	Graus
°C	Graus Celsius
®	Registrado
>	Maior que
<	Menor que
μ	Micro

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	18
2	OBJETIVOS	21
2.1	Objetivo Geral	21
2.2	Objetivos específicos.....	22
3	REVISÃO DA LITERATURA	23
3.1	DOENÇA ATEROSCLERÓTICA E CLAUDICAÇÃO INTERMITENTE	23
3.2	ASPECTOS BIOFARMACÊUTICOS DO CILOSTAZOL	29
3.3	NANOPARTÍCULAS POLIMÉRICAS COMO SISTEMAS DE LIBERAÇÃO MODIFICADA DE FÁRMACOS	34
4	MATERIAL E MÉTODOS.....	44
4.1	EQUIPAMENTOS.....	44
4.2	REAGENTES E SOLVENTES.....	45
4.2.1	Fármaco	45
4.2.2	Polímeros	45
4.2.3	Água Purificada	45
4.2.4	Solventes e demais reagentes	45
4.2.5	Outros materiais	46
4.3	DESENHO EXPERIMENTAL	46
4.4	PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL.....	47
4.4.1	Obtenção das nanocápsulas poliméricas de CIL.....	47
4.4.2	Caracterização das suspensões de nanocápsulas poliméricas.....	49
4.4.2.1	Caracterização físico-química	49
4.4.2.2	Teor de fármaco e eficiência de encapsulação	50
4.4.2.3	Microscopia eletrônica de varredura (MEV) e de transmissão (MET)	50
4.4.2.4	Análise por difração de raios X.....	51
4.4.2.5	Avaliação por espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (FTIR).....	51
4.4.2.6	Calorimetria exploratória diferencial (DSC)	52

4.4.3	Estudo da estabilidade	52
4.4.4	Estudo da liberação do fármaco <i>in vitro</i>	52
4.4.4.1	Avaliação dos perfis de liberação	53
4.4.5	Ensaio farmacológico <i>in vivo</i>	55
4.4.5.1	Animais e condições de manutenção	55
4.4.5.2	Protocolo experimental.....	55
4.4.5.3	Preparação do plasma rico em plaquetas (PRP) e do plasma pobre em plaquetas (PPP)	56
4.4.5.4	Avaliação da agregação plaquetária	56
4.4.5.5	Avaliação morfológica das tûnicas da aorta abdominal e do perfil lipídico	57
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	60
5.1	CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA	60
5.2	AVALIAÇÃO DA EFICIÊNCIA DE ENCAPSULAÇÃO	61
5.3	MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV) E TRANSMISSÃO (MET).....	62
5.4	DIFRAÇÃO DE RAIOS X.....	64
5.5	ESPECTROSCOPIA DE ABSORÇÃO NA REGIÃO DO INFRAVermelho COM TRANSFORMADA DE FOURIER (FTIR) .	65
5.6	CALORIMETRIA EXPLORATÓRIA DIFERENCIAL (DSC)	67
5.7	ESTUDO DA ESTABILIDADE	68
5.8	ESTUDO DA LIBERAÇÃO DO FÁRMACO <i>IN VITRO</i>	70
5.9	EXPERIMENTOS FARMACOLÓGICOS <i>IN VIVO</i>	72
5.9.1	Avaliação da atividade antiagregante plaquetária	72
5.9.2	Avaliação da morfologia das tûnicas da aorta e perfil lipídico	74
6	CONCLUSÃO	78
	REFERÊNCIAS	79
	APÊNDICE 1 – MANUSCRITO 1: A simple RP-HPLC/UV method for determination of cilostazol in polymeric nanoparticles suspensions: development and validation	94

APÊNDICE 2 – MANUSCRITO 2: Long-lasting anti-platelet activity of cilostazol from poly(epsilon-caprolactone)- poly(ethylene glycol) blend nanocapsules.....	102
APÊNDICE 3 – PATENTE	112

1 INTRODUÇÃO

A doença arterial obstrutiva periférica (DAOP) ocorre devido a placas ateroscleróticas limitantes do fluxo sanguíneo nos membros inferiores, o que leva à claudicação intermitente (CI), a qual se apresenta como uma condição de extensa dor. Entre as manifestações observadas na DAOP, destacam-se: desconforto, parestesia, formigamento, câibras e fadiga dos músculos das pernas durante a caminhada, a qual é aliviada após alguns minutos de repouso. Além disso, devido à mobilidade restrita, sintomas depressivos e isolamento social também estão associados à CI (WATTANAKIT et al., 2005).

A CI é uma condição relativamente comum, cuja frequência aumenta dramaticamente com a idade e taxas significativamente mais altas de ocorrência são observadas em idosos. A prevalência de CI entre pessoas com idades entre 45-54 anos é de 0,6% e entre 55-74 anos é de 4,6%. Dezoito por cento da população com mais de 70 anos de idade têm CI, fumantes e diabéticos têm taxa superior a 50-75%, e o risco de amputação é de aproximadamente 1% ao ano. A CI é mais comum entre homens do que em mulheres e entre os indivíduos com outras manifestações de aterosclerose (MERU et al., 2006).

O tratamento farmacológico para pacientes com CI tem dois objetivos distintos, mas complementares: (1) alívio dos sintomas, ou seja, melhora da distância de caminhada e qualidade de vida e (2) prevenção de complicações vasculares secundárias, especialmente ruptura de placas que levam a eventos trombóticos agudos que podem apresentar risco de amputação de membros e/ou risco de morte (MALGOR et al., 2015).

O cilostazol (CIL), 6-[4-(1-ciclohexil-1H-tetrazol-5-il)butoxi]-3,4-diidro-2(1H)-quinolinona, é altamente recomendado no tratamento sintomático da CI com ausência de insuficiência cardíaca (GOMES et al., 2015). É um inibidor da fosfodiesterase III, cuja ação provoca um aumento do monofosfato cíclico de adenosina (AMPC) intracelular, levando à dilatação do músculo liso arterial, aumento da sinalização do óxido nítrico e, em menor extensão, a diminuição da agregação plaquetária (TABAGI; HARA, 2016). Efeitos pleiotrópicos adicionais incluem

aumento dos níveis de HDL e níveis mais baixos de triglicerídeos (ELAM et al., 1998). Em uma análise combinada de nove ensaios clínicos randomizados, o CIL (100 mg duas vezes ao dia) foi associado a uma melhoria na distância máxima de caminhada a partir da linha de base em 20 semanas, quando comparado ao placebo. Notavelmente, estes efeitos foram independentes de idade, sexo, tabagismo, diabetes, duração da DAOP, presença ou não de infarto do miocárdio e uso de beta-bloqueadores (PANDE; HIATT; CREAGER, 2010).

No entanto, a descontinuação do tratamento é, normalmente, bastante comum. Tem sido estimado que até 60% dos pacientes param de tomar o cilostazol após 36 meses, devido a efeitos colaterais (HIATT; MONEY; BRASS, 2008). Os efeitos colaterais como: dor de cabeça, diarreia, tonturas, palpitações e taquicardia são usualmente observados e estão, possivelmente, relacionados ao aumento do nível intracelular de AMPc (TAN et al., 2015). Devido a um mecanismo de ação semelhante aos agentes inotrópicos amrinona e milrinona, que demonstraram efeito adverso de mortalidade por insuficiência cardíaca avançada, a agência *Food and Drug Administration* estabeleceu um aviso na caixa para o CIL, proibindo seu uso em pacientes com insuficiência cardíaca congestiva (AGRAWAL; EBERHARDT, 2015).

Com base na sua solubilidade baixa e permeabilidade alta no trato gastrointestinal (GI), o CIL é classificado como um fármaco de classe II pelo Sistema de Classificação Biofarmacêutica, o que indica que a sua absorção é dependente da taxa de dissolução (CHEN et al., 2014; WU; BENET, 2005). Para esses fármacos, a solubilidade baixa do fármaco pode afetar a taxa e a extensão da absorção, o que pode comprometer a biodisponibilidade. Neste contexto, a absorção de CIL no trato gastrointestinal é geralmente lenta, variável e incompleta (MAHMOUD; SHUKR; BENDAS, 2014). Por conseguinte, várias estratégias farmacotécnicas para superar estas limitações têm sido propostas. Complexo de inclusão entre β -ciclodextrina e CIL foi preparado por liofilização e mostrou maior solubilidade aparente e taxa de dissolução aumentada em comparação com o fármaco puro (GAWALI et al., 2009). Em estudo semelhante, o complexo de inclusão entre dimetil- β -ciclodextrina e CIL foi obtido por coprecipitação e aumentou significativamente a taxa de dissolução e a absorção em comparação com comprimidos comerciais de cilostazol 50 mg e com o

CIL puro (PATEL; RAJPUT, 2009). Nanosuspensões de CIL foram preparadas pelo método de nanoprecipitação/homogeneização a alta pressão, as quais foram pulverizadas e secas posteriormente. A biodisponibilidade de comprimidos de CIL preparados, empregando um pó cristalino nanométrico seco por pulverização após administração oral a cães beagle foi notadamente aumentada em comparação com a produzida por comprimidos nanométricos e comprimidos comerciais (MIAO et al., 2011). Uma formulação autonanoemulsionante lipídica de CIL foi desenvolvida por um desenho fatorial completo 2^3 e mostrou interessante aumento na solubilidade de equilíbrio e eficiência de dissolução quando comparado ao CIL puro (PUND; SHETE; JAGADALE, 2014). As dispersões sólidas contendo CIL foram desenvolvidas por granulação por fusão a quente e por aderência térmica. A solubilidade relativa foi quase três vezes superior à dos comprimidos de Pletal® (cilostazol 50 mg) em composições contendo succinato de D- α -tocoferol polietilenoglicol e vitamina E como excipientes, nos quais foi demonstrado um padrão de liberação controlada de fármacos (CHEN et al., 2014). Os sistemas de liberação de fármaco autonanoemulsificantes contendo CIL foram preparados por sonicação e demonstraram uma melhor dissolução *in vitro* de fármacos e maiores biodisponibilidade oral e parentérica *in vivo* (MAHMOUD; SHUKR, 2014). Foi preparada uma dispersão sólida amorfa contendo CIL, povidona, óleo vegetal hidrogenado e carboximetilcelulose sódica por secagem por aspersão e foi demonstrada uma liberação controlada e ausência de recristalização do fármaco (VERMA; RUDRARAJU, 2015). A dispersão sólida seca por pulverização contendo Eudragit® L100 e Eudragit® S100 também proporcionou uma liberação controlada de CIL (PARK; CHOI, 2015).

Até o momento, não há relato de outros autores na literatura sobre a nanoencapsulação de CIL em nanocápsulas poliméricas. As nanocápsulas são definidas como sistemas nanovesiculares caracterizados por uma concha de polímero envolvendo um núcleo líquido lipofílico ou hidrofílico. A cavidade central é geralmente composta de óleo (MORA-HUERTAS; FESSI; ELAISSARI, 2010). De preferência, o fármaco é aprisionado ou dissolvido no núcleo líquido. No entanto, a adsorção na superfície da partícula também pode ocorrer (CRUZ et al., 2006). Em comparação com as nanoesferas, que está disposta como uma matriz polimérica, as

nanocápsulas têm se mostrado mais vantajosas devido à sua maior capacidade de carga do fármaco, melhor proteção dos fármacos contra a degradação e redução da liberação imediata (CHASSOT et al., 2015a). Além disso, como descrito brevemente, trabalhos anteriores foram dedicados a discutir parâmetros de formulação, solubilidade do fármaco, comportamento de dissolução e biodisponibilidade do CIL a partir desses sistemas. Nenhum outro estudo foi focado na utilização de nova estratégia de administração controlada para investigar o efeito farmacológico *in vivo* do CIL.

Considerando estes dados, o objetivo deste trabalho foi verificar se a nanoencapsulação de CIL em nanocápsulas de blendas de PCL-PEG pode tanto, diminuir a dosagem oral de fármaco, como prolongar o efeito antiagregante plaquetário *in vivo*, de modo a minimizar os seus efeitos inconvenientes na farmacoterapia. Inicialmente, as nanocápsulas contendo CIL foram preparadas pelo método de deposição interfacial do polímero pré-formado e caracterizadas por métodos físico-químicos, morfológicos, espectroscópicos e térmicos. Em seguida, a eficiência de encapsulação e os perfis de liberação *in vitro* foram determinados usando um método analítico por HPLC/UV previamente validado. Além disso, a formulação escolhida foi avaliada quanto à atividade antiagregante plaquetária e seu efeito biológico na morfologia das túnicas da aorta abdominal e no perfil lipídico *in vivo* em ratos.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Promover a obtenção, a caracterização e a avaliação da liberação *in vitro* e de atividades *in vivo* de nanocápsulas poliméricas para a liberação modificada do cilostazol.

2.2 Objetivos específicos

- Realizar a obtenção de suspensões de nanocápsulas de blendas de PCL-PEG contendo CIL;
- Efetuar a caracterização dos sistemas poliméricos por meio de análises morfológicas, espectroscópicas e térmicas;
- Determinar a eficiência de encapsulação por método analítico previamente validado;
- Estudar a estabilidade das formulações após 60 dias da produção;
- Avaliar a liberação *in vitro* do fármaco a partir dos sistemas poliméricos, empregando o ensaio de dissolução;
- Promover a avaliação biológica das nanocápsulas poliméricas contendo CIL e do fármaco puro, empregando modelo *in vivo* de atividade antiagregante plaquetária;
- Investigar o efeito biológico das nanocápsulas poliméricas contendo CIL na morfologia das túnicas da aorta abdominal e no perfil lipídico de ratos Wistar.

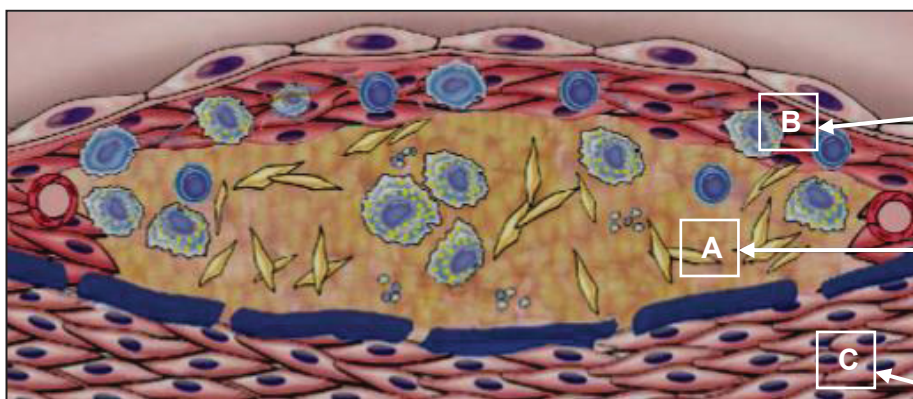
3 REVISÃO DA LITERATURA

3.1 DOENÇA ATEROSCLERÓTICA E CLAUDICAÇÃO INTERMITENTE

As doenças cardiovasculares, principalmente as doenças cardíacas isquêmicas e o acidente vascular encefálico, vêm sendo as maiores causas de morte nos últimos 15 anos, responsáveis por 15,2 milhões de mortes no ano de 2016 (OPAS, 2017).

A aterosclerose é uma doença inflamatória crônica de origem multifatorial, que causa muito mais morbidade e mortalidade no mundo ocidental do que qualquer outro transtorno. Esta tem como alvos principais a aorta e as artérias coronárias e cerebrais, porém pode comprometer todo o sistema arterial, resultando em sérias complicações cardiovasculares (MARTELLI, 2014). Não é uma doença nova, associada a hábitos dos tempos modernos, mas foi relatada em múmias egípcias há mais de 3.500 anos (RUFFTER, 1911). É caracterizada por lesões da camada íntima, denominadas ateromas, que fazem protrusão nas luzes dos vasos sanguíneos. Os ateromas consistem em lesões elevadas com centro mole, amarelo e grumoso de lipídios (principalmente colesterol e seus ésteres), cobertos por uma cápsula fibrosa branca (Figura 1).

FIGURA 1 – ESTRUTURA BÁSICA DA PLACA ATEROMATOSA

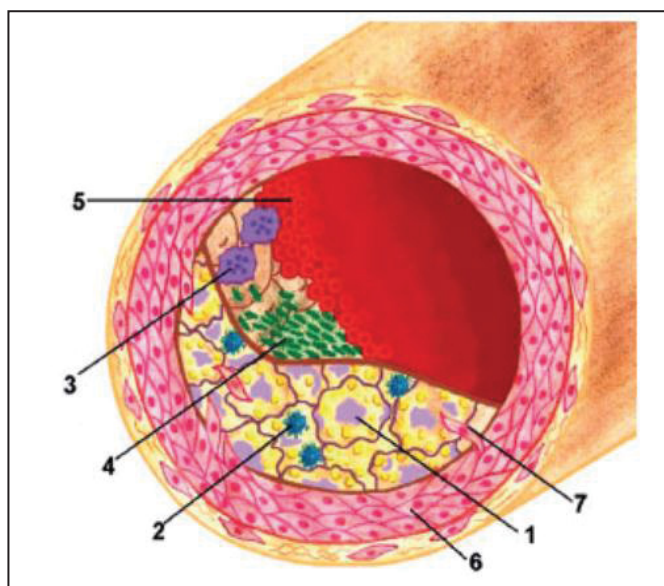


NOTA: A - CAPSULA FIBROSA (células musculares lisas, macrófagos, células espumosas, linfócitos, colágeno, elastina, proteoglicanos e neovascularização). B - CENTRO NECRÓTICO (restos celulares, cristais de colesterol, células espumosas e cálcio). C - MÉDIA.

FONTE: Adaptado de KUMAR et al. (2005).

A doença aterosclerótica está associada a fatores de risco classificados em: primários, como dislipidemias, forças mecânicas (hipertensão arterial), proteínas anormalmente glicosiladas (*Diabetes mellitus*) e toxinas exógenas (tabagismo); e secundários, como gênero, idade, sedentarismo e obesidade. Estes apresentam efeito multiplicativo, sendo que quando estão presentes três fatores de risco, a taxa de infarto do miocárdio aumenta sete vezes (BARROSO et al., 2017). Os fatores causam lesão endotelial prejudicando a capacidade do endotélio de regulação fisiológica do tônus vascular, adesão celular, migração de células musculares lisas e atividade antitrombótica. Portanto, levam a uma disfunção que irá aumentar a permeabilidade da membrana às lipoproteínas, ocasionando acúmulo destas no espaço subendotelial, bem como de elementos fibrosos e inflamatórios (STORCH et al., 2017), como demonstrado na Figura 2.

FIGURA 2 – DISFUNÇÃO ENDOTELIAL NA ATEROSCLEROSE



NOTA: 1 – Célula espumosa; 2 – Linfócito T; 3 – Migração de leucócitos; 4 – Agregação de plaquetas; 5 – Eritrócitos; 6 – Células musculares lisas; 7 – Migração de células musculares lisas.

FONTE: Adaptado de ROSS (1999).

O depósito de lipoproteínas de baixa densidade (LDL) na parede arterial, processo-chave no início da aterogênese, ocorre proporcionalmente à concentração

destas lipoproteínas no plasma. Retidas, as partículas de LDL sofrem oxidação, causando a exposição de diversos epítomos, tornando-as imunogênicas e passíveis de serem reconhecidas por receptores da imunidade inata, como os receptores do tipo Toll (TLRs). Essa modificação de LDL é acompanhada por uma forte degradação dos seus ácidos graxos poli-insaturados, gerando um número de fragmentos de comprimento de cadeia mais curtos altamente reativos (LINTON et al., 2019).

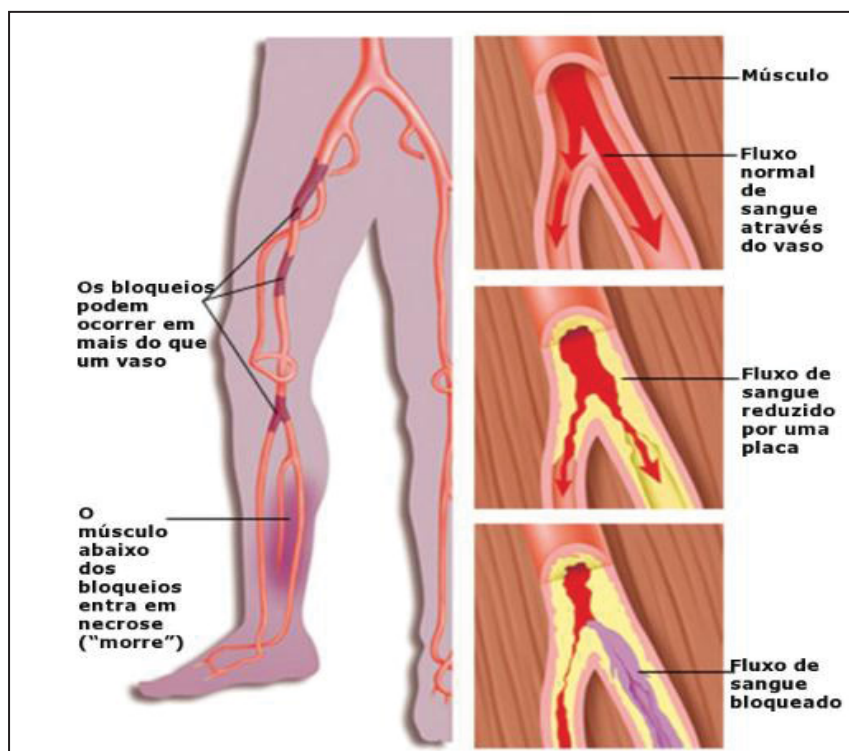
As partículas oxidadas são citotóxicas para as células endoteliais, resultando em lesões com a expressão de várias moléculas de adesão, como selectinas dos tipos E e P e a molécula de adesão vascular VCAM-1. Estas, em sinergismo com citocinas e quimiocinas, como a Interleucina-8 (IL-8), induzem a atração de monócitos e linfócitos para a intimidade da parede arterial (COOK-MILLS; MARCHESE; ABDALA-VALENCIA, 2011). Além disso, a presença de produtos de estresse tecidual e degradação de matriz extracelular promovem o estímulo necessário para a produção de proteases, que posteriormente participam dos mecanismos de ruptura da placa, levando à instabilidade e aos eventos agudos conhecidos como aterotrombose.

Os monócitos são as primeiras células a chegarem ao local da lesão, podendo ser diferenciados em: monócitos clássicos, intermediários e não clássicos; sendo os intermediários e os clássicos, células pró-inflamatórias, cuja presença em alta proporção foi associada a maior ocorrência de doença arterial coronariana, aumento da espessura da camada íntima arterial e instabilidade da placa. Ao migrarem para o espaço subendotelial recebem diferentes estímulos para sua diferenciação em macrófagos. Estes captam as LDL oxidadas, sendo então chamados de células espumosas e são os principais componentes das estrias gordurosas, descritas como lesões macroscópicas iniciais da aterosclerose que se apresentam como múltiplas máculas amareladas e planas, que coalescem em lesões maiores, com 1 cm ou mais de comprimento. Uma vez ativados, os macrófagos promovem a progressão da placa aterosclerótica, amplificando a inflamação por meio da secreção de citocinas e de enzimas proteolíticas, que degradam o colágeno e outros componentes teciduais locais (SPOSITO, 2007).

Outros mediadores também participam do processo aterosclerótico, como os linfócitos T, que, embora menos numerosos que os macrófagos no interior do ateroma, podem se diferenciar e produzir citocinas que modulam o processo inflamatório local. Ainda, a produção de interleucina-1 (IL-1) estimula a migração e proliferação das células musculares lisas da camada média arterial. Estas, ao migrarem para a íntima, produzem citocinas, fatores de crescimento e a matriz extracelular que formará parte da capa fibrosa da placa aterosclerótica (STEINL; KAUFMANN, 2015). Nas placas estáveis há predomínio de colágeno organizado em capa fibrosa espessa, escassas células inflamatórias, e núcleo lipídico e necrótico de proporções menores. Já as placas instáveis apresentam atividades inflamatória e proteolítica intensas, núcleo lipídico e necrótico proeminentes, e ainda, capa fibrótica tênue. A ruptura desta capa expõe o material lipídico altamente trombogênico, levando à geração de trombina, ativação plaquetária e finalmente, formação do trombo. Sendo assim, este processo é um dos principais determinantes das complicações clínicas da doença aterosclerótica.

Como sua manifestação mais comum é a DAOP, caracterizada pela obstrução aterosclerótica progressiva das artérias dos membros inferiores, como demonstrado na Figura 3, os dados epidemiológicos relacionados com a mortalidade por aterosclerose refletem os óbitos causados pela doença cardíaca. Presume-se que 16% da população com mais de 55 anos seja portadora dessa enfermidade (BORGES, 2009). No Brasil, os dados relacionados à prevalência da DAOP e seus fatores de risco são escassos, estimando uma ocorrência em cerca de 20% em pacientes acima de 65 anos (DURAZZO et al., 2005). Nos Estados Unidos, entre 8 e 12 milhões de pessoas possuem a doença, sendo que um terço delas apresenta os sintomas característicos da claudicação intermitente, enquanto o restante pode ser assintomático (TORRENT et al., 2014).

FIGURA 3 – OBSTRUÇÃO SANGUÍNEA POR PLACAS DE ATEROMA NA DAOP



FONTE: Harvard Medical, adaptado (2019).

A claudicação intermitente é relativamente comum, resultante da DAOP devido à aterosclerose da aorta abdominal e das artérias dos membros inferiores, cuja frequência aumenta substancialmente com a idade e taxas significativamente mais altas de ocorrência são observadas em adultos mais velhos. É mais comum entre os homens do que as mulheres e entre os indivíduos com outras manifestações de aterosclerose. Sua prevalência entre pessoas com idades entre 45-54 anos é de 0,6% e entre 55-74 anos é de 4,6%. Sabe-se que, 18% da população com mais de 70 anos de idade tem CI, fumantes e diabéticos apresentam taxa superior a 50-75%, e o risco de amputação é de aproximadamente 1% ao ano (MERU et al., 2006). Assim, sendo uma manifestação da aterosclerose sistêmica, os fatores de risco associados são semelhantes aos apresentados em outras doenças ateroscleróticas, como idade, sexo masculino (principalmente negros), tabagismo, sedentarismo, obesidade e diabetes (MOTA et al., 2017).

A CI caracteriza-se pela redução do aporte de fluxo sanguíneo para o tecido muscular esquelético dos membros inferiores durante o exercício, que ocorre

durante a caminhada e desaparece em menos de 10 minutos de repouso. Portanto, o estreitamento do vaso sanguíneo causa um desequilíbrio entre o consumo e a demanda de oxigênio resultando em claudicação, limitações ao exercício ou perda tecidual. Os sintomas caracterizam-se por desconforto, dor e parestesia no quadril, glúteos, coxas, panturrilhas ou pés, induzidos pelo exercício e aliviados após poucos minutos de repouso (OLIN, 2002).

O diagnóstico é feito pela avaliação clínica e por métodos não invasivos, com uso de questionários e palpação de pulsos periféricos. A dor desencadeada pela marcha é de forte intensidade, localizada na musculatura posterior da perna, apresenta rápido alívio após a cessação da deambulação e ocorre em locais relacionados ao sítio de obstrução arterial. Nesse sentido, a oclusão das artérias ilíacas leva a dor em glúteos e em coxa, enquanto lesões da artéria femoral superficial, artéria mais acometida pela DAOP, levam à claudicação de panturrilha. Apesar da evolução benigna, em que dificilmente ocorre isquemia crítica do membro, a CI impõe restrições ao estilo de vida, limitando a velocidade e a distância de marcha, podendo ocasionar atrofia e disfunção progressiva dos membros inferiores.

Seu tratamento é baseado na prática de exercícios e na farmacoterapia específica. O mecanismo de melhora através da atividade física ainda não está totalmente elucidado. Acredita-se que o exercício favoreça a formação de novos vasos, a produção e liberação de óxido nítrico, promovendo uma maior vasodilatação, e ainda, a otimização do metabolismo enzimático muscular e do consumo de oxigênio, além de auxiliar na promoção do aumento dos níveis de HDL, da redução dos níveis de triglicérides, do controle dos níveis de pressão arterial e de atenuar a resposta inflamatória lesiva ao endotélio vascular (BARBOSA; DALLE, 2008). Já a terapia medicamentosa para pacientes com CI tem por objetivos: o alívio dos sintomas, com melhora da distância de caminhada e qualidade de vida e a prevenção de complicações vasculares secundárias, especialmente ruptura de placas que levam a eventos trombóticos agudos, podendo estes serem membros - ameaçadores e/ou com risco de morte (MALGOR et al., 2015).

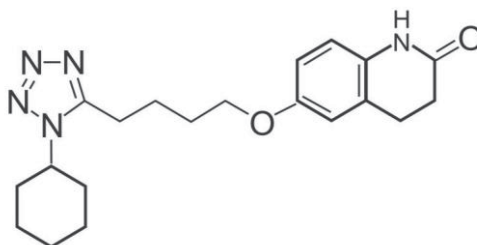
O agente farmacológico de primeira escolha para essa finalidade é o CIL, que apresenta propriedades vasodilatadoras e antiagregante plaquetária emergindo

como uma eficiente opção no combate às consequências desse processo patológico (NURULLAHOGLU-ATAHK et al., 2017; NORGREN et al., 2007).

3.2 ASPECTOS BIOFARMACÊUTICOS DO CILOSTAZOL

A fórmula empírica do CIL é $C_{20}H_{27}N_5O_2$, com massa molecular de 369,46 g.mol⁻¹. Sendo um derivado quinolônico (2-oxo-quinolona), sua fórmula estrutural é a 6-[4-(1-ciclohexil-1H-tetrazol-5-il)butoxi]-3,4-diidro-2(1H)-quinolinona e está representada na Figura 4. Apresenta-se como um cristal de cor branca ou um pó cristalino levemente solúvel em acetona (0,738%, *m/v*), metanol (0,645%, *m/v*) e etanol (0,386%, *m/v*), e praticamente insolúvel em água (0,000334%, *m/v*), ácido clorídrico 0,1 mol.L⁻¹ (0,000349%, *m/v*) e hidróxido de sódio 0,1 mol.L⁻¹ (0,000307%, *m/v*) (SHI et al., 2005; SHIMIZU et al., 1985).

FIGURA 4 – ESTRUTURA QUÍMICA DO CILOSTAZOL



Quanto ao Sistema de Classificação Biofarmacêutica (SCB), o CIL pertence ao Grupo II, possuindo baixa solubilidade e alta permeabilidade, sendo sua absorção dependente da taxa de dissolução (CHEN et al., 2014; WU; BENET, 2005).

Sua biodisponibilidade absoluta não é conhecida, já a biodisponibilidade relativa varia entre 87 e 100%, após a administração oral da formulação disponível em comprimido (200 mg/dia), quando comparada a uma solução etanólica e suspensão oral. O início de ação ocorre duas a quatro semanas após o início do tratamento e a absorção é aumentada pela associação com alimentos gordurosos.

A ligação do CIL às proteínas plasmáticas ocorre em torno de 95 a 98%, com maior frequência à albumina. Sofre biotransformação hepática pelas enzimas do citocromo P450 e resulta, principalmente, nos metabólitos ativos: 3,4-diidro-cilostazol (97,4%) e 4' – *trans* – hidroxí - cilostazol (66%). Em relação à sua excreção pela urina e fezes, ocorre nas formas biotransformadas respectivamente, cerca de 75% e 20%. A meia-vida de eliminação para o CIL é de 11 a 13 horas (CEBRIM/CFF, 2004).

A enzima fosfodiesterase III (FDE3) apresenta como atividade a conversão do monofosfato de adenosina cíclico (AMPc) em 3',5' – AMP cíclico. Este é um mensageiro químico fundamental na regulação da proliferação celular, agregação plaquetária, dilatação de vasos sanguíneos e apoptose. O CIL é um potente e seletivo inibidor da FDE3. Portanto, sua ação é justificada por estimular o relaxamento dos vasos (dilatação do músculo liso arterial) pelo aumento dos níveis de AMPc intracelular e aumento da sinalização do óxido nítrico (ROSA; BARONI; PORTAL, 2008; MORISHITA, 2006; CRAIG, 2001; KOHDA et al., 1999).

A agregação plaquetária ocorre devido à formação de pontes de fibrinogênio, visto que este se liga aos sítios da glicoproteína IIb/IIIa na membrana fosfolipídica da plaqueta, tendo estes sido expostos após a ligação do difosfato de adenosina (ADP) aos seus sítios específicos e mudança de conformação. A ligação fibrinogênio-glicoproteína só ocorre após a plaqueta sofrer a alteração para a forma de pseudópode, ou seja, a glicoproteína IIb-IIIa é cálcio-dependente. Em presença de cálcio, forma-se um complexo estável na superfície das plaquetas ativadas. A agregação também ocorre devido ao metabolismo do ácido araquidônico liberado a partir da membrana fosfolipídica das plaquetas pela ativação da enzima fosfolipase A2. Subsequentemente, a enzima cicloxigenase (COX-1) converte o ácido araquidônico em endoperóxidos cíclicos. Estes podem sofrer diferentes ações: I) serem convertidos pela tromboxano sintetase a tromboxano A2 (TXA2), funcionando como um potente agonista que induz a agregação; II) serem convertidos, pelas células endoteliais, em prostaciclina (PGI2), um importante inibidor da agregação plaquetária (BERNARDI; MOREIRA, 2004).

Sendo assim, o CIL inibe reversivelmente a agregação plaquetária induzida pelo ADP, colágeno, ácido araquidônico, epinefrina, tromboxano A2, fator de

ativação plaquetária e o estresse associado à deformação da plaqueta, além de promover broncodilatação e diminuição da concentração plasmática de trombomodulina em diabéticos (CEBRIM/CFF, 2004).

As propriedades vasodilatadoras do CIL abrangem desde a microcirculação cerebral até os vasos de membros inferiores, de modo a promover a regulação do tônus vasomotor arterial, bem como, o relaxamento da musculatura pela hiperpolarização da membrana plasmática, devido ao estímulo dos canais de potássio ativados por cálcio. Portanto, o uso do medicamento contribui para os efeitos inibidores da reestenose pós-angioplastia (BORGES, 2009).

Não há evidências de prolongamento do tempo de sangramento quando comparado a outros medicamentos antiagregantes plaquetários, como ácido acetilsalicílico (AAS) e clopidogrel ou ainda, antitrombóticos com ação vasodilatadora, como o ticlopidino (ROSA et al., 2008).

Os mecanismos responsáveis pela prevenção de reestenose após *stent* coronariano pelo uso de CIL se devem ao fato do acúmulo de AMPc, pela diminuição da atividade da FDE3, que também promove a regulação de antioncogenes p53 e p21 e do fator de crescimento do hepatócito (HGF). O bloqueio da proteína p53 conduz à apoptose de células do músculo liso vascular, sendo capaz de inibir a replicação e o crescimento destas células (BORGES, 2009). Já o HGF estimula a rápida regeneração de células endoteliais, impedindo a hiperplasia pelo bloqueio do crescimento anormal de células musculares lisas vasculares e melhora da função endotelial (BENJO et al., 2014; WARNER et al., 2014; ROSA; BARONI; PORTAL, 2008). Efeitos pleiotrópicos adicionais incluem aumento dos níveis de HDL-colesterol e redução dos níveis de triglicerídeos no sangue. E consequentemente, promove a redução do risco cardiovascular, principalmente em pessoas com *Diabetes mellitus* (DM) (BORGES, 2009).

O CIL foi lançado no Japão e em outros países asiáticos em 1988 e aprovado nos Estados Unidos em 1999 (BORGES, 2009). Suas indicações de uso aprovadas pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) são doença vascular periférica, redução dos sintomas da CI e prevenção da recorrência de acidente vascular encefálico (BLAIR et al., 2019).

Demonstrou ser de uso seguro em pacientes com infarto agudo do miocárdio, apesar de aumentar o índice cardíaco, o fluxo coronariano e a contratilidade (TABAGI; HARA, 2016; ROSA; BARONI; PORTAL, 2008).

A dose recomendada de CIL para tratar os sintomas de claudicação intermitente é de 100 mg, duas vezes ao dia. O tempo para a resposta terapêutica pode variar entre duas a quatro semanas, em alguns casos pode requerer doze semanas. Sua absorção é aumentada com alimentos ricos em gordura, podendo aumentar a concentração plasmática máxima em cerca de 90%. Portanto, para minimizar os riscos dose-dependentes, recomenda-se sua administração ao menos 30 minutos antes ou duas horas após as refeições.

Pode ocorrer elevação nas concentrações plasmáticas do CIL e seu principal metabólito ativo, potencializando seus efeitos terapêuticos e tóxicos, pelo efeito inibitório de alguns fármacos sobre o citocromo CYP3A4 (ex: eritromicina, cetoconazol, itraconazol, diltiazem, entre outros) e o CYP2C19 (ex: omeprazol). Quando tais associações forem inevitáveis, a dose de cilostazol deve ser reduzida pela metade, 50 mg, duas vezes ao dia (CEBRIM/CFF, 2004).

Além dos efeitos adversos mais frequentes, também são relatados: tontura, faringite, edema periférico, dor abdominal, flatulência, mialgia, vômito, angina, arritmia, dor torácica, equimose, erupção cutânea, prurido, astenia, gastrite, infarto do miocárdio, insuficiência cardíaca congestiva, hipotensão postural, insônia, ansiedade, sonhos anormais, dispneia, pneumonia, reações de hipersensibilidade, anemia, hemorragia, trombocitemia, disfunção renal, infecção urinária, rinite, dor lombar, dispepsia, náusea, vertigem e tosse aumentada (CEBRIM/CFF, 2004).

Estudos como o de Hiatt, Money e Brass (2008) demonstraram que em até 60% dos pacientes que fazem uso contínuo de CIL param com o tratamento por conta dos seus efeitos adversos. Provavelmente, devido a um mecanismo de ação semelhante aos agentes inotrópicos amrinona e milrinona, que demonstrou um efeito adverso na mortalidade em insuficiência cardíaca avançada. A *Food and Drug Administration* (FDA) estabeleceu um aviso na caixa para o CIL, proibindo seu uso em pacientes com insuficiência cardíaca congestiva (AGRAWAL; EBERHARDT, 2015).

Considerando as desvantagens que o fármaco apresenta, como o expressivo número de efeitos adversos, a solubilidade baixa e a posologia de 12/12h, existe o interesse de adotar estratégias farmacotécnicas capazes de otimizar as características físico-químicas, farmacocinéticas e farmacodinâmicas do CIL para aumentar a eficiência terapêutica. Nesse sentido, as formas farmacêuticas de liberação modificada apresentam-se como alternativas promissoras para assegurar a estabilidade, a biodisponibilidade e a resposta farmacológica adequada.

À fim de corrigir as limitações apresentadas pelo fármaco, foram aplicadas várias estratégias de formulação, com foco no fornecimento de padrões de liberação imediata ou controlada. Porém, a literatura ainda traz poucos trabalhos versando sobre a alteração dessa liberação.

Gawali e colaboradores (2009) buscaram uma estratégia interessante para a liberação rápida do CIL elaborando complexos de inclusão entre β -ciclodextrina por meio de diferentes métodos de obtenção. O complexo preparado por liofilização resultou em maior solubilidade aparente e melhor taxa de dissolução em comparação com o fármaco puro.

Em estudo semelhante, relatado por Patel e Rajput (2009), o complexo de inclusão de CIL-dimetil-beta-ciclodextrina (1:3) foi obtido pelo método de co-precipitação. O resultado foi um aumento significativo nas taxas de absorção e dissolução, sendo este de 2,10 vezes em comparação com a apresentação comercial de CIL (Pletoz[®] 50 mg) e aumento de 2,97 vezes em relação ao CIL puro.

A partir do método de anti-solvente, homogeneização a alta pressão e secagem por aspersão foi preparado uma nanosuspensão de CIL. Após administração oral a cães da raça beagle, foi constatado que a biodisponibilidade dos comprimidos preparados utilizando pó cristalino nanométrico seco por aspersão foi notadamente aumentada em comparação com a produzida por comprimidos nanométricos e comprimidos comerciais (MIAO et al., 2011).

Em 2014, foi desenvolvida uma formulação auto-nanoemulsificante, por desenho fatorial completo 2³, baseada em lípidos de CIL. Esta apresentou notável aumento na solubilidade em Tween[®] 80 de 8,00 para 9,82 mg.mL⁻¹, em relação ao CIL puro. Para a eficiência de dissolução, foi observado um aumento de 20,0%, em

45 minutos, para 83,3%, em aproximadamente 30 minutos, também em relação ao CIL puro (PUND; SHETE; JAGADALE, 2014).

Dispersões sólidas contendo CIL foram desenvolvidas através de granulação por fusão a quente e por aderência térmica. As mesmas apresentaram solubilidade relativa quase três vezes superior à dos comprimidos de Pletal® (cilostazol 50 mg) em composições contendo succinato de D- α -tocoferol, polietilenoglicol e vitamina E como excipientes, nos quais foi demonstrado um padrão de liberação controlada de fármacos (CHEN et al., 2014). Os sistemas de liberação de fármacos auto-nanoemulsificantes contendo CIL foram preparados por sonicação e demonstraram melhor dissolução *in vitro* de fármacos, bem como biodisponibilidade oral e parentérica *in vivo* (MAHMOUD; SHUKR; BENDAS, 2014). Também foi preparada uma dispersão sólida amorfa contendo CIL, povidona, óleo vegetal hidrogenado e carboximetilcelulose sódica por secagem por pulverização, que demonstrou liberação controlada e ausência de recristalização do fármaco. A dispersão sólida seca por pulverização contendo Eudragit® L100 e Eudragit® S100 também proporcionou uma liberação controlada de CIL (VERMA; RUDRARAJU, 2015). Ainda, nanopartículas sólidas contendo CIL, 2-hidroxiopropil- β -ciclodextrina, manitol, docusato sódico, goma arábica e metilcelulose, obtidas pelo processo de recristalização e moagem por alta energia, foram adicionadas a uma formulação oral em comprimidos, melhorando significativamente o déficit neurológico causado por isquemia em ratos (YOSHIOKA; ITO; NAGAI, 2017).

3.3 NANOPARTÍCULAS POLIMÉRICAS COMO SISTEMAS DE LIBERAÇÃO MODIFICADA DE FÁRMACOS

Na área da saúde, a nanotecnologia pode ser definida como o uso de materiais e sistemas em nanoescala, isto é, estruturas menores de 1.000 nanômetros de diâmetro que são projetadas para apresentar propriedades específicas (DIMER et al., 2013). A nanotecnologia farmacêutica é um campo em crescimento, com ampla aplicabilidade. Destina-se ao desenvolvimento, à

caracterização e à aplicação de sistemas terapêuticos, objetivando direcionar e/ou controlar a liberação de inúmeros fármacos (SAKATA et al., 2007).

O estudo acerca da área iniciou em 1959, quando o físico americano Richard Feynman afirmou que um dia seria possível manipular os átomos de forma a construir estruturas de dimensões nanométricas, desde que as leis naturais fossem mantidas. Em 1960 surgiu o desenvolvimento inicial da microencapsulação, técnica de transformação de líquidos (polímeros e outras substâncias) em pós com tamanhos de partículas micrométricos. Esta já apresentava um amplo potencial em diversas indústrias, como na área alimentícia e têxtil, pela proteção que confere às substâncias lábeis e voláteis (MARQUES; LOPES; SOUTO, 2009).

No entanto, foi apenas no final da década de 1960 que Peter Paul Speiser desenvolveu as primeiras nanopartículas. Seu objetivo inicial era a liberação sustentada a partir de nanocápsulas para permitir a administração intravenosa. Porém, Speiser centralizou o desenvolvimento de nanopartículas para fins de vacinação e não para a liberação de fármacos (KREUTER, 2007).

Estudos como o de Lu e colaboradores (2004) já mencionavam que a nanotecnologia seria um dos principais temas de pesquisa e inovação nos países industrializados, tendo como algumas de suas vantagens versatilidade, flexibilidade e adaptabilidade dos sistemas de liberação. O Brasil, no ano de 2012, já possuía 24 Redes de Cooperação em nanotecnologia nas diferentes áreas, 16 Institutos de Ciência e Tecnologia que desenvolvem nanotecnologia, 8 Laboratórios Nacionais, mais de 2.500 pesquisadores e 3.000 estudantes (DIMER et al., 2013).

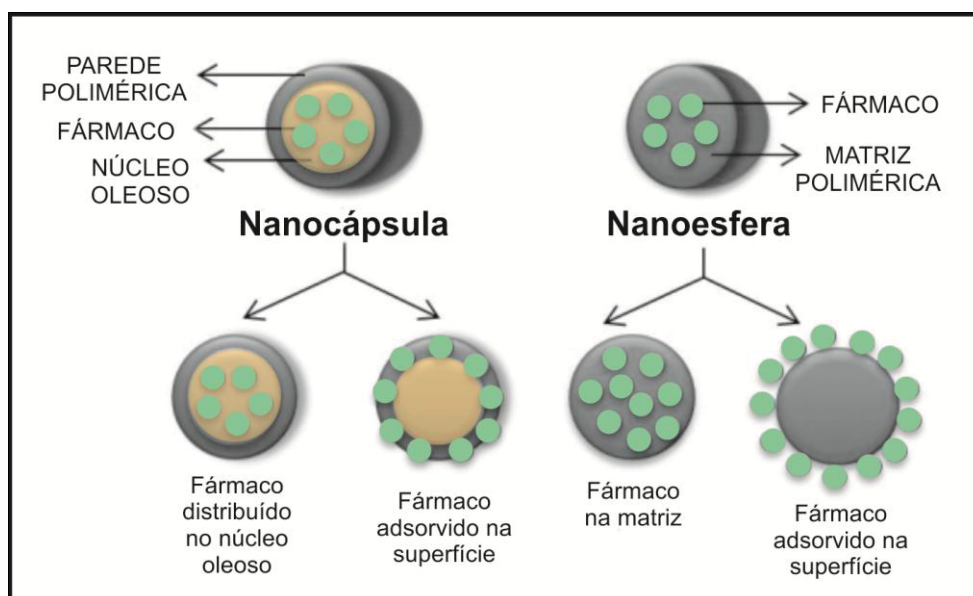
Na área farmacêutica, realiza-se a investigação de diferentes sistemas nanoestruturados como: nanopartículas poliméricas, nanopartículas lipídicas sólidas, lipossomas e nanoemulsões; sendo de interesse a aplicação desses sistemas como dispositivos carreadores de fármacos, proteínas, genes e vacinas. Entre as vantagens da utilização de nanossistemas destacam-se: o aumento da eficácia terapêutica; a liberação progressiva e controlada do fármaco; a proteção do fármaco no sistema terapêutico contra possíveis instabilidades no organismo; a diminuição expressiva da toxicidade; a diminuição da instabilidade e decomposição de fármacos sensíveis; a maior capacidade de ultrapassar barreiras biológicas; a possibilidade de direcionamento a alvos específicos; a diminuição da dose terapêutica, do número de

administrações e aumento da adesão à terapia (WAHLICH et al., 2019; GUERRERO-ARELLANO, 2017; TRAN; BENOÎT; VENIER-JULIENNE, 2011; DUNNE et al., 2003; TAO; DESAI, 2003; VERMA; GARG, 2001).

Dentre os sistemas citados, as nanopartículas, constituídas por polímeros biodegradáveis, vêm sendo alvo de grande interesse dos pesquisadores devido às suas potencialidades terapêuticas e à maior estabilidade nos fluidos biológicos e durante o armazenamento (SCHAFFAZICK et al., 2003).

Portanto, denominam-se nanopartículas poliméricas os sistemas carreadores de fármacos que apresentam diâmetro inferior a 1 μm , na forma de reservatório (cápsulas) ou matricial (matriz polimérica) nas quais o fármaco está encapsulado ou adsorvido na malha polimérica. Este termo inclui as nanocápsulas e as nanoesferas, as quais diferem entre si segundo a composição e organização estrutural (Figura 5).

FIGURA 5 – REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DE NANOCÁPSULAS E NANOESFERAS POLIMÉRICAS



FONTE: Adaptado de SCHAFFAZIK (2003).

As nanocápsulas são definidas como sistemas nanovesiculares caracterizados por um invólucro polimérico envolvendo um núcleo líquido lipofílico ou hidrofílico, geralmente essa cavidade central sendo composta por óleo (MORA-

HUERTAS; FESSI; ELAISSARI, 2010). O fármaco pode estar aprisionado ou dissolvido no núcleo líquido podendo ocorrer também a adsorção na superfície da partícula. Já as nanoesferas são maciças, destituídas de óleo em sua composição, onde o fármaco encontra-se geralmente disperso de maneira homogênea na partícula ou aderido somente à superfície. Comparando-as, as nanocápsulas tem se mostrado mais vantajosas devido à sua maior capacidade de carga do fármaco, melhor proteção contra a degradação e redução da liberação imediata (CHASSOT et al., 2015a).

Além de manter a estabilidade física do fármaco durante o armazenamento e nos fluídos biológicos, constam entre as vantagens apresentadas pelas nanopartículas: a ausência de problemas associados à esterilização, a versatilidade dos métodos de preparação, a produção em larga escala com linhas de produção e tecnologias disponíveis, um baixo custo de produção, a possibilidade de produção sem recurso a solventes orgânicos. Com esse sistema, há também a possibilidade de direcionamento do fármaco para células e tecidos específicos (macrófagos, células tumorais, cérebro etc.) (BRUXEL et al., 2012).

Sua morfologia é condicionada ao grau de cristalinidade do lipídeo utilizado, sendo que as misturas mais sólidas originam partículas mais esféricas. Já a organização nanoestrutural das matrizes depende não só da composição qualitativa e quantitativa das formulações, mas também da metodologia aplicada na sua preparação. Em regra, a escolha de um método de preparação é determinada pelas características de solubilidade da substância terapeuticamente ativa (VAUTHIER; BOUCHEMAL, 2009; QUINTANAR-GUERRERO et al., 1998).

A escolha da formulação ideal exige uma análise prévia de forma criteriosa de alguns fatores como, por exemplo, a natureza do fármaco, a estabilidade, a solubilidade, a toxicidade, a velocidade de liberação desejada e o alvo terapêutico, bem como, avaliar o método de síntese e da modificação estrutural necessária ao desenvolvimento de nanopartículas poliméricas carreadoras de fármaco (KUMARI; YADAV; YADAV, 2010).

Existem vários métodos descritos na literatura para a produção de sistemas constituídos por nanopartículas poliméricas, que podem ser classificados baseando-se na polimerização *in situ* de monômeros dispersos (cianoacrilato de alquila) ou na

precipitação de polímeros pré-formados, tais como poli(ácido lático), poli(ácido lático-co-ácido glicólico), poli(ϵ -caprolactona) (SOUTO; SEVERINO; SANTANA, 2012; PINTO REIS et al., 2006). Como pré-requisitos para a sua introdução no mercado têm-se a qualificação e validação do mesmo, sua transponibilidade de escala e vantagens de custo-efetividade. Independentemente do método de preparação utilizado, os produtos são obtidos como suspensões coloidais aquosas podendo durante o tempo de armazenamento, ocorrer a agregação das nanopartículas no meio resultando na formação de precipitados. A metodologia de polimerização citada não é amplamente utilizada, pois pode originar polímeros não biodegradáveis e, ainda, levar à toxicidade da formulação por meio da presença de moléculas residuais (PINTO REIS et al., 2006).

À fim de incorporar fármacos lipofílicos, são adaptados os métodos de preparação de nanoesferas a partir de polímeros pré-formados, como poliésteres alifáticos. Estes são de fácil controle e oferecem um maior rendimento. (SEVERINO et al., 2011). Podem ser divididos em emulsificação-evaporação do solvente, emulsificação-difusão do solvente, *salting-out*, nanoprecipitação, diálise e tecnologia do fluido supercrítico (NAGAVARMA et al., 2012).

Já em relação às nanocápsulas, dentre as diversas formas de sua obtenção destaca-se o método de deposição interfacial do polímero pré-formado, ou nanoprecipitação, estabelecido e descrito por Fessi e colaboradores (1989). As nanocápsulas formadas por este método apresentam tamanho médio entre 200 e 350 nm (GUTERRES; ALVES; POHLMANN, 2007), característica fundamental para o transporte de forma eficiente na corrente sanguínea (GUPTA; KOMPELLA, 2006). Além do método de preparação, os fatores que influenciam no tamanho das nanocápsulas poliméricas são: concentração e natureza química do polímero, do fármaco, do óleo e do tensoativo.

A nanoprecipitação é baseada na precipitação e formação cineticamente controlada de vesículas de tamanho coloidal, constituídas por uma fase oleosa revestida por uma camada polimérica em um ambiente externo aquoso. Portanto, há a dissolução do fármaco, polímero, óleo e tensoativo em um solvente orgânico, geralmente acetona, miscível em água constituindo a fase orgânica. A mesma é transferida, sob agitação vigorosa, em uma fase aquosa contendo um tensoativo

hidrofílico. A rápida difusão do solvente faz com que ocorra a diminuição da tensão interfacial, levando à formação de pequenas gotículas de solvente orgânico, devido ao aumento da área de superfície. Assim, observa-se o surgimento de uma suspensão leitosa e opalescente. Finalmente, o solvente orgânico, que deve ser de fácil remoção, é evaporado por pressão reduzida e a suspensão é concentrada através da evaporação de parte da água.

Considerando que quanto maior a afinidade do óleo com o fármaco, maior o percentual de encapsulação e menor a tendência de problemas de instabilidade dos sistemas (SCHAFFAZICK et al., 2003; GUTERRES; ALVES; POHLMANN, 2007; MORA-HUERTAS et al., 2010), é de extrema importância que o óleo, além de ser compatível com a substância ativa, não interaja com o polímero (GUTERRES et al., 2000).

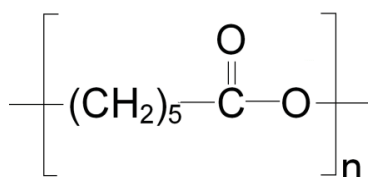
Devido à biocompatibilidade e solubilidade de grande escala de fármacos, os triglicerídeos dos ácidos cáprico/caprílico são os óleos mais empregados. Embora não frequentemente utilizados, existem boas alternativas de uso como os óleos de girassol, soja, benzoato de benzila, álcool benzílico, ácido oleico e oleato de etila (MORA-HUERTAS et al., 2010). Outros estudos vêm sendo realizados com o uso do óleo de oliva, semente de uva, rosa mosqueta e, mais recentemente, o óleo de coco (SANTOS et al., 2014).

Os polímeros devem ser biocompatíveis e biodegradáveis, de origem natural ou sintética. Os naturais, como albumina, gelatina, quitosana e colágeno, possuem a desvantagem relacionada ao grau de pureza, alto custo de obtenção (JAIN, 2000) e risco de contaminações (LEE; YUK, 2007). Como exemplos de origem sintética têm-se: poli(ácido láctico) (PLA), poli(ácido láctico-co-ácido glicólico)(PLGA), poli(ϵ -caprolactona) (PCL), polietilenoglicol (PEG), entre outros.

Polímeros biodegradáveis são aqueles que sofrem degradação química *in vivo*, por hidrólise ou ação enzimática, dando origem a produtos atóxicos e biocompatíveis capazes de ser metabolizados e excretados pelas vias fisiológicas normais. Essa degradação resulta da ação de microrganismos de ocorrência natural como bactérias, fungos e algas. Dentre eles, os que têm atraído mais atenção são os obtidos a partir de fontes renováveis, devido ao menor impacto ambiental causado com relação a sua origem (COIMBRA, 2011; SALTZMAN, 2001).

A PCL, cuja estrutura química está representada na Figura 6, é um poliéster alifático de cadeia linear, semicristalino, tenaz e flexível. É hidrofóbico, atóxico, possui cristalinidade em torno de 50% e boas propriedades mecânicas. Além disso, apresenta facilidade em formar blendas miscíveis com uma variedade de polímeros, sendo também solúvel em uma grande variedade de solventes orgânicos. Sua biocompatibilidade, biodegradabilidade e compatibilidade com uma ampla faixa de polímeros permite aplicações no campo farmacêutico, como, por exemplo, a alta permeabilidade a drogas que tem permitido testes em sistemas de liberação controlada de fármacos. Apesar das suas propriedades promissoras, possui uma baixa temperatura de fusão (59 – 64 °C), o que pode gerar problemas durante o processamento (MOCHANE et al., 2019; SOLOMÃO, 2011; MARIANI, 2010; WESSLER, 2006; AMASS et al., 1998).

FIGURA 6 – ESTRUTURA QUÍMICA DA POLI(ε-CAPROLACTONA)



Industrialmente, seu custo de produção não é muito elevado, podendo ser obtida por polimerização da ε-caprolactona (CL), pela reação de oxidação Bayer-Villing. A PCL tem sido sintetizada por polimerização em massa, solução ou suspensão utilizando um iniciador organometálico na presença ou ausência de um co-iniciador contendo hidrogênio ativo. Ainda, pode-se haver adição de grupos funcionais ao polímero para torná-lo mais adesivo, hidrofílico ou biocompatível, o que favorece as respostas celulares (SIQUEIRA et al., 2018).

A degradação microbiana e enzimática do polímero ocorre por hidrólise das ligações ésteres, sendo os produtos de degradação completamente aproveitados pelo metabolismo (PINTO, 2007; REZWAN et al., 2006). Entretanto, possui lenta degradação (de 2 a 3 anos) devido a sua elevada hidrofobicidade, o que dificulta a penetração da água nas cadeias poliméricas (NAIR; LAURECIN, 2007). E ainda, a

degradação da PCL em ambientes aeróbicos é mais rápida do que em ambientes anaeróbicos.

Devido a estes atributos favoráveis, a PCL é uma classe atrativa e útil de poliésteres biodegradáveis, sendo que, em relação a polímeros como PLA e PLGA, possui menor custo de produção e promove a liberação de fármacos por um período mais prolongado (KAMALY et al., 2016; AL HAUSHEY et al., 2007).

Observou-se que fármacos em sistemas nanoparticulados podem sofrer o fenômeno da opsonização, caracterizado quando estes fármacos encontram uma barreira fisiológica, resultando na rápida ligação das proteínas plasmáticas à superfície das nanoestruturas administradas. O mecanismo de defesa ocorre pelo reconhecimento das estruturas consideradas estranhas ao organismo para posterior fagocitose, por meio da captação dos carreadores por células do sistema fagocitário mononuclear levando a uma rápida depuração das nanopartículas da circulação sanguínea (GREF et al., 1994). Com o intuito de diminuir, retardar ou até mesmo eliminar a adsorção às proteínas plasmáticas, muitas técnicas têm sido desenvolvidas para modificar a superfície de nanopartículas, assim, pode-se prolongar o tempo de circulação das mesmas no organismo (OWENS; PEPPAS, 2006; MOGHIMI; SZEBENI, 2003; MOSQUEIRA et al., 2001; SOPPIMATH et al., 2001; GREF et al., 1994).

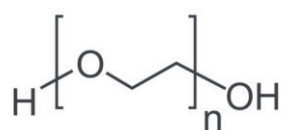
A modificação de superfície das nanopartículas tem sido realizada principalmente por: (I) revestimento da superfície com polímeros hidrofílicos/tensoativos; e (II) desenvolvimento de copolímeros biodegradáveis com segmentos hidrofílicos, que podem reduzir as interações eletrostáticas e hidrofóbicas, pelas quais as opsoninas se adsorvem a superfície das partículas (MOSQUEIRA et al., 2001; GREF et al., 2000).

A presença de uma cobertura feita com cadeias longas de polímeros hidrofílicos promove estabilização estérica das nanopartículas, por meio de uma camada protetora que é capaz de repelir as opsoninas do plasma por meio de forças repulsivas evitando a opsonização e na sequência, a fagocitose (KUMARI et al., 2010; PINTO REIS et al., 2006).

Para promover essa modificação, o polietilenoglicol é o polímero de estabilização estérica mais comumente utilizado. Sua fórmula estrutural pode ser

observada na Figura 7. O modo de fixação desse polímero sobre a superfície das partículas pode, como mencionado, envolver a adsorção física ou a ligação covalente com o polímero formador da matriz ou da parede polimérica (HANS; LOWMAN, 2002).

FIGURA 7 – FÓRMULA ESTRUTURAL DO POLIETILENOGLICOL



O PEG é produzido pelo método de polimerização catalítica heterogênea, a partir de monômeros de óxido de etileno. É um polímero estável, atóxico, hidrofílico, biodegradável e biocompatível. Possui cadeias flexíveis e neutralidade elétrica, sendo que tais características auxiliam na prevenção de interações com componentes biológicos, como as células do sistema fagocitário mononuclear (GREF et al., 1995; STORM et al., 1995). Além de evitar esse reconhecimento pelos anticorpos do organismo, sua presença na superfície das nanopartículas prolonga o tempo desses sistemas na circulação sistêmica podendo otimizar as respostas terapêuticas (SUK et al., 2016; HANS; LOWMAN, 2002; MOSQUEIRA et al., 2001).

O PEG tem atraído interesse em aplicações biomédicas em áreas como liberação controlada de biomoléculas e de medicamentos podendo ser utilizado em formulações parenterais, tópicas, oftálmicas e orais (VELOSO et al., 2017). Quando utilizado em formulações líquidas, estas se apresentam como soluções límpidas, transparentes ou ligeiramente amareladas; enquanto em formulações sólidas sua presença confere característica de sólidos brancos ou translúcidos, de consistência pastosa e cerosa.

Os nanomateriais modificados com PEG e administrados na corrente sanguínea podem suprimir a adsorção por opsonina e a depuração pelo sistema fagocitário mononuclear, prolongando o tempo de circulação e influenciando a

farmacocinética e a biodistribuição dos sistemas de administração de fármacos (SALMASO; CALICETI, 2013), como já mencionado anteriormente.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 EQUIPAMENTOS

- Agitador magnético com aquecimento (SOLAB, modelo SL-91, Piracicaba, Brasil);
- Analisador térmico simultâneo STA 6000 (Perkin Elmer, Waltham, MA, EUA);
- Balança analítica (CELTAC, modelo FA2104N, São Paulo, Brasil);
- Balança termogravimétrica (SHIMADZU, modelo TGA-50, Quioto, Japão);
- Bomba de vácuo (FISATOM, modelo 830, São Paulo, Brasil);
- Câmera fotográfica (Olympus DP72, Tóquio, Japão);
- Cromatógrafo líquido de alta eficiência (MERCK-HITACHI, modelo Lachrom D-7000, Tóquio, Japão);
- Destilador de água (FANEM LTDA, modelo 724/2-A, São Paulo, Brasil);
- Difrátômetro de raios X (SHIMADZU XRD - 6000, Kyoto, Japão);
- Espectrômetro infravermelho com transformada de Fourier (SHIMADZU, modelo IR Prestige-21, Quioto, Japão);
- Espectrômetro de auto-correlação a laser (MALVERN INSTRUMENTS, modelo Zetasizer Nanoseries ZS90, Malvern, Reino Unido);
- Estufa a vácuo (TECNAL, modelo TE 395, Piracicaba, Brasil);
- Evaporador rotativo (FISATOM, modelo 801, São Paulo, Brasil);
- Leitor de microplacas (BIO-TEK INSTRUMENTS, modelo Synergy H1, Winooski, VT, EUA);
- Metalizador (SHIMADZU, modelo IC-50 Ion Coater, Quioto, Japão);
- Microscópio eletrônico de varredura (SHIMADZU, modelo SSX-550, Quioto, Japão);
- Microscópio eletrônico de transmissão (JEOL, modelo JEM 1200 EX-II, Tóquio, Japão);
- Microscópio óptico (OLYMPUS, modelo BX41, Tóquio, Japão);
- Sistema de ultrapurificação de água (Milli-Q®, MILLIPORE, Bedford, EUA);

- Potenciômetro digital de bancada (HANNA INSTRUMENTS, modelo HI 221, São Paulo, Brasil).

4.2 REAGENTES E SOLVENTES

4.2.1 Fármaco

- Cilostazol (CIL) - $C_{20}H_{27}N_5O_2$, 369,46 g.mol⁻¹ (99,91% de pureza, IPCA Laboratories Limited, Mumbai, Índia).

4.2.2 Polímeros

- Poli(ϵ -caprolactona) (PCL, M_w 10000-14000 g.mol⁻¹, SIGMA-ALDRICH, St. Louis, MO, EUA);
- Polietilenoglicol (PEG, M_w 5400-6600 g.mol⁻¹, CROMATO PRODUTOS QUÍMICOS, Diadema, Brasil).

4.2.3 Água Purificada

Para a elaboração das nanosuspensões, determinação do tamanho de partícula e potencial zeta foi empregada água ultrapura, obtida por meio do Milli-Q® (MILLIPORE, Bedford, EUA).

4.2.4 Solventes e demais reagentes

- Acetona P.A (VETEC, Rio de Janeiro, Brasil);
- Acetonitrila grau HPLC (SIGMA-ALDRICH, St. Louis, MO, EUA);
- Brometo de potássio grau espectroscópico (KBr) (SIGMA-ALDRICH, St. Louis, EUA);
- Colágeno tipo I (Sigma Chemical Company, Missouri, EUA);
- Metanol grau HPLC (EMD CHEMICALS INC., Darmstadt, Alemanha);

- Monooleato de sorbitano etoxilado (polissorbato 80, Tween® 80, DELAWARE, Porto Alegre, Brasil);
- Monooleato de sorbitano (Span 80®, OXITENO, Mauá, São Paulo);
- Triglicerídeos dos ácidos cáprico /caprílico (FOCUS QUÍMICA, São Paulo, Brasil).

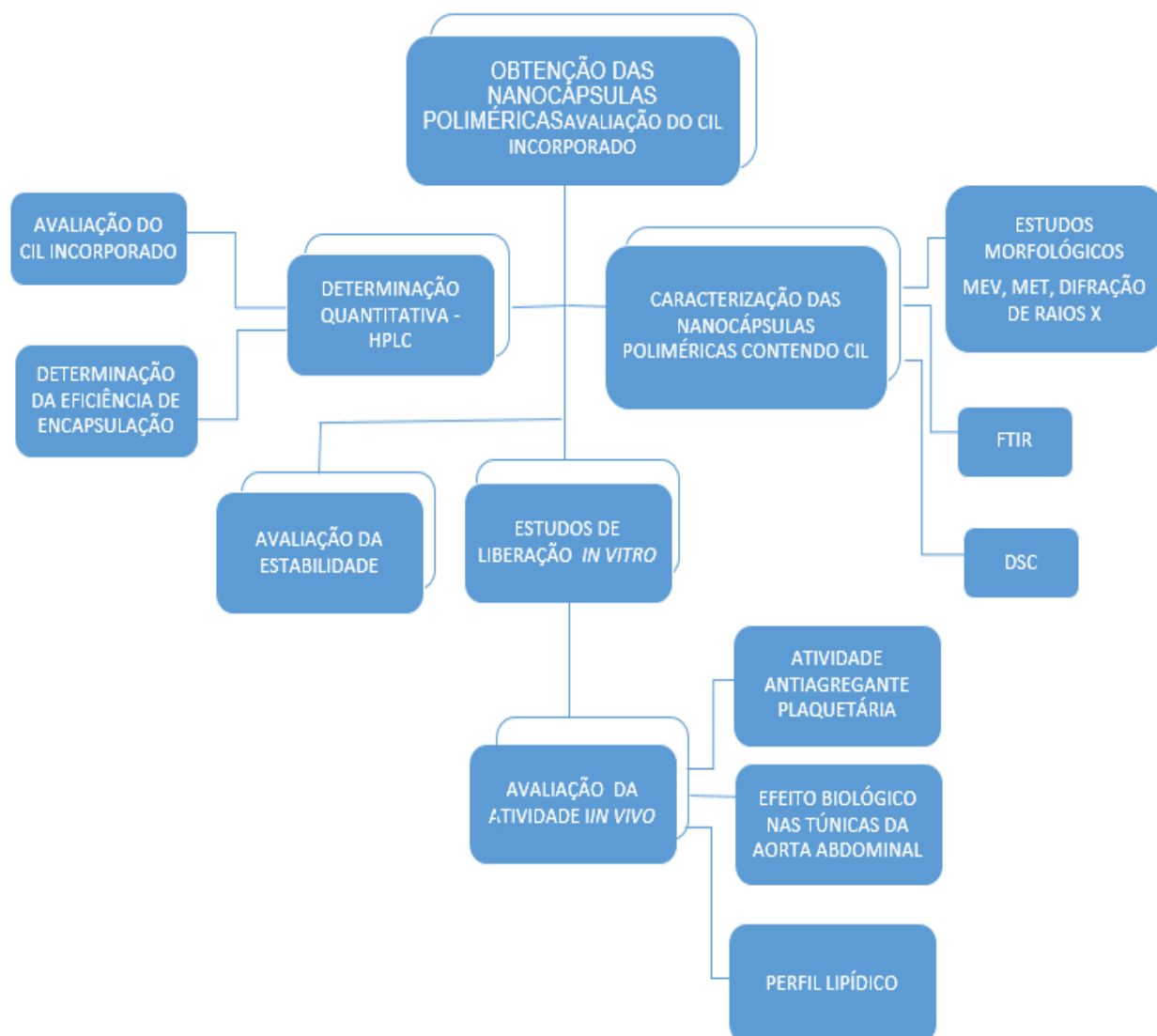
4.2.5 Outros materiais

- Membrana de diálise (Sprectra/Por® molecular porous membrane tubing, MWCO 10000, Spectrum Laboratories, Inc., Rancho Dominguez, CA, EUA).

4.3 DESENHO EXPERIMENTAL

A pesquisa teve início com a obtenção de nanocápsulas poliméricas contendo CIL. Os sistemas poliméricos foram caracterizados por meio de estudos morfológicos, espectroscópicos e térmicos. O mecanismo de liberação *in vitro* do cilostazol, em condições miméticas ao trato intestinal, foi estudado a partir do ensaio de dissolução e os perfis de liberação foram avaliados por modelos dependentes e independentes. A avaliação biológica dos sistemas em estudo e do fármaco puro foram conduzidos empregando modelos *in vivo* da atividade antiagregante plaquetária, do efeito biológico nas túnicas da aorta abdominal e da avaliação do perfil lipídico. As etapas descritas estão esquematizadas no fluxograma da Figura 8.

FIGURA 8 – FLUXOGRAMA DAS ETAPAS DA PESQUISA



FONTE: A autora (2019).

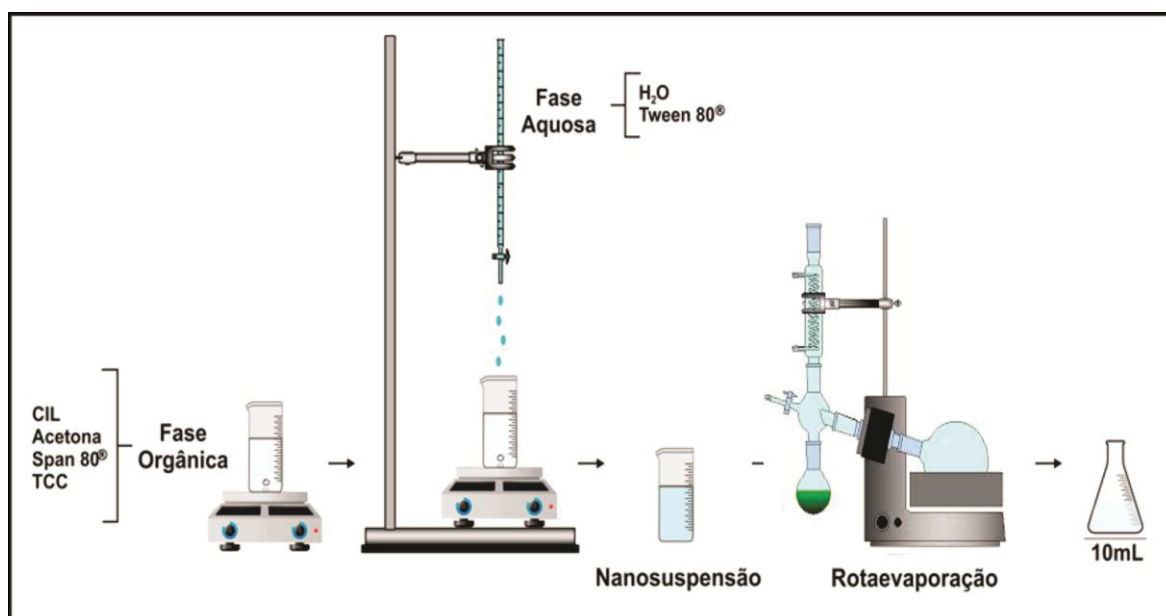
4.4 PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

4.4.1 Obtenção das nanocápsulas poliméricas de CIL

As nanocápsulas contendo CIL foram obtidas utilizando blendas de PCL-PEG. Estas formulações foram preparadas pelo método de deposição

interfacial do polímero pré-formado (Figura 9) desenvolvido e classicamente descrito por Fessi et al. (1989). Adicionou-se uma solução coloidal de PCL-PEG (100 mg, proporção 3:1), CIL (30, 60 e 120 mg), Triglicerídeos dos ácidos cáprico/caprílico (TCC) (300 mg) e Span 80® (77 mg) em acetona (27 mL), constituindo a fase orgânica, a qual foi gotejada lentamente na fase aquosa (53 mL) contendo Tween 80® (77 mg) sob temperatura controlada de 40 °C e agitação magnética vigorosa, tendo sido mantidas assim por mais 10 minutos após o término do gotejamento.

FIGURA 9 – REPRESENTAÇÃO DO MÉTODO DE OBTENÇÃO DAS SUSPENSÕES DE NANOCÁPSULAS POLIMÉRICAS



FONTE: A autora (2019).

Após 60 minutos, a acetona foi removida e a fase aquosa foi concentrada sob pressão reduzida. O volume final foi ajustado para 10 mL e uma concentração de CIL de 3 mg.mL⁻¹ (NC3), 6 mg.mL⁻¹ (NC6) e 12 mg.mL⁻¹ (NC12). Para fins comparativos, preparou-se uma formulação sem fármaco (NC0) como controle negativo. Todas as suspensões de nanocápsulas poliméricas foram obtidas em triplicata a partir de três lotes diferentes e suas composições estão indicadas na Tabela 1.

As misturas físicas entre os polímeros utilizados e o CIL foram preparadas para um estudo de caracterização comparativo com as formulações de nanocápsulas desenvolvidas. Essas misturas foram constituídas na proporção, em massa, de 1:1:1 (CIL:PCL:PEG).

TABELA 1 – COMPOSIÇÃO DAS FORMULAÇÕES DAS SUSPENSÕES DE NANOCÁPSULAS POLIMÉRICAS

Formulação	Fase Orgânica						Fase Aquosa	
	CIL (mg)	PCL (mg)	PEG (mg)	TCC (mg)	Acetona (mL)	Span 80® (mg)	Tween 80® (mg)	Água Purificada (mL)
NC0	–	75	25	300	27	77	77	53
NC3	30	75	25	300	27	77	77	53
NC6	60	75	25	300	27	77	77	53
NC12	120	75	25	300	27	77	77	53

FONTE: A autora (2019).

4.4.2 Caracterização das suspensões de nanocápsulas poliméricas

4.4.2.1 Caracterização físico-química

Os valores de pH das nanosuspensões foram determinados por imersão do eletrodo diretamente nas suspensões coloidais após a preparação, utilizando um potenciômetro previamente calibrado com soluções tampão pH 4,0 e 7,0 (pH Meter modelo HI 221, Hanna Instruments, São Paulo, Brasil). As medidas foram realizadas à temperatura ambiente (25 ± 2 °C), em triplicata.

O tamanho médio de partícula e o índice de polidispersão ($n = 3$), após uma diluição de uma alíquota de cada amostra em água ultrapurificada (1:500, v/v), foi medido por espectroscopia de correlação de fótons (Zetasizer Nanoseries, Malvern Instruments, Malvern, RU). No mesmo equipamento e utilizando a mesma preparação de amostra, o potencial zeta ($n = 3$) foi determinado pela técnica de mobilidade eletroforética.

4.4.2.2 Teor de fármaco e eficiência de encapsulação

Para a determinação do teor de fármaco, as nanosuspensões foram submetidas a uma ultrafiltração/centrifugação combinada utilizando dispositivos de centrifugação (Amicon® 10.000 Mw, Millipore, Bedford, MA, EUA) a 2200 g durante 30 minutos, em triplicata. O CIL livre foi determinado no ultrafiltrado utilizando um método de HPLC previamente validado (GOMES et al., 2015).

A concentração de CIL foi analisada utilizando uma coluna analítica de fase reversa GL Sciences Inertsil® ODS3 (Torrance, CA, EUA) (150 mm × 4,6 mm, 5 µm) e uma pré-coluna GL Sciences Inertsil® ODS3 (10 mm × 4 Mm, 5 µm) à temperatura ambiente (20 ± 2 °C) utilizando detecção UV a 254 nm. A eluição foi realizada de modo isocrático, tendo a fase móvel constituída de acetonitrila e água (47:53, v/v) e vazão de 1,0 mL.min⁻¹. O tempo de análise foi de 10 minutos.

A eficiência de encapsulação (EE) foi calculada usando a equação (1) abaixo:

$$EE\% = \frac{CIL_{INICIAL} - CIL_{LIVRE}}{CIL_{INICIAL}} \times 100 \quad (1)$$

Em que:

CIL inicial = concentração do fármaco adicionada inicialmente à formulação;

CIL livre = concentração de CIL não incorporado às nanocápsulas, quantificadas por HPLC.

Nota: Os valores de EE% foram expressos como média ± DP.

4.4.2.3 Microscopia eletrônica de varredura (MEV) e de transmissão (MET)

As formulações liofilizadas foram fixadas em esferas de alumínio, pulverizadas com ouro (IC-50 Ion Coater, Shimadzu, Kyoto, Japão) e analisadas utilizando microscopia eletrônica de varredura (SEM, SSX-550 Superscan, Shimadzu, Kyoto, Japão) empregando voltagens de aceleração de 10 ou 15 kV com diferentes ampliações, obtendo-se assim as fotomicrografias por MEV.

Para se obter as imagens por MET, uma alíquota de 5 μL da nanosuspensão foi inicialmente colocada em uma tela de parlódio e deixada para secar à temperatura ambiente ($25 \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$) por aproximadamente 10 minutos. A morfologia das nanocápsulas poliméricas foi examinada utilizando um microscópio eletrônico de transmissão (JEM 1200 EX-II, JEOL, Tóquio, Japão).

4.4.2.4 Análise por difração de raios X

As nanossuspensões foram depositadas sobre lamínula de vidro e secas em temperatura ambiente ($25 \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$). O CIL, os polímeros puros e as misturas físicas não receberam tratamento prévio à análise. Na sequência, as amostras foram examinadas em difratômetro de raios X (SHIMADZU, modelo XRD 6000, Kyoto, Japão), scan de $2^{\circ}.\text{min}^{-1}$ e 2θ de 5 a 50° , radiação $K\alpha$ de cobre ($\lambda = 1.5418\text{ \AA}$), corrente de 40 mA e voltagem 40 kV, para a observação de possíveis picos indicativos de cristalinidade.

4.4.2.5 Avaliação por espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (FTIR)

As nanossuspensões contendo CIL, após serem liofilizadas, foram analisadas por espectroscopia na região do infravermelho, em pastilha com KBr, empregando 4 mg de cada amostra e 196 mg de KBr grau espectroscópico (2% *m/m*), no equipamento IR Prestige-21 (SHIMADZU), 32 scans. min^{-1} , resolução de 4 cm^{-1} . Os espectros obtidos por infravermelho com transformada de Fourier das amostras preparadas foram avaliados frente aos espectros do fármaco puro, dos polímeros de partida e das respectivas misturas físicas.

4.4.2.6 Calorimetria exploratória diferencial (DSC)

As curvas de DSC de CIL, PCL, PEG, mistura física de CIL/PCL/PEG (1:1:1) e das nanocápsulas poliméricas liofilizadas foram realizadas num Analisador Térmico Simultâneo STA 6000 (Perkin Elmer, Waltham, MA, EUA) usando cadinho de alumina com $4,0 \pm 0,1$ mg de cada amostra em atmosfera dinâmica de N₂ (50 mL.min⁻¹).

A faixa de temperatura foi de 20 – 300 °C com taxa de aquecimento de 10 °C.min⁻¹. A célula DSC foi previamente calibrada com índio (P.F. = 156,60 °C, $\Delta H_{\text{fusão}} = 28,54 \text{ J.g}^{-1}$).

4.4.3 Estudo da estabilidade

As nanossuspensões foram armazenadas à temperatura ambiente (25 ± 2 °C) e protegidas da luz em frascos âmbar. Essas formulações foram avaliadas após 60 dias para verificar pH, tamanho de partícula, índice de polidispersão e potencial zeta, tendo seus resultados comparados aos valores encontrados logo após a preparação.

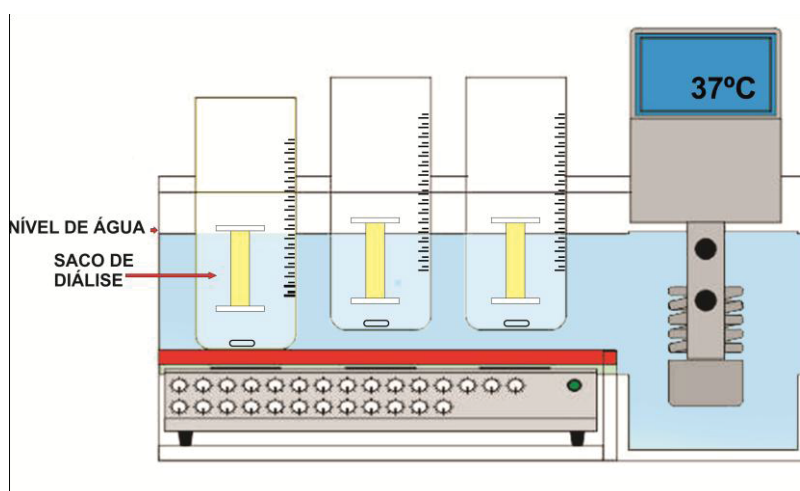
As análises estatísticas foram realizadas pelo teste *t-student*. Os resultados foram expressos como média $\pm$ desvio padrão relativo (DPR). Um valor de $p < 0,05$ foi considerado como indicativo de significância. Todos os testes foram realizados usando o programa *Graph Pad Prism* versão 5.00 (San Diego, CA, EUA).

4.4.4 Estudo da liberação do fármaco *in vitro*

Os perfis de dissolução do CIL a partir das nanossuspensões foram obtidos usando a técnica de difusão através de membrana de diálise. Cada amostra (solução a 30% de etanol – água de CIL, NC3, NC6 e NC12) foi colocada num saco de diálise (Spectra/Por[®] Molecular Porous Membrane Tubing, MWCO 10.000, Spectrum Laboratories, Inc., Rancho Dominguez, CA, EUA). Este sistema foi então imerso em 500 mL de água com 30% de etanol a 37 °C e sob agitação magnética

contínua de 50 rpm, como esquematizado na Figura 10. Alíquotas de 5 mL foram retiradas em intervalos de tempo predeterminados e substituídas pelo mesmo volume do meio de dissolução. A quantidade de CIL liberada foi determinada por HPLC (GOMES et al., 2015). O procedimento foi realizado em triplicata.

FIGURA 10 – DESENHO ESQUEMÁTICO DA CUBA DE DISSOLUÇÃO



FONTE: A autora (2019).

4.4.4.1 Avaliação dos perfis de liberação

Os perfis de liberação *in vitro* foram obtidos plotando-se a porcentagem de CIL liberada em função do tempo. Posteriormente, esses resultados foram analisados por meio do teste da razão (eficiência de dissolução) e da lei das potências.

A eficiência de dissolução (ED) do CIL foi determinada e comparada com a eficiência de dissolução das diferentes formulações das nanosuspensões. A ED é uma avaliação modelo-independente, definida pela área sob a curva de dissolução e expressa como a porcentagem da área de um retângulo que descreve 100% da dissolução, em um determinado período de tempo (Equação 2).

$$ED = \frac{\int_0^t y \cdot dt}{y_{100} \cdot t} \times 100\% \quad (2)$$

Em que:

y = porcentagem de fármaco dissolvido no tempo t .

A avaliação matemática dos perfis de liberação *in vitro* foi realizada pelo ajuste dos dados experimentais ao modelo semi-empírico de Korsmeyer-Peppas (Equação 3) ou lei das potências, permitindo a obtenção dos parâmetros a e n , com a finalidade de ampliar a informação sobre o mecanismo de liberação do fármaco.

$$ft = at^n \quad (3)$$

Em que:

ft = fração do fármaco dissolvido no tempo t ;

a = constante que incorpora as características estruturais e geométricas da forma farmacêutica;

n = expoente de liberação que é indicativo do mecanismo de liberação;

Para sistemas esféricos, a lei das potências apresenta duas interpretações físico-químicas distintas. Quando n assume um valor inferior a 0,43, isso indica que a liberação da substância é controlada por difusão (mecanismo de transporte Fickiano). Quando n é superior a 0,85, indica que a liberação é controlada pelo inchamento (ou erosão) do polímero (transporte caso II ou mecanismo de transporte não-Fickiano). Valores de n entre 0,43 e 0,85 estão relacionados com a sobreposição de ambos os fenômenos, denominado de transporte anômalo (SIEPMANN; PEPPAS, 2001).

Os métodos cinéticos destinados à avaliação dos perfis de liberação foram aplicados com o auxílio do software MicroMath Scientist® (versão 2.01, Salt Lake City, UT, EUA).

4.4.5 Ensaios farmacológicos *in vivo*

4.4.5.1 Animais e condições de manutenção

Foram utilizados ratos Wistar (machos) de 60 dias de idade, com cerca de 200 g cada, fornecidos pelo Biotério Central da Universidade Estadual de Ponta Grossa (UEPG). Os animais foram mantidos em ambiente com temperatura de 22 ± 2 °C e ciclo de claro/escuro (12/12 h) controlados automaticamente. Água e ração comercial (Nuvital®) foram fornecidos *ad libitum*. O experimento foi aprovado pelo Comitê de Ética da Universidade Estadual de Ponta Grossa, segundo protocolo número 15981/2013.

4.4.5.2 Protocolo experimental

Trinta e dois ratos foram divididos de forma aleatória em quatro grupos contendo 8 animais cada. O grupo 1 recebeu as formulações NC12 contendo CIL (quantidade equivalente a 60 mg de CIL.kg⁻¹, oralmente). O grupo 2 recebeu as nanocápsulas sem o fármaco NC0 (volume equivalente ao grupo 1, oralmente). O grupo 3 recebeu o CIL (60 mg.kg⁻¹, oralmente) suspenso em propilenoglicol e água (70:30, v/v) como veículo e o grupo 4 recebeu o mesmo veículo, propilenoglicol e água (volume equivalente ao grupo 3, por via oral).

As doses foram administradas durante 14 dias consecutivos, por gavagem gástrica uma vez ao dia (24/24 h) para os grupos 1 e 2 e duas vezes ao dia (12/12 h) para os grupos 3 e 4. Vinte e quatro horas após a última dose administrada para todos os grupos, os ratos passaram por anestesia com cetamina e xilazina (55 e 8 mg.kg⁻¹, respectivamente, via intraperitoneal) sendo na sequência submetidos a laparotomia para a coleta de sangue via punção cardíaca (ventrículo direito). Ao final do experimento os animais foram sacrificados por sobre dosagem anestésica.

4.4.5.3 Preparação do plasma rico em plaquetas (PRP) e do plasma pobre em plaquetas (PPP)

Após serem submetidos a laparotomia via punção cardíaca, foram coletados um volume de aproximadamente 6 mL de sangue de cada animal e transferidos para tubos plásticos contendo citrato de sódio (na proporção de 9:1, sangue/anticoagulante), os quais foram processados para obtenção dos plasmas rico e pobre em plaquetas. Para se obter o PRP o sangue foi centrifugado à temperatura ambiente por 15 min a 100 x g. O plasma foi cuidadosamente removido e centrifugado a 900 x g por 10 minutos para obtenção do pellet de plaquetas, o qual foi ressuspenso em quantidade suficiente de plasma fresco autólogo. O sobrenadante resultante da última centrifugação constituiu o PPP (BORN; CROSS, 1963).

4.4.5.4 Avaliação da agregação plaquetária

A contagem das plaquetas foi realizada em contador hematológico HEMOGRAM® (Hemacounter 60), previamente calibrado para a diferenciação celular dos ratos utilizados neste estudo. Para tal calibração, a contagem manual de plaquetas foi realizada em câmara de Neubauer (BRECHER; CRONKITE, 1950).

O ensaio de agregação plaquetária foi realizado numa placa de 96 poços e a leitura da densidade ótica foi obtida num leitor de microplacas multidetector Synergy H1 (BIOTEC INSTRUMENTS), adotando-se o comprimento de onda de 650 nm. Inicialmente, foi adicionado a cada poço um agonista (colágeno tipo I, 4 $\mu\text{g}.\text{mL}^{-1}$), o qual foi utilizado para induzir a agregação plaquetária. Este foi previamente macerado em ácido acético 10 mM, seguido de centrifugação (3 min, 500 x g) e o sobrenadante foi armazenado em geladeira até o momento do teste (GONÇALVES, 2012).

Em seguida, para um volume final de 150 μL , foi adicionado o plasma contendo plaquetas a uma concentração de 200×10^6 plaquetas/poço. As leituras da densidade ótica ocorreram no tempo zero e após 15 min para induzir a agregação plaquetária. A placa foi agitada durante 10 segundos antes de iniciar cada ensaio

com amplitude de 2 mm (174 rpm) e 3 segundos antes de cada leitura com amplitude de 1 mm (114 rpm) a 37 °C (KRAUSE et al., 2001; FRATANTONI, POINDEXTER, 1990).

O resultado inicial da leitura (densidade ótica) representa as plaquetas que estão em suspensão (não ativadas). Quando há a ativação plaquetária induzida pelo colágeno, o valor da densidade ótica diminui, pois a agregação das plaquetas permite uma maior passagem de luz incidente. Portanto, o valor da diferença entre as duas leituras representa a intensidade da agregação plaquetária (ΔO = densidade ótica inicial – densidade ótica final).

A análise estatística foi realizada utilizando o software GraphPad Prism (versão 5.00, San Diego, CA, EUA). Os resultados foram expressos como média $\pm$ erro padrão da média. As comparações entre os grupos foram testadas por ANOVA unidirecional. Para o ensaio de agregação plaquetária *in vivo*, utilizou-se o teste *post hoc* Bonferroni, sendo o nível de significância crítico estabelecido em $\alpha = 5\%$ ($p < 0,05$).

4.4.5.5 Avaliação morfológica das túnica da aorta abdominal e do perfil lipídico

Foram utilizados 28 ratos Wistar machos para este ensaio, nas mesmas condições de manutenção dos animais descritas anteriormente.

Os animais foram divididos em quatro grupos experimentais, de modo a obter grupos homogêneos quanto à massa corporal e de acordo com as formulações administradas. O Grupo 1 recebeu nanocápsulas de PCL-PEG contendo cilostazol (NC12), na dose de 50 mg/kg/dia; o Grupo 2 recebeu nanocápsulas de PCL-PEG controle (NC0); o Grupo 3 recebeu solução de propilenoglicol (veículo) e água (70/30 v/v) e o Grupo 4 uma suspensão de cilostazol (cilostazol puro) em propilenoglicol e água (70/30, v/v), na dose de 50 mg/kg/dia. As doses foram administradas por gavagem a cada 12 horas por um período de 30 dias.

Após 24 horas do recebimento da última dose, foi realizada a eutanásia dos animais com sobredose anestésica com cetamina e xilazina (75 e 15 mg/kg via

intraperitoneal, respectivamente). Em seguida, foram submetidos à cirurgia para coleta da artéria aorta abdominal por meio de laparotomia longitudinal mediana, seguida de divulsão e secção por planos. A artéria aorta foi localizada, separada dos tecidos adjacentes e retirada. Em seguida foi armazenada em frascos contendo formaldeído a 10% (v/v).

Além disso, foram coletados 5 mL de sangue por meio da punção do ventrículo esquerdo. A seguir, o plasma foi armazenado em tubos sem anticoagulante e imediatamente submetido à análise do perfil lipídico (triglicerídeos, colesterol total e frações LDL-c e HDL-c).

Para o preparo das lâminas, as peças foram lavadas, desidratadas em concentrações crescentes de álcool, incluídas em parafina para a obtenção de secções seriadas de 5 a 7 μ m. As lâminas foram coradas pelo método de hematoxilina-eosina. A análise histológica das lâminas foi feita por um examinador cego, utilizando-se um microscópio óptico (Olympus BX 41, Tóquio, Japão) acoplado a uma câmera fotográfica (Olympus DP72, Tóquio, Japão), sob magnificação de 400 vezes. Em cada lâmina foram analisadas 5 regiões distintas, abrangendo as três túnicas arteriais, com ênfase na túnica média. As imagens foram digitalizadas por meio do programa CellSens Standard®, obtendo-se as medidas em pixels, que foram convertidas para micrômetros.

Por meio do programa ImageJ® Software (NIH, Bethesda, MD, EUA) foi realizada a análise quantitativa da presença de resposta inflamatória por meio da visualização de núcleos celulares na túnica média da artéria aorta, bem como uma análise quantitativa para determinação da espessura da túnica média, nas quais as medidas de aferição da espessura foram realizadas em 10 pontos, no sentido perpendicular às fibras musculares, com intervalo de 20 micrometros entre elas. A aferição da celularidade foi realizada em uma área da túnica média equivalente à 800 micrômetros, em cada uma das lâminas.

Para análise deste estudo, foi usado o programa SPSS®, versão 23.0 (IBM Corp., Armonk, NY, EUA). Após a avaliação da normalidade dos dados, foi utilizado o teste ANOVA unidirecional. Para análises comparativas das variáveis foi feito o teste de comparação múltipla de Tukey. Foi definido como estatisticamente

significativo um $p < 0,05$. As variáveis foram apresentadas por média e desvio padrão.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA

Após a preparação, as formulações apresentaram macroscopicamente o aspecto leitoso e a típica reflexão azulada opalescente resultante do movimento browniano das estruturas coloidais (efeito Tyndall) em acordo com resultados previamente relatado em outros sistemas nanoparticulados (MORA-HUERTAS; FESSI; ELAISSARI, 2010; SCHAFFAZICK et al., 2003). Os resultados da caracterização físico-química das formulações podem ser observados na Tabela 2.

TABELA 2 – CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DAS NANOSUSPENSÕES

Formulação	pH	Tamanho de partícula (nm)	Índice de polidispersão	Potencial zeta (mV)
NC0	6,3 ± 0,11	137 ± 1,60	0,17 ± 0,05	– 36,9 ± 2,20
NC3	6,1 ± 0,10	134 ± 3,70	0,22 ± 0,01	– 36,3 ± 1,60
NC6	6,1 ± 0,12	133 ± 4,90	0,17 ± 0,01	– 36,4 ± 2,00
NC12	6,3 ± 0,10	130 ± 5,80	0,18 ± 0,03	– 37,6 ± 1,50

NOTA: Média (n = 3) ± desvio padrão.

FONTE: A autora (2019).

A concentração do fármaco variou de 0 a 12 mg.mL⁻¹ e não houve interferência nos parâmetros físico-químicos avaliados. As nanosuspensões apresentaram valores de pH entre 6,1 e 6,3, devido à presença de PCL na sua composição, proporcionando um carácter ácido devido a presença do grupo éster na cadeia polimérica (DURÁN; MATTOSO; MORAIS, 2006).

Em relação ao diâmetro médio, foram registrados dimensionamentos nanométricos adequados (inferiores a 137 nm), caracterizando sistemas nanoparticulados eficientes para carreamento de fármacos por possuírem diâmetros

inferiores a 300 nm (GUPTA; KOMPELLA, 2006) e baixo índice de polidispersão, (inferior a 0,22), garantindo a homogeneidade da dispersão (AVADI et al., 2010). Considerando o potencial zeta (ζ), as estruturas coloidais apresentaram valores negativos maiores que - 35 mV. De acordo com o sistema considerado, ζ pode ser positivo (catiônico) ou negativo (aniônico). Seu valor absoluto fornece informações importantes sobre a estabilidade de um coloide. Para $|\zeta|$ tipicamente maior do que 30 mV, a alta carga elétrica que é formada na superfície das gotículas incipientes provoca fortes forças repelentes entre elas, impedindo a agregação de partículas adicionais e consequentemente proporcionando ao sistema uma melhor estabilidade (NEVES et al., 2013). Além disso, a carga negativa da superfície das nanocápsulas promove o aumento da sua permanência no sangue porque as partículas positivamente carregadas tendem a ser eliminadas mais rapidamente da corrente sanguínea e acumuladas nos pulmões e no fígado (LI; HUANG, 2008).

5.2 AVALIAÇÃO DA EFICIÊNCIA DE ENCAPSULAÇÃO

O teor de fármaco e a eficiência de encapsulação (EE) das nanosuspensões contendo nanocápsulas de blendas PCL-PEG estão demonstrados na Tabela 3. As formulações contendo o fármaco apresentaram um teor de CIL muito semelhante ao valor teórico e valores de EE superiores a 99,52%, indicando que não houve perda ou degradação do fármaco durante o processo de preparação. Segundo estudos de Mora-Huertas, Fessi e Elaissari (2010), este método apresenta os melhores resultados para a EE, sendo iguais ou superiores a 80%. Estes valores são atribuídos à fraca solubilidade aquosa do CIL ($3 \mu\text{g.mL}^{-1}$ a 25°C) (SHIMIZU et al., 1985), acarretando aumento da concentração do fármaco incorporado à nanopartículas.

TABELA 3 – TEOR DE CIL ENCAPSULADO E EFICIÊNCIA DE ENCAPSULAÇÃO (EE) DAS NANOCÁPSULAS DE BLENDA PCL-PEG

Formulações	Concentração teórica ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	CIL encapsulado ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)*	EE (%)
NC3	3000	2985,51 $\pm$ 0,54	99,52
NC6	6000	5987,58 $\pm$ 0,67	99,79
NC12	12000	11984,64 $\pm$ 0,10	99,87

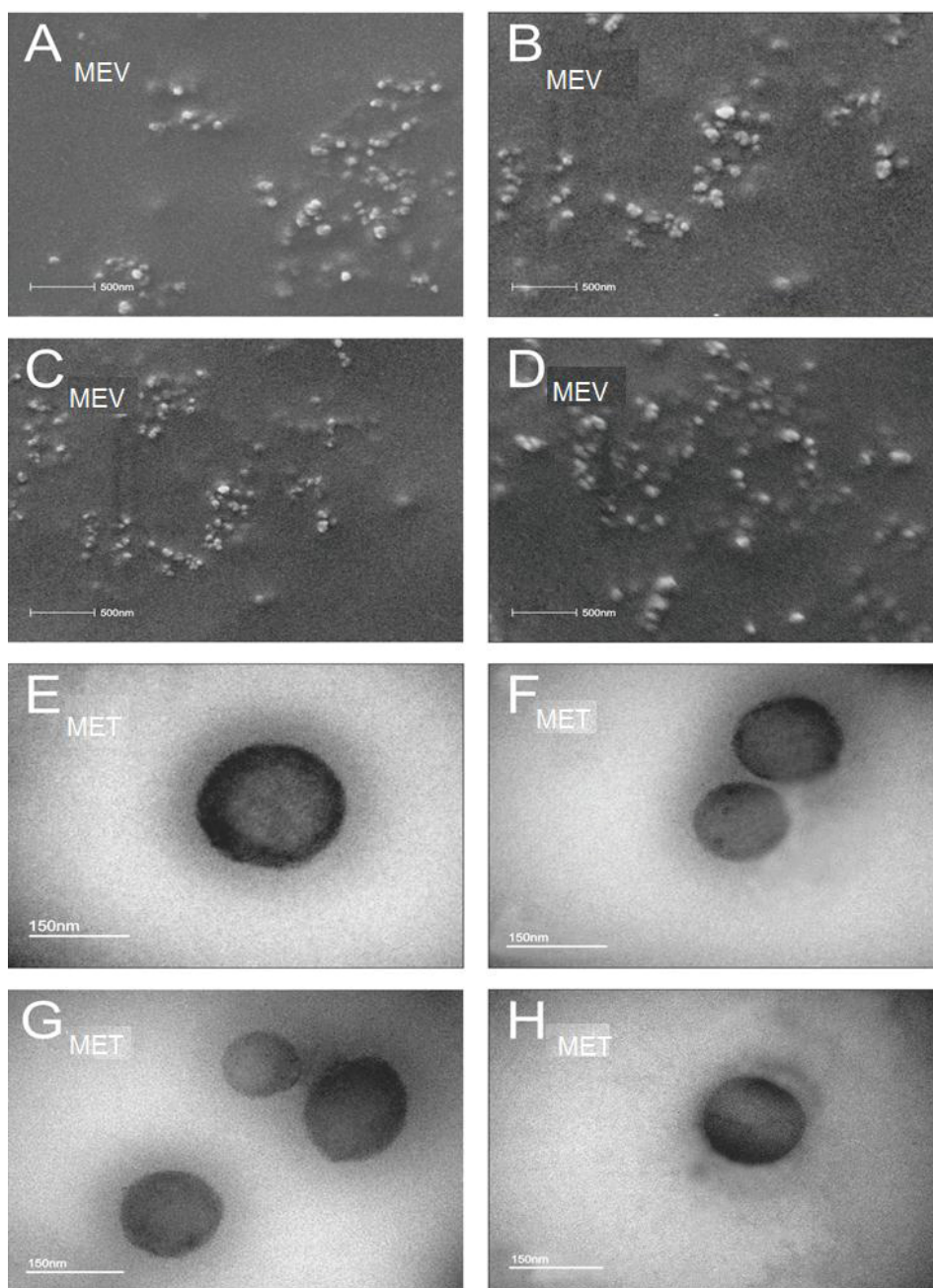
NOTA: *Média (n = 3) $\pm$ desvio padrão.

FONTE: A autora (2019).

5.3 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV) E TRANSMISSÃO (MET)

As fotomicrografias obtidas por MEV e MET comprovaram as dimensões nanométricas das nanocápsulas de blendas PCL-PEG. Verificou-se que mesmo alterando a concentração do fármaco, a morfologia era semelhante entre todas as formulações (Figura 11). As nanocápsulas mostraram estruturas esféricas de superfície lisa com diâmetro médio inferior a 150 nm. Essas nanoestruturas apresentaram tamanho de partícula e índice de polidispersão semelhantes aos obtidos previamente por espectroscopia de correlação de fótons.

FIGURA 11 – FOTOMICROGRAFIAS OBTIDAS POR MEV E MET DAS NANOSUSPENSÕES



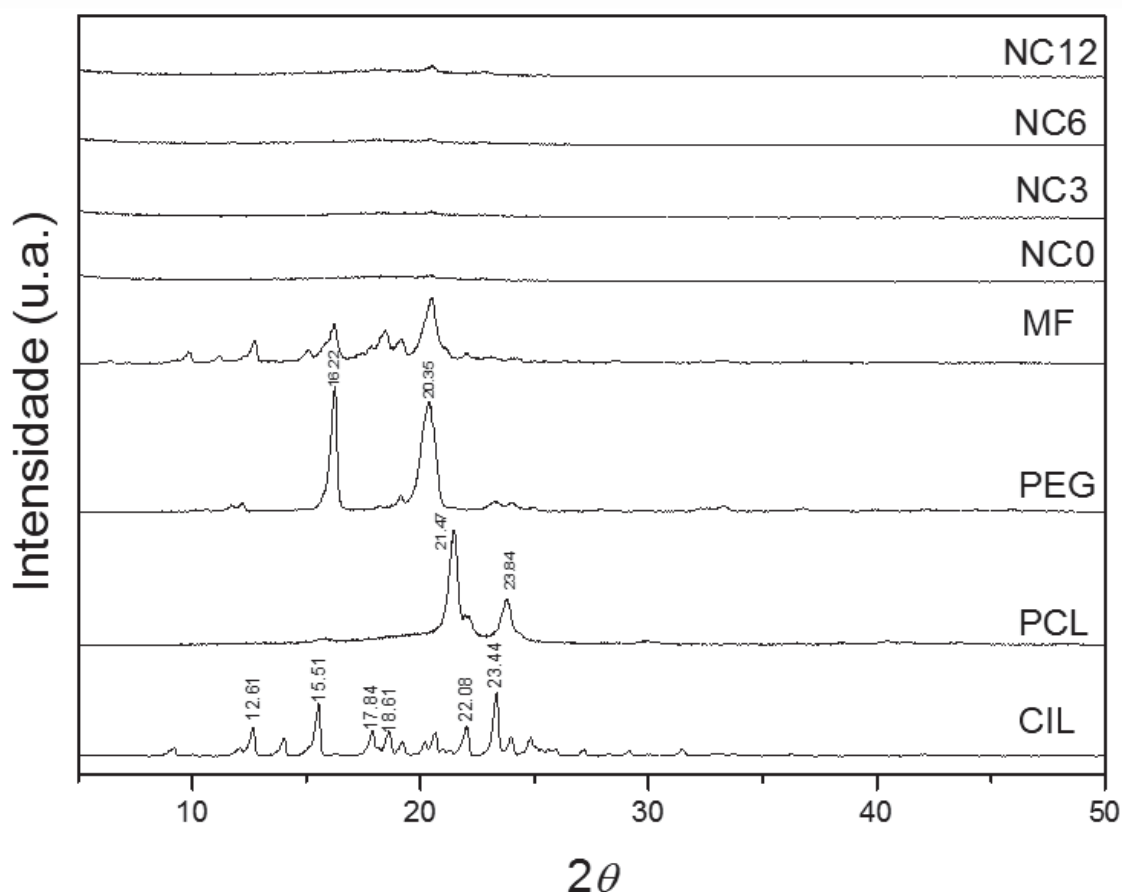
NOTA: Fotomicrografias obtidas por microscopia eletrônica de varredura NC0 (A), NC3 (B), NC6 (C) e NC12 (D) em aumento de 15kX e fotomicrografias obtidas por microscopia eletrônica de transmissão das nanosuspensões NC0 (E), NC3 (F), NC6 (G) e NC12 (H) em aumento de 25Kx.

FONTE: A autora (2019).

5.4 DIFRAÇÃO DE RAIOS X

A Figura 12 demonstra os difratogramas para o CIL, PCL, PEG, mistura física e nanocápsulas liofilizadas em diferentes concentrações (NC0, NC3, NC6 e NC12).

FIGURA 12 – DIFRATOGRAMAS DO CIL, PCL, PEG, MISTURA FÍSICA (MF) E DAS NANOSUSPENSÕES PREPARADAS COM BLENDA PCL/PEG EM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES (NC0, NC3, NC6 E NC12)



FONTE: A autora (2019).

O CIL puro apresentou picos diferentes relacionados à sua estrutura cristalina principalmente em $2\theta = 12,61, 15,51, 17,84, 18,61, 22,08$ e $23,44^\circ$ de acordo com a literatura (PATEL; RAJPUT, 2009; SHIMIZU et al., 1985). Por outro lado, ambos os polímeros revelaram padrões semicristalinos mostrando picos cristalinos a $21,47$ e $23,84^\circ$ (PCL) e $16,22$ e $20,35^\circ$ (PEG). Observou-se uma

diminuição dos picos cristalinos típicos do CIL na mistura física devido ao processo de moagem. No entanto, não foi detectado qualquer pico cristalino nas nanocápsulas de blendas PCL-PEG, e sim halos amorfs de baixa intensidade. Estes resultados sugerem que o procedimento de nanoencapsulação proporcionou uma diminuição intensa dos picos de difração cristalina do CIL levando à amorfização do fármaco (PATIL; GAIKWAD, 2011).

Substâncias em estado sólido podem revelar características cristalinas e/ou amorfas. Em geral, os sólidos amorfs são mais solúveis do que as formas cristalinas devido às energias livres envolvidas no processo de dissolução. Os sólidos em estado amorfo têm moléculas dispostas aleatoriamente e, portanto, uma baixa quantidade de energia é necessária para separá-los. Consequentemente, a sua dissolução é mais rápida do que quando em forma cristalina (STULZER et al., 2009). Este comportamento é particularmente desejável para o CIL por ser um fármaco de baixa solubilidade em água, podendo melhorar o seu perfil de dissolução.

5.5 ESPECTROSCOPIA DE ABSORÇÃO NA REGIÃO DO INFRAVERMELHO COM TRANSFORMADA DE FOURIER (FTIR)

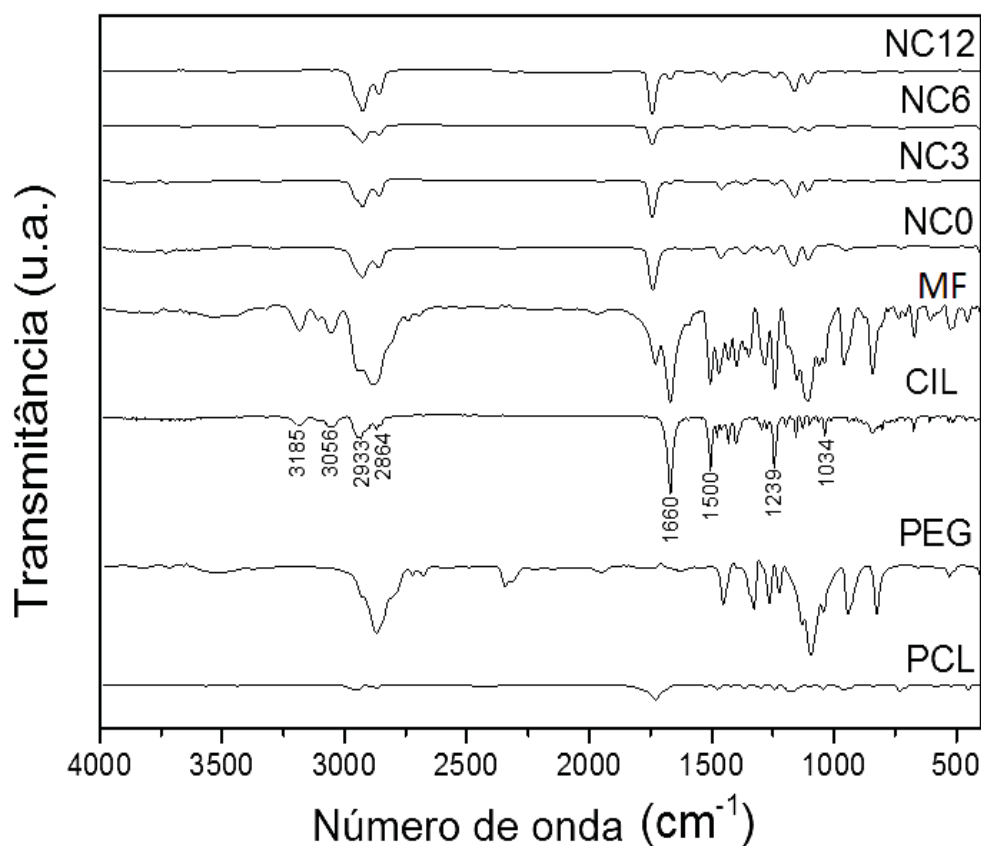
Os espectros FTIR realizados para as nanocápsulas de CIL, PCL, PEG, mistura física e PCL-PEG estão ilustrados na Figura 13. O espectro FTIR obtido a partir da análise do CIL demonstrou bandas em 3185 cm^{-1} , referente à vibração de estiramento N–H de amida secundária em 3054 cm^{-1} correspondente à vibração de estiramento da ligação C–H do anel aromático. As vibrações simétrica e assimétrica de CH_2 foram demonstradas em 2933 e 2864 cm^{-1} , respectivamente. O estiramento C=O de amida levou a uma forte absorção em 1660 cm^{-1} , enquanto o estiramento da ligação C=C do anel aromático foi detectado em 1500 cm^{-1} . Por fim, as vibrações de C–O, do aril alquil éter, são visualizadas em 1239 e 1034 cm^{-1} , em conformidade com os estudos de Shimizu e colaboradores (1985).

Para o poliéster PCL, o espectro exibiu uma banda intensa em 1725 cm^{-1} , correspondente à vibração de deformação axial do grupamento C=O de ésteres

alifáticos simples. As bandas em 2944 e 2860 cm^{-1} correspondem às vibrações simétricas e assimétricas do grupamento $-\text{CH}_2$, respectivamente (ALMEIDA et al., 2014). Bandas observadas em 1171 e 1044 cm^{-1} são referentes ao estiramento C–O.

O espectro do polímero PEG, demonstrou absorções características em 3524 cm^{-1} referente aos grupos hidroxilas terminais $-\text{OH}$ associados por ligações de hidrogênio. O grupamento C–H da cadeia alifática exibe bandas em 2944 cm^{-1} e 2860 cm^{-1} devido as suas vibrações simétricas e assimétricas e a vibração do estiramento assimétrico C–O–C de éteres dialquílicos está representada em 1108 cm^{-1} (NADAL et al., 2016a, 2016b).

FIGURA 13 – ESPECTRO DE FTIR DO CIL, PCL, PEG, MISTURA FÍSICA (MF) E DAS NANOSUSPENSÕES EM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES (NC0, NC3, NC6 E NC12)



FONTE: A autora (2019).

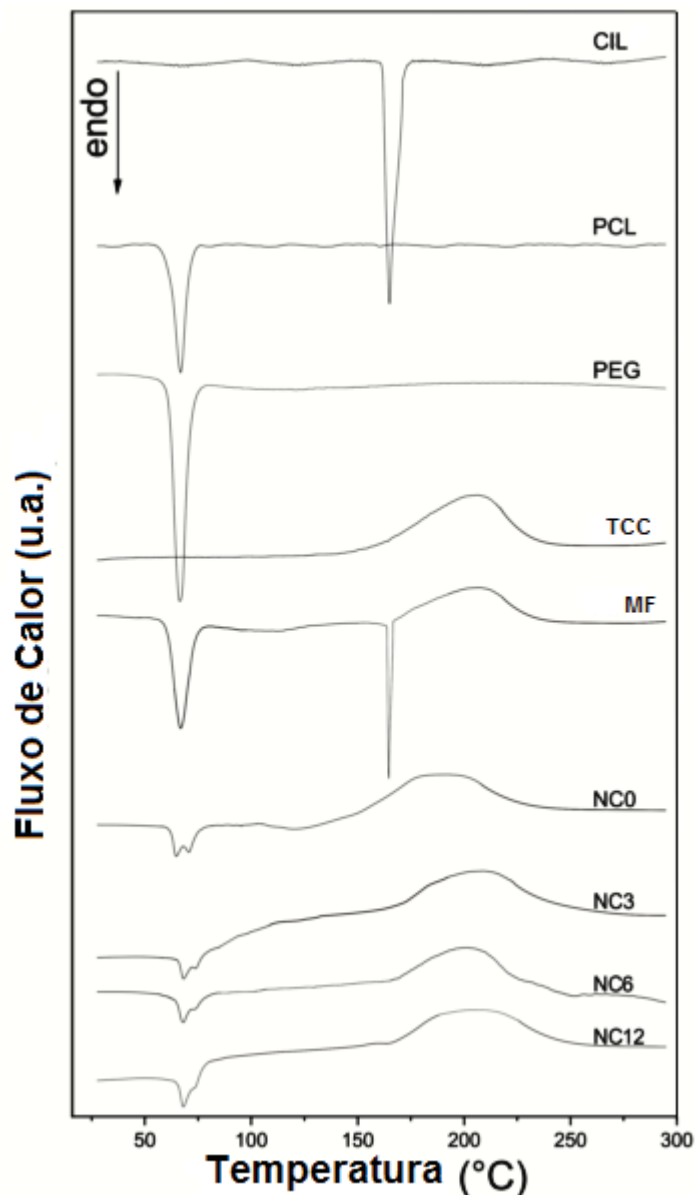
As misturas físicas e as nanocápsulas apresentaram atribuições de bandas na mesma gama de números de onda. Entretanto, não foi observada qualquer diferença na posição das bandas de absorção entre a mistura física e as nanocápsulas de blendas PCL-PEG contendo CIL. Consequentemente, não houve formação de ligação química entre o fármaco e os polímeros durante o processo de nanoencapsulação.

5.6 CALORIMETRIA EXPLORATÓRIA DIFERENCIAL (DSC)

As curvas de DSC realizadas para o CIL, PCL, PEG, TCC, mistura física e nanocápsulas de blendas PCL-PEG são mostradas na Figura 14.

O perfil térmico do CIL puro apresentou um evento endotérmico acentuado a 160,53 °C que correspondeu à temperatura de fusão do fármaco cristalino, como apresentado nos estudos de Patel e Rajput (2009). PCL e PEG apresentaram temperaturas de fusão em 60,21 e 60,08 °C, respectivamente, o que confirmou dados previamente relatados (CHASSOT et al, 2015b; PATIL; GAIKWAD, 2011). Como esperado, os termogramas das misturas físicas revelaram os eventos térmicos atribuídos tanto aos polímeros quanto aos fármacos. Contudo, o evento de fusão típico do CIL não foi observado nas curvas de DSC quando o fármaco foi encapsulado nas nanopartículas, indicando que a amorfização do fármaco ocorreu provavelmente devido à sua solubilização no núcleo oleoso. Este comportamento térmico pode ser favorável à fácil difusão de moléculas de fármaco através do invólucro polimérico, resultando em uma melhora na taxa de dissolução para um fármaco pouco solúvel e liberação sustentada dos nanocarreadores investigados (DIAN et al., 2013).

FIGURA 14 – CURVAS DE DSC DO CIL, PCL, PEG, TCC, MISTURA FÍSICA (MF) E DAS NANOSUSPENSÕES EM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES (NC0, NC3, NC6 E NC12)



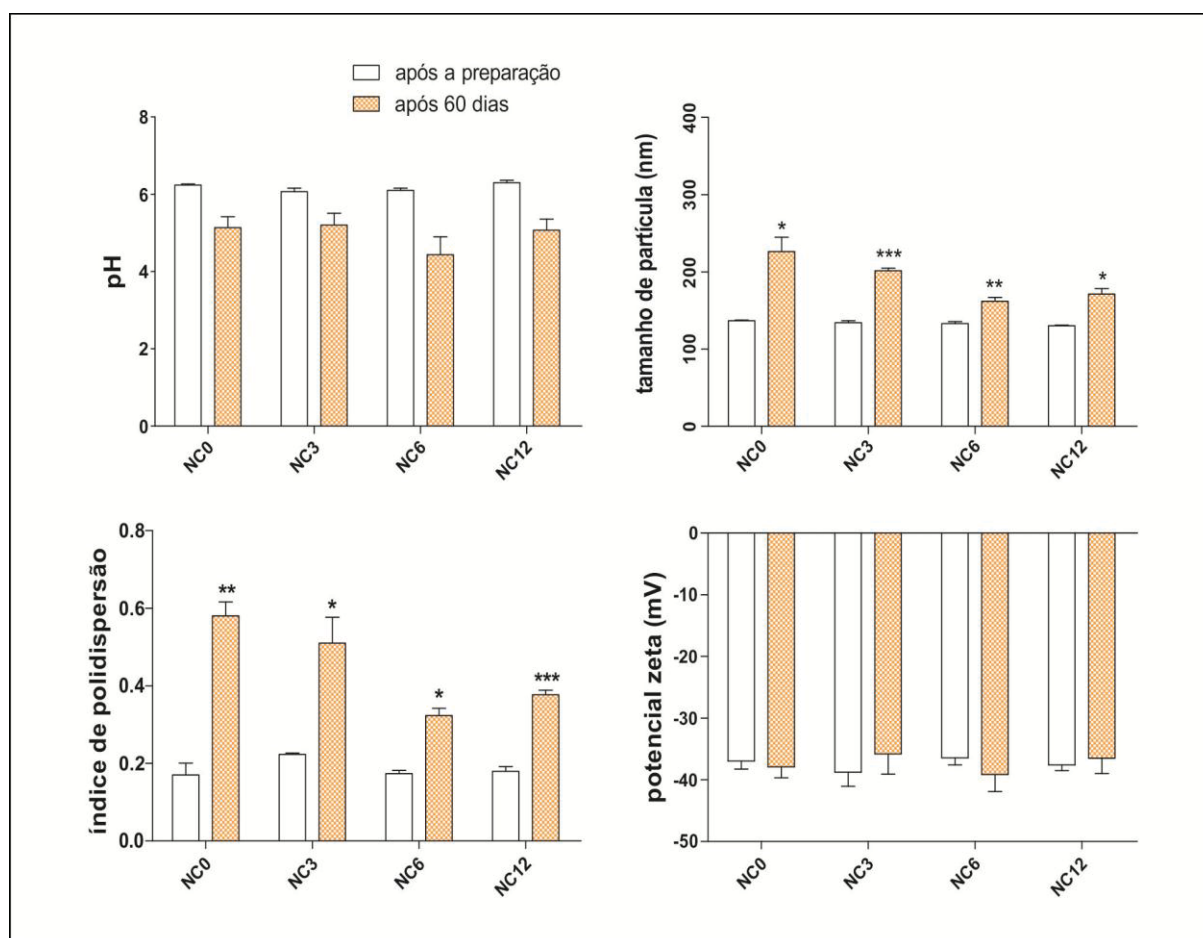
FONTE: A autora (2019).

5.7 ESTUDO DA ESTABILIDADE

Após 60 dias, as suspensões coloidais de nanocápsulas de blendas PCL-PEG mantiveram o mesmo aspecto visual, sem qualquer precipitação ou alteração de cor. O valor do pH, tamanho médio de partícula (nm), índice de

polidispersão e potencial zeta (mV) foram comparados imediatamente após a preparação e após 60 dias (Gráfico 1).

GRÁFICO 1 – VALORES DE PH, TAMANHO DE PARTÍCULA, ÍNDICE DE POLIDISPERSÃO E POTENCIAL ZETA DAS NANOSUSPENSÕES DE CIL AVALIADAS IMEDIATAMENTE À PREPARAÇÃO E 60 DIAS APÓS



NOTA: Os asteriscos indicam os níveis de significância comparados ao grupo controle; significativamente diferente *p < 0,05, **p < 0,01 e *** p < 0,001 (t-student).

FONTE: A autora (2019).

Todas as formulações apresentaram um decréscimo nos valores de pH após o período de 60 dias. A diminuição foi significativa ($p < 0,05$) para a maioria das formulações. De acordo com Schaffazick et al. (2003), esta diminuição dos valores de pH pode estar relacionada tanto à ionização de grupos carboxílicos presentes no polímero, quanto à hidrólise, dependendo da hidrofilicidade do poliéster.

Houve mudança do tamanho médio das partículas, podendo-se determinar a tendência de agregação das nanocápsulas em função do tempo. O crescimento das nanopartículas ocorreu demonstrando uma desvantagem dos sistemas nanocoloidais. Isso pode estar relacionado com o Amadurecimento de Ostwald, que pode ocorrer durante o processamento, armazenamento e manuseio de suspensões. Esse processo espontâneo termodinamicamente orientado ocorre porque as partículas maiores são mais favorecidas energeticamente do que as partículas menores (KHINAST; BAUMGARTNER; ROBLEGG, 2013).

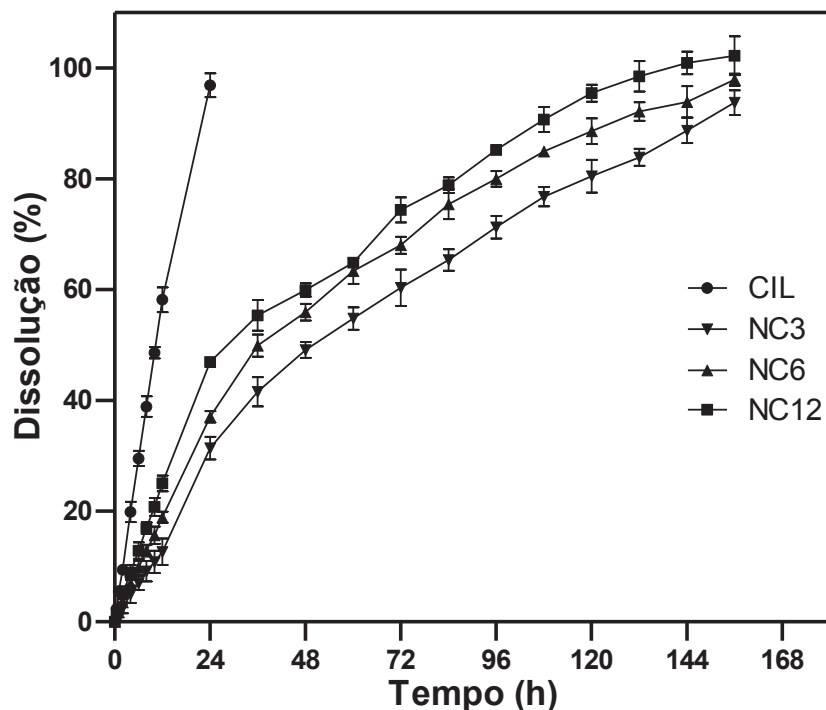
Com relação ao índice de polidispersão, foi possível verificar que houve variação estatística ($p < 0,05$) para as formulações, após 60 dias de armazenamento. Esses resultados indicam heterogeneidade nos diâmetros das partículas, pois foram observados valores próximos ou maiores que 0,5 (AVADI et al., 2010).

Quanto ao potencial zeta, não foram observadas diferenças estatísticas ($p > 0,05$) após o armazenamento, permitindo prever uma boa estabilidade coloidal, devido a uma alta energia de limitação entre as partículas (MORA-HUERTAS; FESSI; ELAISSARI, 2010).

5.8 ESTUDO DA LIBERAÇÃO DO FÁRMACO *IN VITRO*

Em relação aos estudos *in vitro* de liberação do fármaco, as nanocápsulas de blendas PCL-PEG apresentaram perfis de liberação semelhantes independentemente da concentração do fármaco ($p > 0,05$) – Gráfico 2.

GRÁFICO 2 – PERFIL DE LIBERAÇÃO IN VITRO EM UMA SOLUÇÃO DE 30% ETANOL-ÁGUA DE CIL E NANOCÁPSULAS DE PCL-PEG (NC3, NC6 E NC12)



FONTE: A autora (2019).

NC3, NC6 e NC12 liberaram 80% de CIL em 90, 96 e 108 h de experimento, respectivamente. Por outro lado, a solução correspondente a 30% de etanol-água e CIL liberou 80% do fármaco em cerca de 20 h. A diferença na taxa de liberação pode ser explicada pelo gradiente de concentração entre cada formulação e o meio de dissolução. Em concentrações mais elevadas de CIL, este processo foi mais rápido uma vez que este gradiente é a força motriz para a dissolução do fármaco. Além disso, na maior concentração de fármaco encapsulado, o CIL pode ser distribuído perto da superfície das nanocápsulas, proporcionando uma liberação mais rápida *in vitro*. Essa diferença também pode ser explicada pela supersaturação, a nucleação e a presença do CIL em concentrações mais elevadas, levando à sua liberação (CHASSOT et al., 2015b). Por conseguinte, a nanoencapsulação de CIL retardou a liberação do fármaco, o que pode prolongar o seu efeito terapêutico.

Os dados experimentais foram ajustados ao modelo de Korsmeyer-Peppas visando compreender o mecanismo de liberação do fármaco. As nanocápsulas de blendas PCL-PEG apresentaram um valor de n de 0,66 (NC3), 0,67 (NC6) e 0,54

(NC12). Estes resultados indicaram que a liberação de CIL é conduzida por transporte anômalo, isto é, a liberação do fármaco é controlada por relaxamento/degradação do polímero e pela difusão Fickiana do CIL.

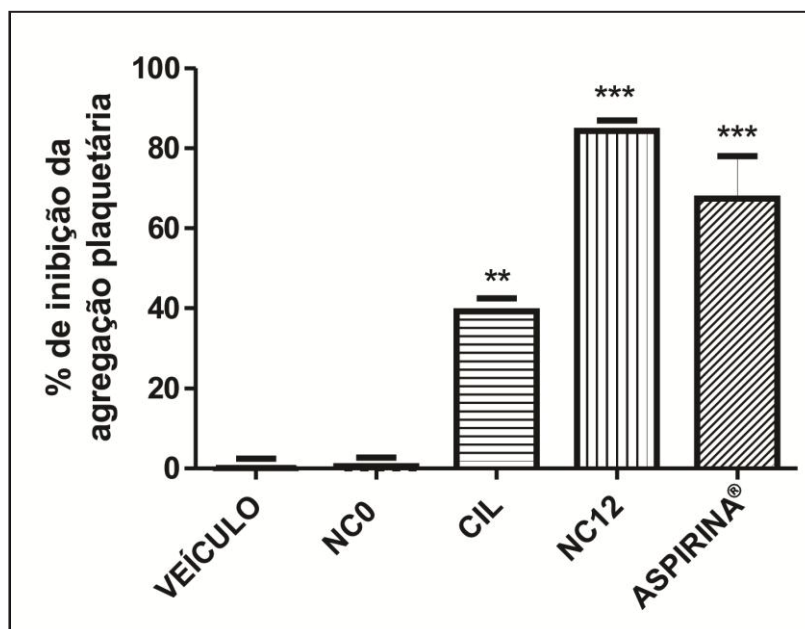
5.9 EXPERIMENTOS FARMACOLÓGICOS *IN VIVO*

5.9.1 Avaliação da atividade antiagregante plaquetária

Fármacos que inibem a agregação plaquetária são usados como primeira linha de escolha para a prevenção e cura de eventos trombóticos em doenças obstrutivas arteriais (STEINHUBL et al., 2002).

Apesar do CIL ter seu efeito bem conhecido como antiagregante plaquetário pela inibição da fosfodiesterase III (OTA et al., 2008), sua dose precisa ser administrada duas vezes ao dia para um resultado clínico adequado. Para tanto, o efeito *in vivo* do CIL puro, das nanocápsulas contendo CIL (NC12) e da Aspirina® na inibição da agregação plaquetária induzidos pelo colágeno foi realizado após 24 h da administração da última dose, a fim de verificar se a nanoencapsulação teve influência no aumento da resposta do fármaco. Os resultados estão demonstrados no Gráfico 3.

GRÁFICO 3 – PORCENTAGEM DE INIBIÇÃO DA AGREGAÇÃO PLAQUETÁRIA DE NC0 (CONTROLE), DE CIL LIVRE, DA FORMULAÇÃO NC12 E DA ASPIRINA®



NOTA: Cada barra representa a média $\pm$ erro padrão da média, a partir de 8 ensaios independentes. Os asteriscos indicam os níveis de significância comparados ao grupo controle; significativamente diferente ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$, ANOVA - teste de Bonferroni.

FONTE: A autora (2019).

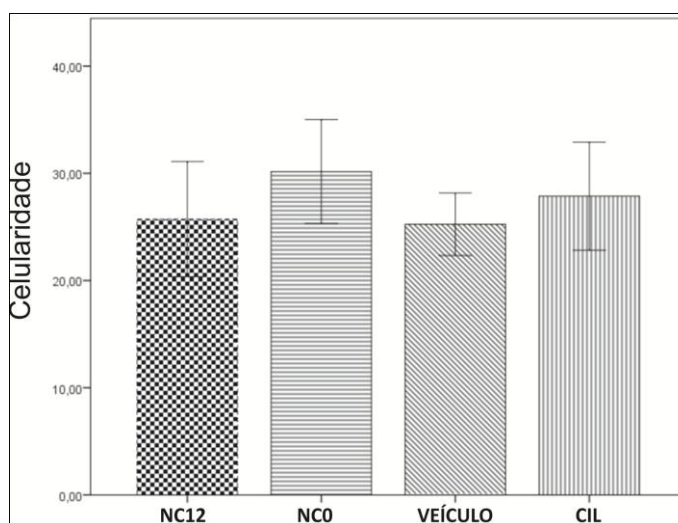
A nanosuspensão NC0 e o veículo foram utilizados como controles e não proporcionaram inibição da agregação plaquetária. O CIL puro, as nanocápsulas com CIL (NC12) e a Aspirina® apresentaram efeito antiagregante plaquetário estatisticamente significativo comparado aos controles ($p < 0,01$). Além disso, NC12 teve um efeito significativo na inibição da agregação plaquetária em comparação com o CIL livre ($p < 0,01$), 24 horas após a administração da última dose. Provavelmente, as nanocápsulas contendo CIL inibiram a agregação das plaquetas durante um intervalo de tempo maior controlando a taxa de liberação do fármaco. Deste modo, é possível sugerir que a nanoencapsulação de CIL em blendas PCL-PEG pode tanto diminuir a dosagem oral do fármaco como prolongar o efeito antiagregante plaquetário *in vivo* de modo a minimizar os seus inconvenientes na farmacoterapia. As nanocápsulas contendo CIL (NC12) levaram a um resultado semelhante em comparação à Aspirina® ($p > 0,05$), um medicamento padrão ouro na

ação antiagregante plaquetária (SCHRÖR, 1997). Este desempenho não foi alcançado pelo CIL puro em comparação à Aspirina ($p < 0,05$) no mesmo intervalo de tempo. Portanto, estes resultados demonstram que as nanocápsulas de blendas PCL-PEG contendo CIL podem fornecer um efeito antiagregante plaquetário *in vivo* aumentado para o CIL e deve ser estudado como um novo transportador polimérico para tratar eventos DAOP e CI.

5.9.2 Avaliação da morfologia das tûnicas da aorta e perfil lipídico

O CIL está associado à diminuição da migração das células musculares lisas para o endotélio, bem como seu crescimento e proliferação (KIM et al., 2005; HAYASHI et al., 2000). O gráfico 4 apresenta a média dos valores de celularidade. O grupo 2 (NC0) apresentou os maiores valores (30,16 células) e o grupo 3 (veículo) os menores (25,25 células), não houve diferença estatisticamente significativa ($p > 0,05$) entre os tratamentos.

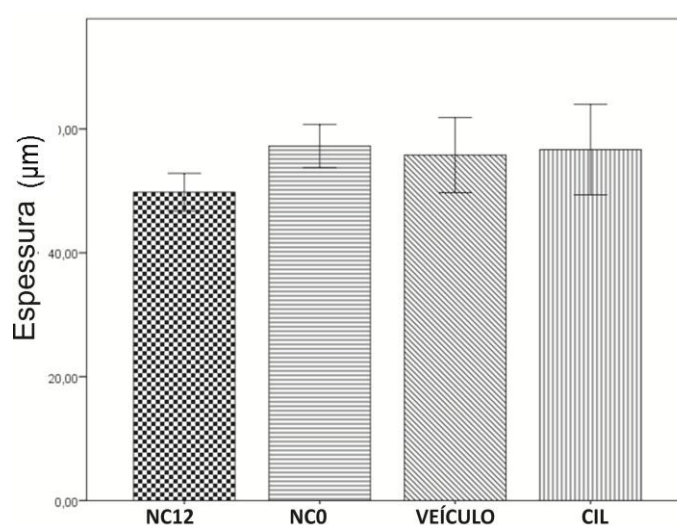
GRÁFICO 4 – MÉDIA DA CELULARIDADE DA ARTÉRIA AORTA PARA OS GRUPOS NC12, NC0 (CONTROLE), VEÍCULO E CIL LIVRE



FONTE: A autora (2019).

O Gráfico 5, apresenta os valores médios da espessura da artéria aorta abdominal. O grupo 2 (NC0) apresentou os maiores valores médios (57,23 μm), enquanto o grupo 1 (NC12) apresentou os menores (49,79 μm), porém não houve significância estatística ($p > 0,05$).

GRÁFICO 5 – MÉDIA DA ESPESSURA DA ARTÉRIA AORTA PARA OS GRUPOS NC12, NC0 (CONTROLE), VEÍCULO E CIL LIVRE



FONTE: A autora (2019).

O teste ANOVA unidirecional demonstrou a existência de diferença estatisticamente significativa entre os grupos ($p = 0,043$), entretanto ao aplicar o teste de comparação múltipla de Bonferroni, não houve diferença significativa. Procurando avaliar a correlação entre as variáveis, foi realizado o teste de correlação de Pearson, que mostrou correlação positiva leve (0,333) entre as variáveis espessura da artéria aorta e celularidade, mas sem relevância estatística ($p = 0,97$).

No que concerne à celularidade, não houve diferença estatisticamente significativa na presença de núcleos celulares da artéria aorta entre os grupos avaliados. Esperava-se que os grupos recebendo as nanocápsulas de CIL (NC12) e o CIL puro apresentassem os menores valores médios, uma vez que o fármaco inibe a proliferação e crescimento de células musculares. Entretanto, o grupo que foi administrado apenas o veículo propilenoglicol (grupo 3) apresentou as menores

médias, enquanto o grupo NC0 (grupo 2) as maiores. Além disso, o teste de correlação de Pearson demonstrou apenas uma leve correlação, sem significância estatística entre as variáveis espessura e celularidade.

A escassa significância estatística tanto na comparação das médias de celularidade como espessura pode ser condizente com a idade e condições dos ratos utilizados (jovens, sem comorbidades e sem dieta prévia hiperlipídica) e o tamanho da amostra, como também o tempo de tratamento de um mês pode ter contribuído para a ausência do desenvolvimento de alterações histológicas.

A Tabela 4 apresenta os valores médios (DP) de Colesterol Total, HDL-c, Triglicerídeos e LDL-c. Como anteriormente relatado, estudos *in vivo* apontam que o CIL reduz os níveis de triglicerídeos séricos e aumenta os de colesterol de alta densidade (HDL-c), um efeito que parece ser mediado pelo aumento dos níveis séricos de lipoproteína lipase, não apresentando, entretanto, efeitos significativos sobre a lipoproteína de baixa densidade (LDL-c) (TANI et al., 2000; ELAM et al., 1998).

Para fins comparativos, foram considerados os valores referenciais desejáveis para indivíduos com idade acima de 20 anos para os parâmetros lipídicos séricos em jejum, os quais segundo a Sociedade Brasileira de Cardiologia (2017) são: I) Colesterol total: < 190 mg/dL; II) HDL-c: > 40 mg/dL; III) Triglicerídeos: < 150 mg/dL; IV) LDL-c: < 130 mg/dL.

TABELA 4 – VALORES DE MÉDIA (DP) PARA OS PARÂMETROS DO PERFIL LIPÍDICO PARA OS GRUPOS NC12, NC0 (CONTROLE), VEÍCULO E CIL LIVRE

Grupo	Colesterol total Média (DP)	HDL-c Média (DP)	Triglicerídeos Média (DP)	LDL-c Média (DP)
NC12	110,57 (19,77)	68,14 (9,74)	78,85 (31,45)	26,28 (12,51)
NC0	114,75 (11,96)	49,45 (6,91)	171,75 (49,43)	40,12 (15,16)
VEÍCULO	108,00 (15,95)	52,00 (8,37)	128,60 (57,39)*	34,60 (15,24)
CIL	100,25 (26,40)	59,90 (6,77)*	88,12 (33,95)	31,50 (24,04)

FONTE: A autora (2019).

O teste de ANOVA unidirecional revelou significância estatística entre os grupos experimentais para as variáveis triglicerídeos e HDL-c. Ao se aplicar o teste de significância de Tukey, encontrou-se relevância estatística entre os grupos NC12 e NC0 ($p = 0,002$), e entre os grupos NC0 e CIL ($p = 0,004$) para a variável triglicerídeo, sendo que o grupo NC12 apresentou as menores médias e o NC0 as maiores. Quanto ao HDL-c, os maiores valores foram evidenciados para o grupo NC12 e os menores para NC0. Não foram observadas diferenças estatísticas para as variáveis dependentes colesterol total e LDL-c entre os grupos avaliados.

O uso do CIL promoveu uma melhoria do perfil lipídico em relação ao veículo, como encontrado na literatura (TANI et al., 2000; ELAM et al., 1998). Da mesma forma, NC12 teve respostas positivas neste perfil, com diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo NC0 e ao VEÍCULO no parâmetro HDL-c. Embora os resultados numéricos do grupo NC12 sejam os mais desejáveis, cabe ressaltar que não foram observadas diferenças estatísticas em comparação ao grupo CIL puro. Talvez um tempo mais prolongado de tratamento ou sua aplicação em ratos portadores de doença aterosclerótica ou de idade mais avançada possa discriminar os efeitos entre os dois grupos.

Outra consideração relevante é que o grupo NC0 (grupo 2) apresentou os maiores valores de triglicerídeos. Considerando que as nanocápsulas são constituídas por um núcleo oleoso, envolvido em um invólucro polimérico (SCHAFFAZICK; GUTERRES, 2003), a presença dos triglicerídeos de cadeia média na composição desse sistema carreador pode ser a justificativa para esse aumento encontrado para esse parâmetro.

No que tange aos valores séricos médios de LDL, não foi encontrada diferença estatística entre os grupos; o que condiz com estudos na literatura que relatam que a droga não afeta os níveis dessa lipoproteína (ELAM et al., 1998).

6 CONCLUSÃO

As nanocápsulas de blendas PCL-PEG contendo CIL foram preparadas com sucesso pelo método de deposição interfacial do polímero pré-formado. Formulações de tamanhos nanométricos, monodispersas, estáveis, amorfas, com alta eficiência de encapsulação do fármaco e sem a ligação química polímero-fármaco foram capazes de diminuir a taxa de dissolução do CIL.

As nanocápsulas contendo CIL (NC12) demonstraram um efeito antiagregante plaquetário estatisticamente significativo *in vivo* em comparação com os controles e o CIL puro. As nanocápsulas poliméricas contendo cilostazol não promoveram alterações morfológicas quanto a celularidade e espessura das túnicas arteriais da artéria aorta de ratos Wistar saudáveis e jovens. Em relação ao perfil lipídico, esta formulação melhorou significativamente os valores de HDL-c, triglicerídeos e LDL-c.

Estes resultados apoiam uma base experimental para o uso das nanocápsulas de blendas PCL-PEG contendo CIL para a liberação controlada de CIL, sendo uma alternativa interessante para o tratamento de eventos trombóticos arteriais.

REFERÊNCIAS

AGRAWAL, K.; EBERHARDT, R. T. Contemporary medical management of peripheral arterial disease: a focus on risk reduction and symptom relief for intermittent claudication. **Cardiology Clinics**, v. 33, n. 1, p. 111–137, 2015.

AL HAUSHEY, L.; BOLSINGER, M. A.; BORDES, C.; GAUVRIT, J. Y.; BRIANÇON, S. Improvement of a bovine serum albumin microencapsulation process by screening design. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 344, p. 6-25, 2007.

ALMEIDA, M. A.; NADAL, J. M.; GRASSIOLLI, S.; PALUDO, K. S.; ZAWADZKI, S. F.; CRUZ, L.; PAULA, J. P.; FARAGO, P. V. Enhanced gastric tolerability and improved anti-obesity effect of capsaicinoids-loaded PCL microparticles. **Materials Science and Engineering C**, v. 40, p. 345–356, 2014.

AMASS, W.; AMASS, A.; TIGUE, B. A review of biodegradable polymer: uses correte developments in the synthesis and characterization og biodegradable polyesters, blends of bodegradable and recent advances in biodegradation studies. **Polymer International**, v. 17, p. 139-144, 1998.

AVADI, M. R. Preparation and characterization of insulin nanoparticles using chitosan and Arabic gum with ionic gelation method. **Nanomedicine**, v. 6, n. 1, p. 58–63, 2010.

BARBOSA E. C.; DALLE R. D. M. Benefícios do condicionamento físico como tratamento da claudicação intermitente. **Acta Fisiátrica**, v. 15, n. 3, p. 192-194, 2008.

BARROSO, T. A.; MARINS, L. B.; ALVES, R.; GONÇALVES, A. C. S.; BARROSO, S. G.; ROCHA, G. S. Association of Central Obesity with The Incidence of Cardiovascular Diseases and Risk Factors. **International Journal of Cardiovascular Sciences**, v. 30, n. 5, p. 416-424, 2017.

BENJO, A. M.; GARCIA, D. C.; JENKINS, J. K.; CARDOSO, R. M.; MOLINA, T. P.; EL-HAYEK, G. E.; NADKARNI, G. N.; AZIZ, E. F.; DINICOLANTONIO, J. J.; BERNARDI, P. S. M.; MOREIRA, H. W. Análise dos traçados de ondas da agregação plaquetária em pacientes com doenças cardiovasculares em uso do ácido acetil salicílico comparados a doadores de sangue. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v. 26, n. 4, p. 239-244, 2004.

BLAIR, G. W.; APPLETON, J. P.; FLAHERTY, K.; DOUBAL, F.; SPRIGG, N.; DOOLEY, R.; RICHARDSON, C.; HAMILTON, I.; LAW, Z. K.; SHI, Y.; STRINGER, M. S.; THRIPPLETON, M. J.; BOYD, J.; SHULER, K.; BATH, P. M.; WARDLAW, J. M. Tolerability, safety and intermediary pharmacological effects of cilostazol and isosorbide mononitrate, alone and combined, in patients with lacunar ischaemic stroke: The LACunar Intervention-1 (LACI-1) trial, a randomised clinical trial. **EClinicalMedicine**, v. 11, p. 34–43, 2019.

BORGES, J. L. Cilostazol e aterosclerose. **Revista Brasileira Médica**, v. 66, n. 11, p. 390-404, 2009.

BORN, G. V. R.; CROSS, M. J. The aggregation of blood platelets. **Journal of Physiology**, v.168, p. 178-195, 1963.

BRECHER, G.; CRONKITE, E. P.; Morphology and enumeration of human blood platelets. **Journal of Applied Physiology**, v.3, p. 365-377, 1950.

BRUXEL, F.; LAUX, M.; WILD, L. B.; FRAGA, M.; KOESTER, L. S.; TEIXEIRA, H. F. Nanoemulsões como sistemas de liberação parenteral de fármacos. **Química Nova**, v. 35, n. 9, 2012.

CENTRO BRASILEIRO DE INFORMAÇÃO SOBRE MEDICAMENTOS (CEBRIM/CFF). Conselho Federal de Farmácia. **Evidência farmacoterapêutica do cilostazol**. Brasília, 2004. Disponível em: <<http://www.cff.org.br/cebrim.html>>. Acesso em: 15 jan. 2015.

CHASSOT, J. M.; FERREIRA, L. M.; GOMES, F. P.; CRUZ, L.; TASSO, L. Stability-indicating RP-HPLC method for determination of beclomethasone dipropionate in nanocapsule suspensions. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 51, n. 4, p. 803–810, 2015a.

CHASSOT, J. M.; RIBAS, D.; SILVEIRA, E. F.; GRÜNSPAN, L. D.; PIRES, C. C.; FARAGO, P. V.; BRAGANHOL; TASSO, L.; CRUZ, L. Beclomethasone dipropionate-loaded polymeric nanocapsules: development, *in vitro* cytotoxicity, and *in vivo* evaluation of acute lung injury. **Journal of Nanoscience and Nanotechnology**, v. 15, n. 1, p. 855-864, 2015b.

CHEN, Y-C.; HO, H-O.; CHIOU, J-D.; SHEU, M-T. Physical and dissolution characterization of cilostazol solid dispersion prepared by hot melt granulation (HMG) and thermal adhesion granulation (TAG) methods. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 473, p. 458-468, 2014.

COIMBRA, M.; ISACCHI, B.; VAN BLOOIS, L.; TORANO, J. S.; KET, A.; WU, X.; BROERE, F.; METSELAAR, J. M.; RIJCKEN, C. J.; STORM, G.; BILIA, R.; SCHIFFELERS, R. M. Improving solubility and chemical stability of natural compounds for medicinal use by incorporation into liposomes. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 416, p. 433- 442, 2011.

COOK-MILLS, J. M.; MARCHESE, M. E.; ABDALA-VALENCIA, H. Vascular Cell Adhesion Molecule-1 Expression and Signaling During Disease: Regulation by Reactive Oxygen Species and Antioxidants. **Antioxidants & Redox Signaling**, v. 15, n. 6, 2011.

CRAIG, M. P. Analysis of the cilostazol safety database. **The American Journal of Cardiology**, v. 87, n. 12, p. 28-33, 2001.

CRUZ, L.; SCHAFFAZICK, S. R.; DALLA COSTA, T.; SOARES, L. U.; MEZZALIRA, G.; da SILVEIRA, N. P.; SCHAPOVAL, E. E.; POHLMANN, A. R.; GUTERRES, S. S. Physico-chemical characterization and *in vivo* evaluation of indomethacin ethyl ester-loaded nanocapsules by PCS, TEM, SAXS, interfacial alkaline hydrolysis and antiedematogenic activity. **Journal of Nanoscience and Nanotechnology**, v. 6, p. 3154–3162, 2006.

DIAN, L.; YANG, Z.; LI, F.; WANG, Z.; PAN, X.; PENG, X.; HUANG, X.; GUO, Z.; QUAN, G.; SHI, X.; CHEN, B.; LI, G.; WU, C. Cubic phase nanoparticles for sustained release of ibuprofen: formulation, characterization, and enhanced bioavailability study. **International Journal of Nanomedicine**, v. 8, p. 845–854, 2013.

DIMER, F. A.; FRIEDRICH, R. B.; BECK, R. C. R.; GUTERRES, S. S.; POHLMANN, A. R. Impactos da nanotecnologia na saúde: produção de medicamentos. **Química Nova**, São Paulo, v. 36, n. 10, 2013.

DUNNE, M.; BIBBY, D.C.; JONES, J.C.; CUDMORE, S. Encapsulation of protamine sulphate compacted DNA in polylactide and polylactide-co-glycolide microparticles. **Journal of Controlled Release**, v. 92, p. 209-219, 2003.

DURÁN, N.; MATTOSO, L. H. C.; MORAIS, P. C. **Nanotecnologia: Introdução, preparação, caracterização de nanomateriais e exemplos de aplicação**. São Paulo: Artliber Editora, 2006.

DURAZO, A. E.; SITRÂNGULO, C. J.; PRESTI, C.; SILVA, E. S.; LUCCIA, N. Doença arterial obstrutiva periférica: que atenção temos dispensado à abordagem clínica dos pacientes?. **Jornal Vascular Brasileiro**, v. 4, n. 3, p. 255-264, 2005.

ELAM, M. B.; HECKMAN, J.; CROUSE, J. R.; HUNNINGHAKE, D. B.; HERD, J. A.; DAVIDSON, M.; GORDON, I. L.; BORTEY, E. B.; FORBES, W. P. Effect of the novel antiplatelet agent cilostazol on plasma lipoproteins in patients with intermittent claudication. **Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology**, v. 18, n. 12, p. 1942–1947, 1998.

FESSI, H.; PUISIEUX, F.; DEVISSAGUET, J. PH.; AMMOURY, N.; BENITA, S. Nanocapsule formation by interfacial polymer deposition following solvent displacement. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 55, n. 1, p. R1-R4, 1989.

FRATANTONI, J. C.; POINDEXTER, B. J. Measuring platelet aggregation with microplate reader – A new approach to platelet aggregation studies. **American Journal of Clinical Pathology**, v. 94, n. 5, p. 613-617, 1990.

GAWALI, V. U.; PATILP, B.; CHEDE, S. M.; JAGDALE, S. C.; KUCHEKAR, B. S.; CHABUKSWAR, A. R. Studies on cilostazol and β - cyclodextrin inclusion complexes. **International Journal of PharmTech Research**, v. 1, n. 4, p. 1073-1078, 2009.

GOMES, M. L. S.; KLEIN, T.; SIMIONATTO, M.; NADAL, J. M.; ZANIN, S. M. W.; BORSATO, D. M.; FARAGO, P. V. A simple RP-HPLC/UV method for determination of cilostazol in polymeric nanoparticles suspensions: development and validation. **Latin American Journal of Pharmacy**, v. 34, n. 4, p. 803-809, 2015.

GONÇALVES, M. de C. **Efeito inibitório duradouro do óxido nítrico sobre a agregação plaquetária**. 101 f. Dissertação (Mestrado em Farmacologia) – Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2012.
GREF, R.; MINAMITAKE, Y.; PERACCHIA, M. T.; TRUBETSKOY, V.; TORCHILIN, V.; LANGER, R. Biodegradable long-circulating polymeric nanospheres. **Science**, v. 263, p. 1600-1603, 1994.

GRAF, R.; DOMB, A.; QUELLEC, P.; BLUNK, T.; MÜLLER, R. H.; VERBAVATZ, J. M.; LANGER, R. The controlled intravenous delivery of drugs using PEG-coated sterically stabilized nanospheres. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 16, p. 215-233, 1995.

GRAF, R.; LÜCK, M.; QUELLEC, P.; MARCHAND, M.; DELLACHERIE, E.; HARNISCH, S.; BLUNK, T.; MÜLLER, R.H. 'Stealth' corona-core nanoparticles surface modified by polyethylene glycol (PEG): influences of the corona (PEG chain length and surface density) and of the core composition on phagocytic uptake and plasma protein adsorption. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 18, p. 301-13, 2000.

GUERRERO-ARELLANO, H. E. La Nanotecnologia farmacêutica es una realidad. **Revista Científica Domínio de Las Ciências**, [s. l.], v. 3, p. 526–538, 2017.

GUPTA, R. B.; KOMPELLA, U. B. **Nanoparticle Technology for Drug Delivery**. New York: Taylor and Francis, v. 159, p. 199-229, 2006.

GUTERRES, S. S.; WEISS, V.; de LUCC, F. L.; POHLMANN, A. R. Influence of benzyl benzoate as oil core on the physicochemical properties of spray-dried powders from polymeric nanocapsules containing indomethacin. **Drug Delivery**, v. 7, p. 195-199, 2000.

GUTERRES, S. S.; ALVES, M. P.; POHLMANN, A. R. Polymeric nanoparticles, nanospheres and nanocapsules for cutaneous applications. **Drug Target Insights**, v. 2, p. 147-157, 2007.

HANS, M. L., LOWMAN, A. M. Biodegradable nanoparticles for drug delivery and targeting. **Current Opinion in Solid State and Materials Sciences**, v. 6, p. 319-327, 2002.

HAYASHI S; MORISHITA R.; MATSUSHITA H.; NAKAGAMI H.; TANIYAMA Y.; NAKAMURA T. Cyclic AMP Inhibited Proliferation of Human Aortic Vascular Smooth Muscle Cells, Accompanied by Induction of p53 and p21. **Hypertension**, v. 35, n. 1, 237-243, 2000.

HIATT, W. R.; MONEY, S.R.; BRASS, E. P. Long-term safety of cilostazol in patients with peripheral artery disease: the CASTLE study (Cilostazol: A Study in Long-term Effects). **Journal of Vascular Surgery**, v. 47, n. 2, p. 330–336, 2008.

JAIN, R. The manufacturing techniques of various drug loaded biodegradable poly (lactide-coglycolide) (PLGA) devices. **Biomaterials**, v. 21, p. 2475-2490, 2000.

KAMALY, N.; YAMEEN, B.; WU, J.; FAROKHZAD, O. C. Degradable Controlled-Release Polymers and Polymeric Nanoparticles: Mechanisms of Controlling Drug Release. **Chemical Reviews**, v. 116, n. 4, p. 2602-2663, 2016.

KHINAST, J.; BAUMGARTNER, R.; ROBLEGG, E. Nano-extrusion: a one-step process for manufacturing of solid nanoparticle formulations directly from the liquid phase. **AAPS PharmSciTech**, v. 14, n. 2, p. 601–604, 2013.

KIM M.; PARK K.; LEE K.; KIM H.; KIM S.; KIM C. Cilostazol Inhibits Vascular Smooth Muscle Cell Growth by Downregulation of the Transcription Factor E2F. **Hypertension**, v. 45, p. 552-556, 2005.

KOHDA, N.; TANI, T.; NAKAYAMA, S.; ADACHI, T.; MARUKAWA, K.; ITO, R.; ISHIDA, K.; MATSUMOTO, Y.; KIMURA, Y. Effect of cilostazol, a phosphodiesterase III inhibitor, on experimental thrombosis in the porcine carotid artery. **Thrombosis Research**, v. 96, p. 261-268, 1999.

KRAUSE, S.; SCHOLZ, T.; TEMMLER, U.; LÖSCHE, W. Monitoring the effects of platelet glycoprotein IIb/IIIa antagonists with a microtiter plate method for detection of platelet aggregation. **Platelets**, v. 12, p. 423-430, 2001.

KREUTER J. Nanoparticles – a historical perspective. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 331, p. 1-10, 2007.

KUMARI, A.; YADAV, S. K.; YADAV, S. C. Biodegradable polymeric nanoparticles based drug delivery systems. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 75, p. 1-18, 2010.

LI, S. D.; HUANG, L. Pharmacokinetics and biodistribution of nanoparticles. **Molecular Pharmaceutics**, v. 5, n. 4, p. 496–504, 2008.

LINTON, MR. F.; YANCEY, P. G.; DAVIES, S. S.; JEROME, W. G.; LINTON, E. F.; SONG, W. L.; DORAN, A. C.; VICKERS, K. C. The role of lipids and lipoproteins in atherosclerosis. **Endotext**, 2019.

LU, Z.; YEH, T. K.; TSAI, M.; AU, J. L.; WJENTJES, M. G. Paclitaxel-loaded gelatin nanoparticles for intravesical bladder cancer therapy. **Clinical Cancer Research**, v. 10, p. 7677-7784, 2004.

MAHMOUD, D. B.; SHUKR, M. H.; BENDAS, E. R. *In vitro* and *in vivo* evaluation of self-nanoemulsifying drug delivery systems of cilostazol for oral and parenteral administration. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 476, n. 1–2, p. 60-69, 2014.

MALGOR, R. D.; ALAHDAB, F.; ELRAIYAH, T. A.; RIZVI, A. Z.; LANE, M. A.; PROKOP, L. J.; PHUNG, O. J.; FARAH, W.; MONTORI, V. M.; CONTE, M. S.; MURAD, M. H. A systematic review of treatment of intermittent claudication in the lower extremities. **Journal of Vascular Surgery**, v. 61, n. 3, p. 54S–73S, 2015.

MARIANI, P. D. S. C. **Estudo da biodegradação da blenda poli (ε-caprolactona)/amido modificado/proteína isolada de soja em diferentes solos: caracterização dos produtos formados e avaliação da toxicidade**. 122 f. Tese (Doutorado em Engenharia Química) – Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2010.

MARQUES, I.; LOPES, C. M.; SOUTO, E. B. **Novos Sistemas Terapêuticos Nanotecnológicos**. Revista da Faculdade de Ciências da Saúde, Porto: Edições Universidade Fernando Pessoa, p. 60-68, 2009.

MARTELLI, A. Aspectos fisiopatológicos da aterosclerose e a atividade física regular como método não farmacológico no seu controle. **Saúde e Desenvolvimento Humano**, v. 2, n.1, p.41-52, 2014.

MERU, A. V.; MITTRA, S.; THYAGARAJAN, B.; CHUGH, A. Intermittent claudication: an overview. **Atherosclerosis**, 187, p. 221–237, 2006.

MIAO, X.; SUN, C.; JIANG, T.; ZHENG, L.; WANG, T.; WANG, S. Investigation of nanosized crystalline form to improve the oral bioavailability of poorly water soluble cilostazol. **Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**, v. 14, n. 2, p. 196–214, 2011.

MOCHANE, M. J.; MOTSOENENG, T. S.; SADIKU, E. R.; MOKHENA, T. C.; SEFADI, J. S. Morphology and Properties of Electrospun PCL and Its Composites for Medical Applications: A Mini Review. **Applied Sciences**, v. 9, n. 11, 2019.

MOGHIMI, S. M.; SZEBENI, J. Stealth liposomes and long circulating nanoparticles: critical issues in pharmacokinetics, opsonization and protein-binding properties. **Progress in Lipid Research**, v. 42, p. 463-478, 2003.

MORA-HUERTAS, C. E.; FESSI, H.; ELAISSARI, A. Polymer-based nanocapsules for drug delivery. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 385, p. 113-142, 2010.

MORISHITA, R. A scientific rationale for the CREST trial results: Evidence for the mechanism of action of cilostazol in restenosis. **Atherosclerosis Supplements**, v. 6, p. 41-46, 2006.

MOSQUEIRA, V. C. F.; LEGRAND, P.; MORGAT, J-L.; VERT, M.; MYSIKINE, E.; GREF, R.; DEVISSAGUET, J-P.; BARRATT, G. Biodistribution of long-circulating Peg-grafted nanocapsules in mice: effects of Peg chain length and density. **Pharmaceutical Research**, v. 18, n. 10, p. 1411-1419, 2001.

MOTA, T. C.; SANTOS, J. D. M.; da SILVA, B. J. C.; de MESQUITA, N. M. C. B.; OLIVEIRA, D. M. Doença Arterial Obstrutiva Periférica: Revisão Integrativa. **Revista Uningá**, v. 53, n. 1, p. 120-125, 2017.

NADAL, J. M.; GOMES, M. L.; BORSATO, D. M.; ALMEIDA, M. A.; BARBOZA, F. M.; ZAWADZKI, S. F.; FARAGO, P. V.; ZANIN, S. M. Spray-dried solid dispersions containing ferulic acid: comparative analysis of three carriers, *in vitro* dissolution, antioxidant potential and *in vivo* anti-platelet effect. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, v. 42, n. 11, p. 1813–1824, 2016a.

NADAL, J. M.; GOMES, M. L. S.; BORSATO, D. M.; ALMEIDA, M. A.; BARBOZA, F. M.; ZAWADZKI, S. F.; KANUNFRE, C. C.; FARAGO, P. V.; ZANIN, S. M. W. Spray-dried Eudragit® L100 microparticles containing ferulic acid: Formulation, *in vitro* cytoprotection and *in vivo* anti-platelet effect. **Materials Science and Engineering C**, v. 64, p. 318–328, 2016b.

NAGAVARMA, B. V. N.; HEMANT, K. S. Y.; AYAZ, A.; VASUDHA, L. S.; SHIVAKUMAR, H. G. Different techniques for preparation of polymeric nanoparticles - a review. **Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research**, v. 5, n. 3, p. 16-23, 2012.

NAIR, L. S.; LAURENCIN, C. T. Biodegradable polymers as biomaterials. **Progress in Polymer Science**, v. 32, p. 762-798, 2007.

NEVES, A. R.; LÚCIO, M.; MARTINS, S.; LIMA, J. L.; REIS, S. Novel resveratrol nanodelivery systems based on lipid nanoparticles to enhance its oral bioavailability. **International Journal of Nanomedicine**, v. 8, p. 177-187, 2013.

NORGREN, L.; HIATT, W. R.; DORMANDY, J. A.; NEHLER, M. R.; HARRIS, K. A.; FOWKES, F. G. Inter-Society Consensus for the Management of Peripheral Arterial Disease (TASC II). **European Journal Vascular et Endovascular Surgery**, v. 33, p. S1-75, 2007.

NURULLAHOGLU-ATAHK, K. E.; KUTLU, S.; SOLAK, H.; KOCA, R. O. Cilostazol enhances atorvastatin-induced vasodilation of female rat aorta during aging. **Physiology International**, v.104, n. 3, p. 226-234, 2017.

OLIN, J. T.; SCHNEIDER, L. S.; KATZ, I. R.; MEYERS, B. S.; ALEXOPOULOS, G. S.; BREITNER, J. C.; BRUCE, M. L.; CAINE, E. D.; CUMMINGS, J. L.; DEVANAND, D. P.; JESTE, D. V.; KRISHNAN, K. R.; LYKETSOS, C. G.; LYNES, J. M.; RABINS, P. V.; REYNOLDS, C. F. III; ROYNER, B. W.; STEFFENS, D. C.; UNÜTZER, J.; LEBOWITZ, B. D. Provisional diagnostic criteria for depression of Alzheimer disease. **American Journal of Geriatric Psychiatry**, v. 10, p. 125-128, 2002.

OPAS. **Doenças Cardiovasculares**. Brasília, 2017. Disponível em: <https://www.paho.org/bra/index.php?option=com_content&view=article&id=5253:doencas-cardiovasculares&Itemid=1096>. Acesso em: 27 mar. 2018.

OTA, H.; ETO, M.; KANO, M. R.; OGAWA, S.; IJIMA, K.; AKISHITA, M.; OUCHI, Y. Cilostazol inhibits oxidative stress-induced premature senescence via upregulation of Sirt1 in human endothelial cells. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**, v. 28, p. 1634–1639, 2008.

OWENS, D. E.; PEPPAS, N. A. Opsonization, biodistribution, and pharmacokinetics of polymeric nanoparticles. **International Journal of Pharmaceutics**, n. 307, p. 93-102, 2006.

PANDE, R. L.; HIATT, W. R.; CREAGER, M. A. A pooled analysis of the durability and predictors of treatment response of cilostazol in patients with intermittent claudication. **Vascular medicine**, v. 15, n. 3, p. 181–188, 2010.

PARK, J-H; CHOI, H-K. Enhancement of solubility and dissolution of cilostazol by solid dispersion technique. **Archives of Pharmacal Research**, v. 38, n. 7, p. 1336–1344, 2015.

PATEL, S. G.; RAJPUT, S. J. Enhancement of oral bioavailability of cilostazol by forming its inclusion complexes. **AAPS PharmSciTech**, v. 10, n. 2, p. 660–669, 2009.

PATIL, M. P.; GAIKWAD, N. J. Characterization of gliclazide-polyethylene glycol solid dispersion and its effect on dissolution. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Science**, v. 47, n. 1, p. 161–166, 2011.

PINTO, M. R. **Osteointegração de blendas de PLDLA/PCL: estudo *in vitro* e *in vivo***. 108 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Materiais – Biomateriais) – Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2007.

PINTO REIS C.; NEUFELD R. J.; RIBEIRO A. J.; VEIGA F. Nanoencapsulation II. Biomedical applications and current status of peptide and protein nanoparticulate delivery systems. **Biology and Medicine**, v. 2, n. 2, p. 53-65, 2006.

PUND, S.; SHETE, Y.; JAGADALE, S. Multivariate analysis of physicochemical characteristics of lipid based nanoemulsifying cilostazol--quality by design. **Colloids Surfaces B: Biointerfaces**, v. 115, p. 29–36, 2014.

QUINTANAR-GUERRERO, D.; ALLÉMAN, E.; DOELKER, E.; FESSI, H. Preparation and characterization of nanocapsules from preformed polymers by a new process based on emulsification-diffusion technique. **Pharmaceutical Research**, v. 15, n. 7, p. 1056-1062, 1998.

REZWAN, K.; CHEN, Q. Z.; BLAKER, J. J.; BOCCACCINI, A. R. Biodegradable and bioactive porous polymer/inorganic composite scaffold for bone tissue engineering. **Biomaterials**, v. 27, p. 3412-3431, 2006.

ROSA, M. P.; BARONI, G. V.; PORTAL, V. L. Contribuição na prevenção da isquemia cerebral pelo cilostazol, um inibidor da fosfodiesterase III: revisão de literatura. **Jornal Vascular Brasileiro**, v. 7, n. 1, p. 49-55, 2008.

ROSS, R. Atherosclerosis – An Inflammatory Disease. **New England Journal of Medicine**, v. 340, p. 115-126, 1999.

RUFFTER, M. A. On arterial lesions found in Egyptian mummies (1580 B.C. – 525 A.D.). **Journal of Pathology and Bacteriology**, v. 15, p. 453-462, 1911.

SAKATA, S.; UCHIDA, K.; KAETSU, I.; KITA, Y. Programming control of intelligent drug releases in response to single and binary environmental stimulation signals using sensor and electroresponsive hydrogel. **Radiation Physics and Chemistry**, v. 76, p. 733-737, 2007.

SANTOS, S. S.; LORENZONI, A.; PEGORARO, N. S.; DENARDI, L. B.; ALVES, S. H.; SCHAFFAZICK, S. R.; CRUZ, L. Formulation and in vitro evaluation of coconut oil-core cationic nanocapsules intended for vaginal delivery of clotrimazole. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 116, p. 270-276, 2014.

SALMASO, S.; CALICETI, P. Stealth Properties to Improve Therapeutic Efficacy of Drug Nanocarriers. **Journal of Drug Delivery**, 2013.

SALTZMAN, W. **Drug Delivery – Engineering principles for drug therapy**. Oxford: University Press, 384 p., 2001.

SCHAFFAZICK, S. R.; GUTERRES, S. S.; FREITAS, L. L.; POHLMANN, A. R. Caracterização e estabilidade físico-química de sistemas poliméricos nanoparticulados para administração de fármacos. **Química Nova**, v. 26, n. 5, p. 726-737, 2003.

SCHRÖR, K. Aspirin and platelets: the antiplatelet action of aspirin and its role in thrombosis treatment and prophylaxis. **Seminars in Thrombosis and Hemostasis**, v. 23, n. 4, p. 349-356, 1997.

SHI, S-J.; LI, Z-F.; CHEN, H-T.; ZENG, F-D. Cardiovascular effects and simultaneous pharmacokinetic and pharmacodynamic modeling of cilostazol in healthy subjects. **Asian Journal of Drug Metabolism and Pharmacokinetics**, v. 5, n. 4, p. 301- 308, 2005.

SHIMIZU, T.; OSUMI, T.; NIIMI, K.; NAKAGAWA, K. Physico-chemical properties and stability of cilostazol. **Arzneimittelforschung**, v. 35, n. 7A, p. 1117-1123, 1985.

SIEPMANN, J.; PEPPAS, N. A. Modeling of drug release from delivery systems based on hydroxypropyl methylcellulose (HPMC). **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 48, n. 2-3, p. 139-157, 2001.

SIQUEIRA, D. D.; LUNA, C.; MORAIS, D.; ARAÚJO, D.; FRANÇA, D.; WELLEN, R. Efeito das variáveis reacionais na síntese de um polímero biodegradável funcionalizado: PCL-g-MA. **Revista Matéria**, v. 23, n. 04, 2018.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE CARDIOLOGIA. V Diretriz Brasileira de Dislipidemia e Prevenção de Aterosclerose. **Arquivo Brasileiro de Cardiologia**, v. 109, n. 2, supl. 1, p. 1-22, 2017.

SOLOMÃO, Z. **Desenvolvimento e caracterização de compósitos de poli(épsilon-caprolactona) (pcl) e beta-fosfato tricálcico (beta-tcp) para uso em biomateriais**. 71 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Mecânica) – Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2011.

SOPPIMATH, K. S.; AMINABHAVI, T. M.; KULKARNI, A. R.; RUDZINSKI, W. E. Biodegradable polymeric nanoparticles as drug delivery devices. **Journal of Controlled Release**, v. 70, p. 1-20, 2001.

SOUTO, E. B.; SEVERINO, P.; SANTANA, M. H. A. Preparação de nanopartículas poliméricas a partir de polímeros pré-formados – parte II. **Polímeros**, v. 22, n. 1, p. 101-106, 2012.

SPOSITO, A. C.; CARAMELLI, B.; FONSECA, F. A. H.; BERTOLAMI, M. C. IV Diretriz brasileira sobre dislipidemias e prevenção da aterosclerose: Departamento de Aterosclerose da Sociedade Brasileira de Cardiologia. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 88, s. 1, p. 2-19, 2007.

STEINHUBL, S. R.; BERGER, P. B.; MANN, J. T. III; FRY, E.T.A.; DELAGO, A.; WILMER, C.; TOPOL, E. J. Early and sustained dual oral antiplatelet therapy following percutaneous coronary intervention: a randomized controlled trial. **JAMA**, v. 288, n. 19, p. 2411–2420, 2002.

STEINL, D. C.; KAUFAMANN, B. A. Ultrasound imaging for risk assessment in atherosclerosis. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 16, n. 5, p. 9749-9760, 2015.

STORCH, A. S. Methods of Endothelial Function Assessment: Description and Applications. **International Journal of Cardiovascular Sciences**, v. 30, n. 3, p. 262-273, 2017.

STORM, G.; BELLLOT, S. O.; DAEMEN, T.; LASIC, D. D. Surface modification of nanoparticles to oppose uptake by the mononuclear phagocyte system. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 17, p. 31-48, 1995.

STULZER, H. K.; TANGLIARI, M. P.; PARIZE, A. L.; SILVA, M. A. S.; LARANJEIRA, M. C. M. Evaluation of cross-linked chitosan microparticles containing acyclovir obtained by spray-drying. **Materials science and engineering: C**, v. 29, n. 2, p. 387-392, 2009.

SUK, J. S.; XU, Q.; KIM, N.; HANES, J.; ENSIGN, L. M. PEGylation as a strategy for improving nanoparticle-based drug and gene delivery. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 99, p. 28-51, 2016.

TABAGI, T.; HARA H. Protective effects of cilostazol against hemorrhagic stroke: Current and future perspectives. **Journal of Pharmacological Sciences**, v. 131, p. 155-161, 2016.

TAN, L.; MARGARET, B.; ZHANG, J. H.; HU, R.; YIN, Y.; CAO, L.; FENG, H.; ZHANG, Y. Efficacy and safety of cilostazol therapy in ischemic stroke: a meta-analysis. **Journal of Stroke and Cerebrovascular Diseases**, v. 24, n. 5, p. 930-938, 2015.

TANI, T.; UEHARA, K.; SUDO, T.; MARUKAWA, K.; YASUDA, Y.; KIMURA, Y. Cilostazol, a selective type III phosphodiesterase inhibitor, decreases triglyceride and increases HDL cholesterol levels by increasing lipoprotein lipase activity in rats. **Atherosclerosis**, v. 152, p. 299-305, 2000.

TAO, S.L.; DESAI, T.A. Microfabricated drug delivery systems: from particles to pores. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 55, p. 315-328, 2003.

TORRENT, D. J.; MANESS, M. R.; CAPPS, T. C.; SEARS, S. F.; WHITED, A. L.; YAMAGUCHI, D. J.; PARKER, F. M.; STONER, M. C. Impact of psychological factors on objective ambulatory measures in patients with intermittent claudication. **Journal of Vascular Surgery**, v. 60, n. 3, p. 708-714, 2014.

TRAN, V-T; BENOÎT, J-P.; VENIER-JULIENNE, M-C. Why and how to prepare biodegradable, monodispersed, polymeric microparticles in the field of pharmacy?. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 407, n. 1-2, p. 1-11, 2011.

VAUTHIER, C.; BOUCHEMAL, K. Methods for the preparation and manufacture of polymeric nanoparticles. **Pharmaceutical Research**, v. 26, n. 5, p. 1025-1058, 2009.

VELOSO, A. B.; LONGO, J. P. F.; MUEHLMANN, L. A.; TOLLSTADIUS, B. F.; SOUZA, P. E. N.; AZEVEDO, R. B.; MORAIS, P. C.; da SILVA, S. W. SERS Investigation of Cancer Cells Treated with PDT: Quantification of Cell Survival and Follow-up. **Scientific Reports**, v. 7, p. 7175-7175, 2017.

VERMA, R.K.; GARG, S. Current status of drug delivery technologies and future directions. **Pharmaceutical Technology**, v. 25, n. 2, p. 1-4, 2001.

VERMA, S.; RUDRARAJU, V. S. Disintegration mediated controlled release supersaturating solid dispersion formulation of an insoluble drug: design, development, optimization, and *in vitro* evaluation. **AAPS PharmSciTech**, v. 16, n. 1, p. 85–97, 2015.

YOSHIOKA, C.; ITO, Y.; NAGAI N. Na oral formulation of cilostazol nanoparticles enhances intestinal drug absorption in rats. **Experimental and Therapeutic Medicine**, v. 15, n. 1, p. 454-460, 2017.

WAHLICH, J.; DESAI, A.; GRECO, F.; HILL, K.; JONES, A. T.; MRSNY, R. J.; PASUT, G.; PERRIE, Y.; SEIB, F. P.; SEYMOUR, L. W.; UCHEGBU, I. F. Nanomedicines for the delivery of biologics. **Pharmaceutics**, [s. l.], v. 11, n. 5, p. 1–14, 2019.

WARNER, C. J.; GREAVES, S. W.; LARSON, R. J.; STONE, D. H.; POWELL, R. J.; WALSH, D. B.; GOODNEY, P. P. Cilostazol is associated with improved outcomes after peripheral endovascular interventions. **Journal of Vascular Surgery**, v. 59, p. 1607-1614, 2014.

WATTANAKIT, K.; FOLSOM, A.R.; SELVIN, E.; WEATHERLEY, B.D.; PANKOW, J.S.; BRANCATI, F.L.; HIRSCH, A.T. Risk factors for peripheral arterial disease incidence in persons with diabetes: the Atherosclerosis Risk in Communities (ARIC) Study. **Atherosclerosis**, v. 180, n. 2, p. 389–397, 2005.

WESSLER, K.; NISHIDA, M. H.; da SILVA JR., J.; PEZZIN, A. P. T.; PEZZIN, S. H. Thermal properties and morphology of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) with poly(caprolactone triol) mixtures. **Macromolecular Symposia**, v. 245, p. 161-165, 2006.

WU, C-Y; BENET, L. Z. Predicting drug disposition via application of BCS: transport/absorption/ elimination interplay and development of a biopharmaceutics drug disposition classification system. **Pharmaceutical Research**, v. 22, n. 1, p. 11–23, 2005.

**APÊNDICE 1 – MANUSCRITO 1: A simple RP-HPLC/UV method for
determination of cilostazol in polymeric nanoparticles
suspensions: development and validation**

Artigo publicado no periódico *Latin American Journal of Pharmacy*

Volume 34, p.803 - 809, 2015.

DOI: 10.1590/s2175-97902017000215250

GOMES, MONA LISA SIMIONATTO; KLEIN, TRAUDI; SIMIONATTO, MACKELLY;
NADAL, JÉSSICA MENDES; ZANIN, SANDRA MARIA WARUMBY; BORSATO,
DÉBORA MARIA; FARAGO, PAULO VITOR



A Simple RP-HPLC/UV Method for Determination of Cilostazol in Polymeric Nanoparticles Suspensions: Development and Validation

Mona L.S. GOMES¹, Traudi KLEIN¹, Mackelly SIMIONATTO², Jessica M. NADAL^{1,3},
Sandra M.W. ZANIN³, Débora M. BORSATO¹ & Paulo V. FARAGO^{1*}

¹ Department of Pharmaceutical Sciences, ² Department of Clinical and Toxicological Analyses,
State University of Ponta Grossa, 4748, General Carlos Cavalcanti Ave.,
Zip Code 84030-900, Uvaranas, Ponta Grossa, Paraná, Brazil

³ Department of Pharmacy, Federal University of Paraná, 652, Lothário Meissner Ave.,
Zip Code 80210-170, Jardim Botânico, Curitiba, Paraná, Brazil

SUMMARY. A simple and effective RP-HPLC/UV method was validated for the determination of cilostazol (CIL) in polymeric nanoparticles suspensions. Chromatographic conditions consisted of a RP C₁₈ column and a guard cartridge system using isocratic mobile phase of acetonitrile and water (47:53, v/v) at flow rate of 1.0 mL/min with UV detection at 254 nm. The developed method was validated by determining its performance characteristics regarding specificity, linearity, limit of detection, limit of quantification, precision, accuracy, and robustness. The method was specific, linear ($r = 0.9989$) in a range of 10.0 to 70.0 µg/mL with limits of detection and quantification of 0.41 and 1.23 µg/mL, respectively. Precision was demonstrated by a relative standard deviation lower than 0.7%. Suitable accuracy ($100.81 \pm 0.97\%$) was achieved. The method proved to be simple, rapid, robust and adequate for quantifying CIL in polymeric nanoparticles suspensions and can be used to evaluate the drug encapsulation efficiency.

RESUMEN. Un método de RP-HPLC/UV simple y eficaz fue validado para la determinación de cilostazol (CIL) en suspensiones de nanopartículas poliméricas. Las condiciones cromatográficas consistieron en una columna C₁₈ RP y un sistema de cartucho protector usando una fase móvil isocrática de acetonitrilo y agua (47:53, v/v) a un caudal de 1,0 mL/min con detección UV a 254 nm. El método desarrollado se validó mediante la determinación de sus características de rendimiento con respecto a la especificidad, linealidad, límite de detección, límite de cuantificación, precisión, exactitud y robustez. El método resultó específico, lineal ($r = 0.9989$) en una gama de 10,0 a 70,0 µg/mL con límites de detección y cuantificación de 0,41 y 1,23 µg/mL, respectivamente. La precisión se demuestra por una desviación estándar relativa inferior al 0,7%. Se logró la precisión adecuada ($100,81 \pm 0,97\%$). El método demostró ser simple, rápido, robusto y adecuado para la cuantificación de CIL en suspensiones de nanopartículas poliméricas y se puede utilizar para evaluar la eficacia de encapsulación del fármaco.

INTRODUCTION

Cilostazol (CIL), 6-[4-(1-cyclohexyl-1H-tetrazol-5-yl) butoxy]-3,4-dihydro-2(1H)-quinolinone (Fig. 1), is a white crystalline powder slightly soluble in methanol and ethanol and practically insoluble in water, 0.1 mol/L HCl and 0.1 mol/L NaOH¹. It has a molecular weight of 369.46 g.mol⁻¹, melting range between 150.4 – 160.3 °C and log *P* of 3.048².

This quinolone derivative (2-oxo-quinolone) inhibits phosphodiesterase (PDE) III and suppresses the degradation of cyclic adenosine monophosphate (cAMP) in platelets and blood vessels³. Due these cell mechanisms, it is a

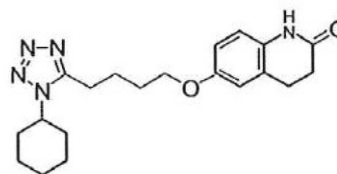


Figure 1. Chemical structure of cilostazol.

platelet aggregation inhibitor which also provides dilation of blood vessels. In that sense, CIL is the drug of choice for the treatment of intermittent claudication, a common disease of peripheral arterial blood vessels which is related

KEY WORDS: analytical validation, controlled release, encapsulation efficiency, poly(ε-caprolactone), poly(D,L-lactic-co-glycolic acid).

* Author to whom correspondence should be addressed: E-mail: pvfarago@gmail.com

to atherosclerosis and occurs in the lower limbs⁴. The narrowing or blockage in the main artery vessels that supply blood to the legs makes the intermittent claudication a very painful condition characterized by different symptoms as discomfort, numbness, paresthesia, cramp or fatigue of the leg muscles during walking which are relieved after a few min of rest⁵.

CIL has been approved by the Food and Drug Administration (FDA) for the management of intermittent claudication⁶ at a usual oral dose of 100 mg twice a day. The most frequent adverse effects include headache, tachycardia, palpitation, diarrhea and soft stools⁷.

In addition, this drug belongs to class II of the biopharmaceutics classification system (BCS) showing low solubility and high permeability in gastrointestinal (GI) tract^{8,9}. For this group, the low drug solubility can affect the rate and extent of absorption which can reduce the bioavailability¹⁰. In that sense, dosage form development plays an important role in achieving the desired oral absorption of a drug as cilostazol because the dissolution profiles usually determines the rate and total amount of drug absorption for BCS class II compounds. An innovative approach for correcting this inconvenient is the use of modified release dosage forms in which the drug is delivered at a controlled rate and/or to a certain region of the GI tract to accomplish therapeutic or convenience objectives¹¹.

In order to improve the solubility and absorption of CIL in GI tract and to minimize its drawbacks in pharmacotherapy, polymeric nanoparticles suspensions containing CIL were prepared. The use of these nanocarriers can offer numerous advantages when compared to conventional pharmaceutical forms. Such systems are useful to enhance drug solubility, extend drug release through GI tract, increase drug absorption, reduce undesirable side effects and decrease the amount of drug administered¹².

However, it is essential to determine the drug content in these pharmaceutical preparations at the same time. The literature reports some previous papers devoted to develop chromatographic methods for quantifying CIL in some dosage forms^{13,14} and human serum¹⁵. However, these methods are not suitable for determining CIL in polymeric nanoparticles suspensions which remains as an analytical challenge to be overcome.

Taking all the above into account, in the current paper, a fast, simple and optimized reverse-phase HPLC method with UV detection was de-

veloped and validated for quantifying CIL in polymeric nanoparticles suspensions intended to be used for calculating the drug encapsulation efficiency.

MATERIAL AND METHODS

Chemicals and reagents

Cilostazol 100.10% purity (CIL, IPCA Laboratories Limited, Mumbai, India), poly(ϵ -caprolactone) (PCL, M_w = 10000-14000 g/mol, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), poly(D,L-lactic-co-glycolic acid) (PLGA, M_w = 76000-115000 g/mol, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), and poly(ethylene glycol) (PEG, M_w = 5400-6600 g/mol, Cromato Produtos Químicos, Diadema, Brazil) were used as received. Span 80® (sorbitan monooleate) was purchased from Sigma Aldrich (St. Louis, MO, USA) and Tween 80® (polysorbate 80) was supplied by Deleware (Porto Alegre, Brazil). Capric/caprylic acid triglycerides were obtained from Focus Química (São Paulo, Brazil) and acetone was acquired from Vetec (Rio de Janeiro, Brazil). HPLC-grade acetonitrile and HPLC-grade methanol were provided by Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). Water was purified in a Milli-Q Plus water purification system (Millipore, Bedford, MA, USA). All others reagents and solvents were of analytical grade.

Apparatus and chromatographic conditions

High performance liquid chromatography (HPLC) analyses were performed using a Merck-Hitachi Lachrom (Tokyo, Japan) system equipped with an Interface D-7000, a UV detector module L-74000, a quaternary pump L-7100 and an integral degasser. The chromatography software platform was ChromQuest 5.0 (Thermo Fisher Scientific, San Jose, CA, USA). A manual injector (Rheodyne) system equipped with a 20 μ L injector loop and a 100 μ L syringe (Hamilton, Microliter 710) was used.

Chromatographic separation was accomplished using a GL Sciences Inertsil® ODS3 (Torrance, CA, USA) reversed phase analytical column (150 mm $\times$ 4.6 mm, 5 μ m) and a GL Sciences Inertsil® ODS3 guard cartridge system (10 mm $\times$ 4 mm, 5 μ m) at room temperature. The isocratic mobile phase consisted of acetonitrile and water (47:53, v/v) at a flow rate of 1.0 mL/min. The detection was performed at 254 nm.

Preparation of standard solutions

A stock standard solution (500 μ g/mL) was daily prepared by dissolving 25 mg of CIL into a

50 mL volumetric flask using acetonitrile. This solution was further diluted in mobile phase to prepare seven different working standard solutions ranging from 10.0 to 70.0 µg/mL. These solutions were filtered through a polytetrafluoroethylene (PTFE) membrane filter (Cromafil® Xtra, 0.45 µm × 25 mm, Macherey-Nagel, Düren, Germany) before injection into the HPLC system.

Preparation of polymeric nanoparticles suspensions

CIL-loaded nanoparticles suspensions were obtained using PCL, PLGA and blends of PCL-PEG and PLGA-PEG. These formulations were prepared by interfacial deposition of preformed polymer method as described by Fessi *et al.*¹⁶. A solution of PCL, PLGA, PCL-PEG or PLGA-PEG (0.100 g), CIL (0.010, 0.020, and 0.030 g), medium chain triglycerides (0.300 g) and Span 80® (0.077 g) in acetone (27 mL) was added into an aqueous solution (53 mL) of Tween 80® (0.077 g) under magnetic stirring at 40 °C. After 60 min, the acetone was removed and the aqueous phase was concentrated under reduced pressure. The final volume was adjusted to 10 mL and CIL concentration of 1.0 mg/mL (NC1) 2.0 mg/mL (NC2), and 3.0 mg/mL (NC3). Formulations were also prepared omitting the drug (NC0), as negative control. All polymeric nanoparticles suspensions were obtained in triplicate. In order to perform the HPLC analyses, the polymeric nanoparticles suspensions were submitted to ultrafiltration/centrifugation procedure (Hitachi, model Himac CR21GII, Tokyo, Japan) at 2200 × g for 30 min in an Amicon® Ultra-0.5 mL 10K device (Millipore, Bedford, MA, USA). Before injection, each sample was filtered through a 0.45 µm PTFE membrane filter.

Method development

Detection wavelength for the HPLC study was selected as 254 nm. The chromatographic conditions were optimized for resolution of the peak of CIL by varying the composition and proportion of the mobile phase. Samples of different formulations were used to optimize the chromatographic conditions for resolving CIL. An appropriate negative control was injected before the analysis of all samples. The method was then validated and used for the determination of CIL in nanoparticles suspensions.

Method validation

For validation of the analytical method, the

guidelines established by the ICH (International Conference on the Harmonization of Technical Requirements for the Registration of Pharmaceuticals for Human Use) and Brazilian regulation RE 899/2003 of the National Health Surveillance Agency (ANVISA) were employed^{17,18}.

Specificity

The specificity was determined by analyzing the chromatograms of unloaded nanoparticles suspensions (negative control) in comparison with those obtained for formulations containing CIL aiming at confirming that none of the related polymers (PCL, PLGA, and PEG) can interfere with the quantitation of the drug.

Linearity

Linearity was determined by the calibration curve obtained from the HPLC analysis of the standard solutions of CIL. The range (interval between the upper and lower concentrations of analyte in the sample) of the appropriate amount of samples was determined. The slope and other statistics of the calibration curves were calculated by linear regression and analysis of variance (ANOVA). Evaluation of each point was conducted in three replicates.

Limit of detection and limit of quantification

The limit of detection (LOD) and limit of quantification (LOQ) were calculated based on the standard deviation of the response (δ) and the slope (S) of the calibration curve and were expressed as $3.3 \delta/S$ and $10 \delta/S$ for LOD and LOQ, respectively.

Precision

Precision of the method was determined following ICH requirements¹⁷. Precision was evaluated at two levels: repeatability and intermediate precision. The standard deviation (SD) and relative standard deviation (RSD) of six injections at 100% of the test concentration (20 µg/mL) were evaluated and analyzed intra-day and inter-day and with different analyst.

Accuracy

Accuracy was performed using nine determinations at three concentration levels: low, intermediate and high (20.0, 35.0, and 50.0 µg/mL) in triplicate. The value of the average concentration was compared to the theoretical value (100%).

Robustness

The robustness was determined after variations in flow rate (0.995 and 1.005 mL/min) and mobile phase composition (acetonitrile:water 48:52 and 46:54, v/v). One-way ANOVA with *post hoc* Tukey test was performed to evaluate whether these parameters changed the result of the HPLC analyses.

Evaluation of encapsulation efficiency

For CIL quantification, the amount of drug into nanoparticles was determined indirectly after ultrafiltration/centrifugation procedure at $2200 \times g$ for 30 min in an Amicon® Ultra-0.5 mL 10K device. The encapsulation efficiency (EE) of CIL into nanoparticles was calculated using Eq. [1] from the HPLC results provided after sample injections, in triplicate.

$$EE(\%) = \frac{\text{total drug content} - \text{free drug content}}{\text{total drug content}} \times 100 \quad [1]$$

RESULTS AND DISCUSSION

Method Development

During the development of the HPLC method for quantifying the CIL present in nanoparticles were tested different mobile phase using methanol:water and acetonitrile:water, in

accordance with the procedures described in the literature¹³⁻¹⁵. Various gradient systems and analysis times were tested, as well as various proportions in isocratic mode. The best result was obtained with a mobile phase of acetonitrile: water (47:53, v/v) and flow rate of 1.0 mL/min. The analysis time and retention time were 10 and 6.33 min, respectively, which is very suitable for routine analyses.

Method validation

The proposed method was validated by determining its performance characteristics regarding specificity, linearity, limit of detection, limit of quantification, precision, accuracy, and robustness.

Specificity was demonstrated by comparing the chromatograms of unloaded and CIL-loaded nanoparticles prepared as per test method. The results showed that there was no interference at the retention time of CIL from the other formulation components. In that sense, it is possible to confirm the specificity of the proposed method (Fig. 2).

The linearity of the HPLC method at five concentration levels was investigated. The results are presented in Table 1.

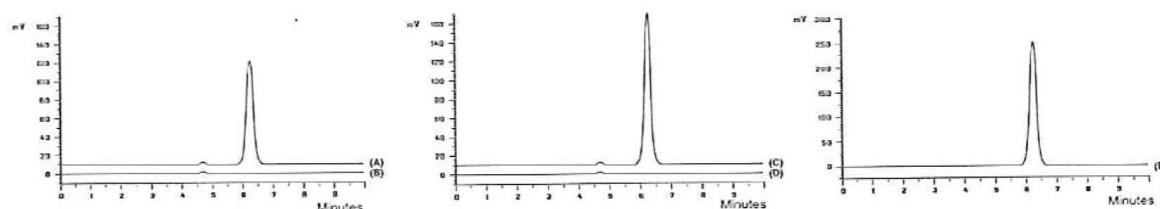


Figure 2. Representative HPLC chromatograms obtained from unloaded and cilostazol-loaded nanoparticles: NC1-PCL/PEG (A), NC0-PCL/PEG (B), NC3-PLGA/PEG (C), NC0-PLGA/PEG (D), and from a standard CIL solution at 70.0 µg/mL (E). Mobile phase: acetonitrile:water (47:53, v/v); flow rate: 1.0 mL/min; detection wavelength: 254 nm; column temperature: ambient and injection volume: 20 µL.

Parameter		Cilostazol
Linear range (µg/mL)		10.0-70.0
Detection limit (µg/mL)		0.41
Quantification limit (µg/mL)		1.23
Regression data*	N	3
	Slope (a)	44301
	Standard deviation of slope	5453.33
	Relative standard deviation of slope (%)	0.82
	Intercept (b)	-10973
Correlation coefficient (r)		0.9989

Table 1. Curve parameter summary and back-calculation calibration curve concentrations for cilostazol. * $y = ax + b$, where x is the concentration of the compound and y is the peak area.

A linear relationship between peak area and concentration of CIL at the concentration range of 10.0 to 70.0 µg/mL was observed. The linear equation obtained by the least-square method was $y = 44301x - 10973$, where y is the peak area and x is the standard solution concentration in µg/mL. A suitable correlation coefficient ($r = 0.9989$) was recorded which demonstrates that the method is linear with an r value of nearly 1 at the purposed range. The RSD% of the slope was 0.82%. This value is within the limit set by ICH and ANVISA, which is up to 5%. The negative b value (-10973) was in the 95% confidence interval of the calibration curve by the ANOVA test. These results (RSD% and negative b value) indicate that the reproducibility of the method and compound purity are within acceptable limits.

According to the Analytical Methods Committee (AMC), a value of regression coefficient close to unity is not necessarily the outcome of a linear relationship, and in consequence the test for the lack of fit should be applied. This test evaluates the variance of the residual values¹⁹. The ANOVA for CIL linearity is presented in Table 2. The F value for lack of fit was smaller than the tabulated F value for the 95% confidence level ($\alpha = 0.05$), and therefore, according to the ANOVA test, the linear regression showed no lack of fit.

The lowest concentration where CIL can be detected (LOD) and quantified (LOQ) with acceptable precision and accuracy was 0.41 and 1.23 µg/mL, respectively.

Repeatability expresses the precision under the same operating conditions over a short interval of time while intermediate precision represents inter-day variations and with different analysts. These parameters were evaluated and the results are shown in Table 3. The relative standard deviation (RSD) values were 0.69, 0.60, and 0.31% for intra-day, inter-day and for the second analyst, respectively. These results confirm the precision of the developed method within the performed conditions.

Accuracy was evaluated using nine determinations at three concentration levels (20.0, 35.0 and 50.0 µg/mL). The percentage obtained (Table 4) was found to be in the range of 99.94 ± 0.11 and $101.86 \pm 0.29\%$. Thus, these values indicate that the proposed method was considered accurate.

The robustness should be evaluated during the development of the chromatographic method, and it should demonstrate the reliability of analysis to deliberate variations in particular parameters of the method¹⁷. The Tukey test evaluates whether a difference exists among the different levels of a factor. At a 5% level, there were no significant difference in the area of the

	SS	df	MS	F	F _{tab}
Model	1.3247 x 10 ¹³	1	1.3247 x 10 ¹³	6609.851	4.67
Residual	2.6054 x 10 ¹⁰	13	2.0042 x 10 ⁹	Linear	—
Lack of fit	1.3222 x 10 ¹⁰	3	4.4074 x 10 ⁹	3.434774	3.71
Pure error	1.2832 x 10 ¹⁰	10	1.2832 x 10 ⁹	No lack of fit	—

Table 2. ANOVA results for linearity of method (SS: sums of squares; df: degrees of freedom; MS: mean squares; F : F value of the test; F_{tab} : fixed F value).

	Theoretical amount (µg/mL)	Experimental amount (µg/mL, Mean ± SD*)	RSD** (%)
Repeatability (n = 6)	20.0	19.80 ± 0.14	0.69
Intermediate precision			
Day 1 (n = 3)	20.0	19.80 ± 0.09	0.46
Day 2 (n = 3)	20.0	19.78 ± 0.12	0.63
Day 3 (n = 3)	20.0	19.63 ± 0.15	0.70
Mean ± SD* (n = 9)		19.74 ± 0.12	0.60
Different analyst (n = 3)	20.0	19.16 ± 0.06	0.31

Table 3. Repeatability and intermediate precision data for cilostazol analysis. *SD = standard deviation; **RSD = relative standard deviation.

GOMES M.L.S., KLEIN T., SIMIONATTO M., NADAL J.M., ZANIN S.M.W., BORSATO D.M. & FARAGO P.V.

Levels of concentration	Cilostazol (µg/mL)	% ± SD*	RSD** (%)
Low	20.0	100.62 ± 0.42	2.10
Medium	35.0	101.86 ± 0.29	0.82
High	50.0	99.94 ± 0.11	0.23

Table 4. Accuracy assays for cilostazol analysis (n = 3). *SD = standard deviation; **RSD = relative standard deviation.

Formulations	Theoretical concentration (µg/mL)	Cilostazol-loaded (µg/mL)	EE (%)
NC1-PCL*	1000.0	997.05 (± 0.22)	99.70 (± 0.02)
NC2-PCL*	2000.0	1996.28 (± 0.16)	99.81 (± 0.01)
NC3-PCL*	3000.0	2996.17 (± 0.16)	99.87 (± 0.01)
NC1-PCL/PEG**	1000.0	995.17 (± 0.15)	99.60 (± 0.01)
NC2-PCL/PEG**	2000.0	1995.86 (± 0.15)	99.79 (± 0.01)
NC3-PCL/PEG**	3000.0	2996.16 (± 0.10)	99.87 (± 0.01)
NC1-PLGA***	1000.0	997.15 (± 0.08)	99.71 (± 0.01)
NC2-PLGA***	2000.0	1996.07 (± 0.07)	99.80 (± 0.01)
NC3-PLGA***	3000.0	2996.33 (± 0.17)	99.88 (± 0.01)
NC1-PLGA/PEG****	1000.0	997.01 (± 0.04)	99.70 (± 0.01)
NC2-PLGA/PEG****	2000.0	1997.17 (± 0.25)	99.86 (± 0.01)
NC3-PLGA/PEG****	3000.0	2997.31 (± 0.05)	99.91 (± 0.01)

Table 5. Cilostazol-loaded and encapsulation efficiency (EE) for polymeric nanoparticles (n=3, mean ± standard deviation). *poly(ε-caprolactone) nanoparticles suspensions; **poly(ε-caprolactone) with poly(ethylene glycol) nanoparticles suspensions; ***poly(D,L-lactic-co-glycolic acid) nanoparticles suspensions; ****poly(D,L-lactic-co-glycolic acid) with poly(ethylene glycol) nanoparticles suspensions.

curve and retention time of CIL when the flow rate of mobile phase was changed from 1.000 to 0.995 mL/min (RSD = 1.08%) and 1.005 mL/min (RSD = 1.02%). In addition, no statistically significant difference was verified when mobile phase composition was changed from 47:53 v/v to 48:52 v/v (RSD = 0.53%) and 46:54 v/v (RSD = 0.61). Therefore, the method proved to be robust for the drug analysis, under the evaluated conditions.

Evaluation of encapsulation efficiency

The CIL content and encapsulation efficiency (EE) in polymeric nanoparticles suspensions were carried out by the previously validated method and the obtained results are represented in Table 5. The formulations showed drug content very close to the theoretical values and suitable EE values higher than 99% with a low RSD value from the triplicate analysis. These values are mainly based on the poor aqueous solubility (3.0 µg/mL at 25 °C) of CIL² which leads to increase the drug loaded into polymeric nanoparticles. Thus, the validated method was successfully applied to the determination of the encapsulation efficiency of CIL from polymeric nanoparticles suspensions.

CONCLUSION

A simple and efficient reversed-phase HPLC/UV method was developed and validated according to the ICH guidelines and Brazilian regulations. In this study, the method proved to be simple, sensitive, accurate, linear, precise, specific and robust. These results confirm that the method can be a suitable technique to quantify CIL in nanoparticles suspensions encouraging its application for quality control. Furthermore, the method involves the use of a simple mobile phase without buffer solution and minimum sample preparation.

Acknowledgements. The authors are grateful to CAPES, CNPq and Fundação Araucária for financial support.

REFERENCES

1. Shi S., Z. Li, H. Chen & F. Zeng (2005) *Asian J. Drug Metab. Pharmacokin.* 5: 301-8.
2. Shimizu T., T. Osumi & K. Nakagawa (1985) *Arzneimittel-Forsch.* 35: 1117-23.
3. Craig M.P. (2001) *Am. J. Cardiol.* 87: 28-33.
4. Hong H. & W.C. Mackey (2014) *Clin. Ther.* 36: 1290-301.
5. Olin J.T., L. S. Schneider, I.R. Kats, B.S. Meyers,

- G.S. Alexopoulos & J. C. Breitner (2002) *Am. J. Geriatr. Psychiat.* **10**: 125-8.
6. Jacoby D. & E.R. Mohler (2004) *Drugs* **64**: 1657-70.
 7. Rosa M.P., G.V. Baroni & V.L. Portal (2006) *Arq. Bras. Cardiol.* **87**: 222-6.
 8. Wu C.Y. & L.Z. Benet (2005) *Pharm. Res.* **22**: 11-23.
 9. Chen Y-C., H-O. Ho, J-D. Chiou & M-T. Sheu (2014) *Int. J. Pharm.* **473**: 458-68.
 10. He X. (2009) *Integration of physical, chemical, mechanical, and biopharmaceutical properties in solid oral dosage form development*, in "Developing solid oral dosage forms: pharmaceutical theory & practice" (Y. Qiu, Y. Chen, G.G.Z. Zhang, eds.), Elsevier, New York, pp. 423-30.
 11. Zhou D. & Y. Qiu (2009) *J. Valid. Technol.* **15**: 62-72.
 12. Schaffazick S.R., S.S. Guterres, L.L. Freitas & A.R. Pohlmann (2003) *Quim. Nova* **26**: 726-37.
 13. Uma Devi S., M. Lohita, V. Amrutha, P. Ramalingam & K.Vinod Kumar (2012) *J. Pharm. Res.* **5**: 5397-400.
 14. Fayed A.S., M.A. Shehata, A. Ashour, N.Y. Hassan, & S.A. Weshahy (2007) *J. Pharmaceut. Biomed.* **45**: 407-16.
 15. Joti J., M. Haqu, S. Islam & M. Islam (2011) *Indian J. Novel Drug Deliv.* **3**: 143-8.
 16. Fessi H., F. Puisieux, J-Ph. Devissaguet, N. Ammoury & S. Benita (1989) *Int. J. Pharm.* **55**: R1-4.
 17. International Conference on Harmonization (ICH) of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use (2005) *Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology*, ICH Steering Committee: Geneva. Available at <http://www.ich.org/fileadmin/Public_Web_Site/ICH_Products/Guidelines/Quality/Q2_R1/Step4/Q2_R1_Guideline.pdf>.
 18. Brazil, Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA (2003) *Guide for Validation of Analytical and Bioanalytical Methods*. Resolution RE nº 899, May 29, 2003. Available at <http://www.anvisa.gov.br/hotsite/genericos/legis/resolucoes/2003/899_03re_e.pdf>.
 19. Hadad G., S. Emara & W.M.M. Mahmoud (2009) *Talanta* **79**: 1360-7.

APÊNDICE 2 – MANUSCRITO 2: Long-lasting anti-platelet activity of cilostazol from poly(epsilon-caprolactone)-poly(ethylene glycol) blend nanocapsules.

Artigo publicado no periódico ***Materials Science & Engineering C - Materials for Biological Applications***

Volume 94, p.694 - 702, 2019.

<https://doi.org/10.1016/j.msec.2018.10.029>.

GOMES, MONA LISA SIMIONATTO; DA SILVA NASCIMENTO, NÚBIA; BORSATO, DÉBORA MARIA; PRETES, ANA PAULA; NADAL, JESSICA MENDES; NOVATSKI, ANDRESSA; GOMES, RICARDO ZANETTI; FERNANDES, DANIEL; FARAGO, PAULO VITOR; ZANIN, SANDRA MARIA WARUMBY



Long-lasting anti-platelet activity of cilostazol from poly(ϵ -caprolactone)-poly(ethylene glycol) blend nanocapsules

Mona Lisa Simionatto Gomes^a, Núbia da Silva Nascimento^b, Débora Maria Borsato^c, Ana Paula Pretes^c, Jessica Mendes Nadal^c, Andressa Novatski^b, Ricardo Zanetti Gomes^b, Daniel Fernandes^c, Paulo Vitor Farago^{b,c,*}, Sandra Maria Warumby Zanin^a

^a Department of Pharmacy, Postgraduate Program in Pharmaceutical Sciences, Federal University of Paraná, Curitiba, Brazil

^b Department of Medicine, Postgraduate Program in Health Sciences, State University of Ponta Grossa, Ponta Grossa, Brazil

^c Department of Pharmaceutical Sciences, Postgraduate Program in Pharmaceutical Sciences, State University of Ponta Grossa, Ponta Grossa, Brazil

ARTICLE INFO

Keywords:

Controlled release
Intermittent claudication
Phosphodiesterase inhibitor
Platelet aggregation
Polymeric nanoparticles

ABSTRACT

Cilostazol (CLZ) acts as a vasodilator and antiplatelet agent and is the main drug for the treatment of intermittent claudication (IC) related to peripheral arterial disease (PAD). The usual oral dose is 100 mg twice a day, which represents a disadvantage in treatment compliance. CLZ presents several side effects, such as headache, runny nose, and dizziness. This paper aimed to obtain novel polymeric nanocapsules prepared from poly(ϵ -caprolactone)-poly(ethylene glycol) (PCL-PEG) blend containing CLZ. Nanocapsules showed pH values between 6.1 and 6.3, average size lower than 137 nm, low polydispersity index (< 0.22) and negative zeta potential. These nanoformulations demonstrated spherical shape with smooth surface. Results achieved by X-ray diffraction (XRD) and differential scanning calorimetry (DSC) indicated drug amorphization compared to pure CLZ. Fourier-transformed infrared spectroscopy (FTIR) showed no chemical bonds between drug and polymers. Formulations presented suitable stability for physical parameters. The *in vitro* drug release demonstrated prolonged release with no burst effect. Drug release was controlled by both mechanisms of polymer relaxation/degradation and Fickian diffusion. Moreover, chosen CLZ-loaded nanocapsules provided an *in vivo* prolonged antiplatelet effect for CLZ statistically similar to aspirin. These formulations can be further used as a feasible oral drug delivery carrier for controlled release of CLZ in order to treat PAD and IC events.

1. Introduction

Peripheral arterial disease (PAD) is due to flow-limiting atherosclerotic plaques in lower limbs which led to intermittent claudication (IC). IC is a very painful condition usually related to symptomatic PAD that involves several symptoms as discomfort, numbness, paresthesia, cramp and fatigue of leg muscles during walking which is relieved after a few minutes of rest [1]. In addition, depressive symptoms and social isolation are also associated to IC due to restricted mobility [2]. IC is a relatively common condition; its frequency increases dramatically with age and significantly higher rates of occurrence are seen in older adults. The prevalence of IC among people aged 45–54 years is 0.6% and 55–74 years is 4.6%. Eighteen percent population over 70 years of age have IC, with smokers and diabetics at higher rate of 50–75%, and the amputation risk is approximately 1% a year. IC is more common among men than women and among individuals with other manifestations of atherosclerosis [3]. Drug therapy for patients with IC have two separate

but complementary objectives: (1) symptom relief, *i.e.* improved walking distance and quality of life, and (2) prevention of secondary vascular complications, mainly plaque rupture leading to acute thrombotic events that may be limb-threatening and/or life-threatening [4].

Cilostazol (CLZ), 6-[4-(1-cyclohexyl-1H-tetrazol-5-yl) butoxy]-3,4-dihydro-2(1H)-quinolinone, is highly recommended in the symptomatic treatment of IC in the absence of heart failure [5]. CLZ is an inhibitor of phosphodiesterase III, whose action causes an increase in intracellular cyclic adenosine monophosphate (cAMP), leading to arterial smooth muscle dilatation, increased nitric oxide signaling, and, to a lesser extent, decreased platelet aggregation [6]. Additional pleiotropic effects include increased HDL levels and lower triglyceride levels [7]. In a pooled analysis of 9 randomized clinical trials, cilostazol (100 mg taken twice daily) was associated with an improvement in maximal walking distance from baseline at 20 weeks compared with placebo and an absolute improvement of 42 m [8]. Notably, these effects were found to be

* Corresponding author at: State University of Ponta Grossa, 4748, Carlos Cavalcanti Ave., 84030-900 Ponta Grossa, Paraná, Brazil.
E-mail address: pvfarago@uepg.br (P.V. Farago).

<https://doi.org/10.1016/j.msec.2018.10.029>

Received 27 February 2018; Received in revised form 20 August 2018; Accepted 5 October 2018

Available online 06 October 2018

0928-4931/ © 2018 Elsevier B.V. All rights reserved.

independent of age, gender, smoking status, diabetes, PAD duration, prior myocardial infarction, and beta-blocker use. However, treatment discontinuation is unfortunately quite common; it has been estimated that up to 60% of patients stop taking cilostazol by 36 months because of its side effects [9]. Side effects as headache, diarrhea, dizziness, palpitations, and tachycardia are remarkable usual and they are possibly related to the increased intracellular level of cAMP [10]. Because of a similar mechanism of action to the inotropic agents amrinone and milrinone, which demonstrated an adverse effect on mortality in advanced heart failure, the US Food and Drug Administration has established a boxed warning for cilostazol, prohibiting its use in patients with congestive heart failure [11].

Based on its poor solubility and high permeability in gastrointestinal (GI) tract, CLZ is classified as a class II drug by the Biopharmaceutics Classification System (BCS), which indicates that its absorption is dependent on dissolution rate [12,13]. For these drugs, the low drug solubility can affect the rate and extent of absorption which can compromise bioavailability [14]. In this context, CLZ absorption in the gastrointestinal tract is usually slow, variable, and incomplete [15]. Therefore, various formulation strategies have been applied to overcome this problem focused on providing immediate or controlled release pattern. Inclusion complex between

β -cyclodextrin and CLZ was prepared by lyophilization and showed increased apparent solubility and improved dissolution rate compared to pure drug [16]. In a similar study, inclusion complex between dimethyl- β -cyclodextrin and CLZ was obtained by co-precipitation and significantly increased dissolution and absorption rate compared to Pletoz® tablets (cilostazol 50 mg) and pure CLZ [17]. A CLZ nanosuspension was prepared by the anti-solvent and high-pressure homogenization method and then sprayed to dry powders. The bioavailability of CLZ tablets prepared using spray-dried nanosized crystalline powder after oral administration to beagle dogs was markedly increased compared to that produced by nanosized tablets and commercial tablets [18]. A lipid based self-nanoemulsifying formulation of CLZ was developed by a 2^3 full factorial design and showed remarkable increase in equilibrium solubility and dissolution efficiency when compared to pure CLZ [19]. Solid dispersions containing CLZ were developed by hot-melt and thermal adhesion granulation. The relative solubility was almost three-fold higher than that of Pletaal® tablets (cilostazol 50 mg) in compositions containing D- α -tocopheryl polyethylene glycol succinate and vitamin E as excipients, in which a controlled drug release pattern was demonstrated [12]. Self-nanoemulsifying drug delivery systems containing CLZ were prepared by sonication and demonstrated improved *in vitro* drug dissolution and *in vivo* oral and parenteral bioavailability [15]. An amorphous solid dispersion containing CLZ, povidone, hydrogenated vegetable oil, and sodium carboxymethyl cellulose was prepared by spray-drying and demonstrated a controlled release and absence of drug recrystallization [20]. Spray-dried solid dispersion containing Eudragit® L100 and Eudragit® S100 also provided a controlled release of CLZ [21].

To the best of our knowledge, there is no previous report in literature concerning the nanoencapsulation of CLZ into poly(ϵ -caprolactone)-poly(ethylene glycol) (PCL-PEG) blend nanocapsules. Nanocapsules are defined as nanovesicular systems characterized by a polymer shell surrounding a lipophilic or hydrophilic liquid core [22]. The central cavity is usually composed of oil [23]. Preferably, the drug is entrapped or dissolved in the liquid core. However, adsorption on the particle surface can also occur [24]. Compared to nanospheres, which is arranged as a polymeric matrix, nanocapsules have been proven to be more advantageous due to their higher drug loading capacity, better protection of drugs from degradation, and reduced burst release [24–26]. In addition, as briefly described, previous works were devoted to discuss formulation parameters, drug solubility, dissolutions behavior, and bioavailability of CLZ from those systems. No other paper was focused on using the novel controlled delivery strategy in order to investigate *in vivo* pharmacological effect of CLZ.

Taking into account all these data, the hypothesis of this paper was that nanoencapsulation of CLZ in PCL-PEG blend nanocapsules can both decrease oral drug dosage and prolong *in vivo* anti-platelet effect in order to minimize its drawbacks in pharmacotherapy. A PCL-PEG blend was chosen for obtaining nanocapsules due three advantages: (1) lower cost than other polyesters as poly(lactic acid) (PLA) and poly(lactic-co-glycolic acid) PLGA; (2) PEGylated systems often reduce immunogenicity and antigenicity and provide a prolonged blood effect; (3) computational simulation successfully predicted suitable experimental drug affinity and drug loading for polyester-PEG systems containing CLZ [27]. At first, CLZ-loaded nanocapsules were prepared by interfacial deposition of preformed polymer method and entirely characterized by physicochemical, morphological, spectroscopic and thermal methods. Then, encapsulation efficiency and *in vitro* release profiles were determined by a previously validated reversed-phase high-performance liquid chromatography coupled to ultraviolet (RP-HPLC/UV) method. Moreover, the chosen formulation was evaluated for *in vivo* anti-platelet activity in rats.

2. Material and methods

2.1. Materials

Cilostazol 99.91% purity (CLZ, IPCA Laboratories Limited, Mumbai, India), poly(ϵ -caprolactone) (PCL, $\overline{M}_w$ = 10,000–14,000 g mol⁻¹, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), and poly(ethylene glycol) (PEG, $\overline{M}_w$ = 5400–6600 g mol⁻¹, Cromato Produtos Químicos, Diadema, Brazil) were used as received. Span 80® (sorbitan monooleate) was purchased from Sigma Aldrich (St. Louis, MO, USA) and Tween 80® (polysorbate 80) was supplied by Deleware (Porto Alegre, Brazil). Capric/caprylic acid triglycerides (MCT) were obtained from Focus Química (São Paulo, Brazil) and acetone was acquired from Vetec (Rio de Janeiro, Brazil). HPLC-grade acetonitrile and HPLC-grade methanol were provided by Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). Water was purified in a Milli-Q Plus water purification system (Millipore, Bedford, MA, USA). All others reagents and solvents were of analytical grade.

2.2. Methods

2.2.1. Preparation of polymeric nanocapsules

CLZ-loaded nanocapsules were obtained using a blend of PCL-PEG. These formulations were prepared by interfacial deposition of preformed polymer method as classically described [28]. A colloidal solution of PCL-PEG (100 mg, 3:1 ratio), CLZ (30; 60 and 120 mg), MCT (300 mg) and Span 80® (77 mg) in acetone (27 mL) was added into an aqueous solution (53 mL) of Tween 80® (77 mg) under magnetic stirring at 40 °C. After 60 min, the acetone was removed and the aqueous phase was concentrated under reduced pressure. The final volume was adjusted to 10 mL and CLZ concentration of 3.0 mg mL⁻¹ (NC3), 6.0 mg mL⁻¹ (NC6) and 12.0 mg mL⁻¹ (NC12). A formulation containing no drug (NC0) was prepared as negative control. All polymeric nanocapsule suspensions were obtained in triplicate from three different batches.

2.2.2. Physicochemical characterization

The pH values of nanosuspensions were determined by immersion of the electrode directly in the formulation using a previously calibrated potentiometer (pH meter model HI 221, Hanna Instruments, São Paulo, Brazil). Measures were performed at room temperature (25 ± 2 °C) in triplicate.

The average particle size and polydispersity index ($n = 3$) were measured by photon correlation spectroscopy (Zetasizer Nanoseries, Malvern Instruments, Malvern, UK) after diluting each sample in ultrapure water (1:500, v/v) with no previous filtration. At the same equipment and using the same sample preparation, zeta potential ($n = 3$) was determined by electrophoretic mobility technique [29].

2.2.3. Scanning and transmission electron microscopy

The freeze-dried formulations were mounted on aluminum stubs, sputtered with gold (IC-50 Ion Coater, Shimadzu, Kyoto, Japan) and analyzed using scanning electron microscopy (SEM, SSX-550 Superscan, Shimadzu, Kyoto, Japan) at accelerating voltages of 10 or 15 kV with different magnifications.

The nanosuspensions (5 μ L) were initially drop cast on a transmission electron microscope (TEM) grid and dried at room temperature ($25 \pm 2^\circ\text{C}$). The morphology of polymeric nanocapsules was examined using TEM equipment (JEM 1200 EX-II, JEOL, Tokyo, Japan).

2.2.4. X-ray diffraction (XRD)

Polymeric nanosuspensions were previously deposited on glass coverslip and dried at room temperature ($25 \pm 2^\circ\text{C}$). Wide-angle X-ray diffraction (XRD) was performed with a Shimadzu X-ray diffractometer (Shimadzu XRD-6000, Kyoto, Japan). The 2θ value was increased from 5° to 50° at a scan rate of $2^\circ\cdot\text{min}^{-1}$ using a Cu-K α source ($\lambda = 1.5418 \text{ \AA}$) at 40 kV and 40 mA.

2.2.5. Fourier-transformed infrared spectroscopy (FTIR)

The Fourier-transformed infrared (FTIR) spectra of raw materials, freeze-dried polymeric nanocapsules and physical mixture were recorded from 4000 to 400 cm^{-1} on a Shimadzu IR Prestige-21 spectrophotometer (Kyoto, Japan) using KBr pellets with 32 scans min^{-1} and resolution of 4 cm^{-1} .

2.2.6. Differential scanning calorimetry (DSC)

DSC curves of CLZ, PCL, PEG, PCL/PEG/CLZ physical mixture (1:1:1) and freeze-dried polymeric nanocapsules were obtained in a STA 6000 Simultaneous Thermal Analyzer (Perkin Elmer, Waltham, MA, USA) using alumina crucible with $4.0 \pm 0.1 \text{ mg}$ of each sample under dynamic N_2 atmosphere (flow rate: $50 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$). The temperature range was $20\text{--}300^\circ\text{C}$ with heating rate of $10^\circ\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$. The DSC cell was previously calibrated with indium (m.p. = 156.45°C ; $\Delta H_{\text{fusion}} = 28.54 \text{ J g}^{-1}$).

2.2.7. Drug content and encapsulation efficiency

For drug loading determination, nanosuspensions were submitted to a combined ultrafiltration/centrifugation using centrifugal devices (Amicon® 10,000 MW, Millipore, Bedford, MA, USA) at 2200g during 30 min in triplicate. Free CLZ was determined in ultrafiltrate using a previously validated RP-HPLC/UV method [5]. In brief, CLZ concentration was analyzed using a GL Sciences Inertsil® ODS3 (Torrance, CA, USA) reversed phase analytical column ($150 \text{ mm} \times 4.6 \text{ mm}$, $5 \mu\text{m}$) and a GL Sciences Inertsil® ODS3 guard cartridge system ($10 \text{ mm} \times 4 \text{ mm}$, $5 \mu\text{m}$) at room temperature ($20 \pm 2^\circ\text{C}$) using UV detection at 254 nm. The isocratic mobile phase consisted of acetonitrile and water (47:53, v/v) at a flow rate of $1.0 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$. The encapsulation efficiency (EE) was calculated using Eq. (1).

$$\text{EE}(\%) = \frac{\text{total drug content} - \text{free drug content}}{\text{total drug content}} \times 100 \quad (1)$$

2.2.8. Stability studies

Nanosuspensions were stored at room temperature ($25 \pm 2^\circ\text{C}$) and protected from light. These formulations were evaluated after 60 days to check physical parameters: pH, particle size, polydispersity index and zeta potential.

2.2.9. In vitro drug release study

Release profiles of CLZ from polymeric nanocapsules were obtained by dialysis diffusion technique [30]. Each sample (30% ethanol-water solution of CLZ, NC3, NC6, and NC12) were placed into a dialysis bag (Spectra/Por® molecular porous membrane tubing, MWCO 10,000, Spectrum Laboratories, Inc., Rancho Dominguez, CA, USA) at an equivalent concentration of 3 mg/mL and a final volume of 3 mL . This

system was then immersed in 500 mL of water with 30% of ethanol at 37°C and under continuous magnetic stirring of 50 rpm. Aliquots of 5 mL were withdrawn at predetermined time intervals and replaced by the same volume of fresh medium. The amount of CLZ released was assayed by HPLC/UV [5]. The experiment was performed in triplicate from three independent batches.

In order to understand the drug release mechanism, the experimental data was fitted to Korsmeyer-Peppas model (Eq. (2)). In this model, Q_t is the amount of the drug released at time t , Q_∞ is the initial amount of the drug, a is a constant incorporating structural and geometric characteristic of the carrier, and n is the release exponent, indicative of the mechanism of the drug release. For spherical systems, $n = 0.43$ implies Fickian diffusion, while $n \geq 0.85$ is related to case II transport. Values between the both limits indicate anomalous transport [31]. The fit of the experimental data to the model was performed using MicroMath Scientist™ 2.01 software (Salt Lake City, UT, USA).

$$Q_t/Q_\infty = a \cdot t^n \quad (2)$$

2.2.10. In vivo pharmacological experiments

2.2.10.1. Animals. Antiplatelet activity experiments were performed using male Wistar rats of about 200 g from Central Animal Facility of State University of Ponta Grossa (Brazil). Animals were kept at $22 \pm 2^\circ\text{C}$ with *ad libitum* access to food and water in controlled conditions of light (light-dark cycle of 12/12 h). The protocol has been approved by the Ethical Committee of State University of Ponta Grossa (protocol number 15981/2013).

2.2.10.2. Experimental protocol. Thirty two rats were randomly divided in four groups of eight animals. Group 1 received CLZ-loaded nanocapsules NC12 (amount equivalent to 60 mg of CLZ kg^{-1} , orally). Group 2 received unloaded nanocapsules NCO (equivalent volume to group 1, orally), group 3 received CLZ ($60 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$, orally) suspended in propylene glycol and water (70:30, v/v) as vehicle and group 4 received this vehicle (equivalent volume to group 3, orally). These treatments were carried out during 14 consecutive days by a gastric gavage once-a-day (24/24 h) for groups 1 and 2 and twice-a-day (12/12 h) for groups 3 and 4. Twenty-four hours from last dose administered for all groups, rats were anesthetized with ketamine and xylazine (55 and $8 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$, respectively) and their right carotid artery was cannulated for blood sampling.

2.2.10.3. Preparation of platelet rich plasma (PRP) and platelet poor plasma (PPP). Fresh blood (6 mL) was collected in tubes containing 4% trisodium citrate solution. Samples were centrifuged at room temperature for 15 min at $100 \times g$ to obtain PRP. Plasma was carefully removed and centrifuged at $900 \times g$ for 10 min to obtain a platelet pellet which was resuspended in enough fresh autologous plasma. Supernatant from final centrifugation was the platelet poor plasma (PPP).

2.2.10.4. Platelet aggregation test. Platelet aggregation assay was performed in a 96-well plate and absorbance was obtained on a Synergy H1 hybrid multi-mode microplate reader at 650 nm. An agonist (collagen type I, $4 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) was added into each well. Then, plasma containing platelets at a concentration of 200×10^6 platelets/well was added for a final volume of $150 \mu\text{L}$. Readings were taken at time zero and after 15 min to induce platelet aggregation. Plate was shaken for 10 s before starting each test with amplitude of 2 mm (174 rpm) and 3 s before each reading with amplitude of 1 mm (114 rpm) at 37°C .

2.2.10.5. Statistical analysis. Statistical analysis was performed using the GraphPad Prism software (version 5.00, San Diego, CA, USA). Results were expressed as mean $\pm$ standard error of mean. Comparisons among groups were tested by one-way ANOVA.

Table 1
Physicochemical characteristics of polymeric nanocapsules suspensions.

Formulation	pH	Particle size (nm)	Polydispersity index	Zeta potential (mV)
NC0	6.3 ± 0.11	137 ± 1.60	0.17 ± 0.05	−36.9 ± 2.20
NC3	6.1 ± 0.10	134 ± 3.70	0.22 ± 0.01	−36.3 ± 1.60
NC6	6.1 ± 0.12	133 ± 4.90	0.17 ± 0.01	−36.4 ± 2.00
NC12	6.3 ± 0.10	130 ± 5.80	0.18 ± 0.03	−37.6 ± 1.50

Mean ($n = 3$) ± standard deviation.

Bonferroni *post hoc* test was used for *in vivo* platelet aggregation assay. Critical significance level was set at $\alpha = 5\%$ ($p < 0.05$).

3. Results and discussion

3.1. Physicochemical characterization

After preparation, the formulations showed milky aspect and the typical opalescent bluish reflection resulting from the Brownian motion of colloidal structures (Tyndall effect). The results of physicochemical characterization of these formulations can be seen in Table 1.

The drug concentration varied from 0 to 12.0 mg mL^{−1} and did not have detrimental effect on these physicochemical parameters. PCL-PEG blend nanocapsules demonstrated pH values between 6.1 and 6.3 due to the water autoionization reaction [32]. Concerning the average diameter, suitable nanometric-scaled size and low polydispersity index which indicated a narrow distribution [33,34] were recorded (Table 1). Considering the zeta potential (ζ), the colloidal structures showed negative values higher than −35 mV. According to the considered system, ζ can be positive (cationic) or negative (anionic). Its absolute value gives valuable information on the stability of a colloid. For $|\zeta|$ typically larger than 30 mV, the high electric charge that is formed on the surface of the incipient droplets causes strong repellant forces between them, preventing further particle aggregation and consequently providing the system with a suitable stability [35]. In addition, the negative charge of nanocapsules surface promotes improved blood maintenance because positively charged particles tend to be eliminated faster from blood flow and accumulated in lungs and liver [36].

3.2. Scanning and transmission electron microscopy

The photomicrographs obtained by SEM and TEM proved the nanoscale dimensions of PCL-PEG blend nanocapsules. It was seen that even altering drug concentration, the morphology was similar among all formulations (Fig. 1). Nanocapsules showed spherical structures and smooth surface as expected with average diameter lower than 150 nm. These nanostructures presented particle size and polydispersity index similar to those previously obtained by photon correlation spectroscopy.

3.3. X-ray diffraction

Fig. 2 shows XRD patterns of CLZ, PCL, PEG, physical mixture and freeze-dried nanocapsules at different concentrations (NC0, NC3, NC6 and NC12). Pure CLZ presented different peaks related to its crystalline structure mainly at $2\theta = 12.61, 15.51, 17.84, 18.61, 22.08$ and 23.44° in agreement to the literature [17]. On the other hand, both polymers revealed semicrystalline patterns showing crystalline peaks at 21.47 and 23.84° (PCL) and 16.22 and 20.35° (PEG). A decrease of typical crystalline peaks of CLZ was observed in physical mixture due to gridding process. However, no remarkable crystalline peak was detected in PCL-PEG blend nanocapsules. These results suggest that nanoencapsulation procedure provided an intense decrease of crystalline diffraction peaks of CLZ leading to drug amorphization [37].

In general, amorphous solids are more soluble than crystalline forms

due to the free energies involved in dissolution process. Solids in amorphous state have randomly arranged molecules and thus low energy is required to separate them. Consequently, their dissolution is faster than when in crystal form [38]. This behavior is particularly desirable for CLZ because it is a drug of low water solubility, which can improve its dissolution profile.

3.4. Fourier-transformed infrared spectroscopy

FTIR spectra performed for CLZ, PCL, PEG, physical mixture and PCL-PEG blend nanocapsules are depicted in Fig. 3. FTIR spectrum of pure CLZ showed absorption bands of amide N–H stretching vibration at 3185 cm^{-1} , aromatic C–H stretching vibration at 3054 cm^{-1} , C–H₂ asymmetric and symmetric vibrations at 2933 and 2864 cm^{-1} , amide C=O stretching vibration at 1660 cm^{-1} , aromatic C=C stretching vibration at 1500 cm^{-1} , aryl alkyl ether C–O stretching vibration at 1239 cm^{-1} (asymmetric) and 1034 cm^{-1} (symmetric) as previously assigned [39].

FTIR spectrum of PCL presented a strong band at 1727 cm^{-1} corresponding to C=O stretching vibration and two bands at 2944 and 2860 cm^{-1} due to asymmetric and symmetric C–H₂ stretching vibrations, respectively [40]. FTIR spectrum of PEG demonstrated bands at 2944 and 2860 cm^{-1} due to asymmetric and symmetric C–H₂ stretching vibrations of aliphatic chain. Dialkyl ether C–O–C asymmetric stretching vibration at 1108 cm^{-1} and –OH stretching vibration at 3524 cm^{-1} were also assigned [37].

Physical mixtures and nanocapsules presented band assignments at the same wavenumber range. Therefore, no difference in the position of absorption bands was observed between physical mixture and CLZ-loaded PCL-PEG blend nanocapsules. Consequently, no chemical bond between drug and polymers was formed during nanoencapsulation.

3.5. Differential scanning calorimetry

The DSC curves performed for pure CLZ, PCL, PEG, physical mixture and PCL-PEG blend nanocapsules are displayed in Fig. 4. Thermal profile of pure CLZ showed a sharp endothermic event at 160.53°C which corresponded to the melting temperature of crystalline drug [17]. PCL and PEG presented melting temperatures at 60.21°C and 60.08°C , respectively, which confirmed previously reported data [41,42]. As expected, the thermograms of physical mixtures revealed the thermal events attributed to both polymers and drug. However the typical melting event of CLZ was not observed in DSC curves when the drug was entrapped into PCL-PEG blend nanocapsules which indicated that the drug amorphization occurred probably due to its solubilization in the oil core. This thermal behavior can be favorable to the easy diffusion of drug molecules through the polymeric shell, resulting in an improved dissolution rate for a poorly soluble drug and sustained release from the investigated nanocarriers [43].

3.6. Evaluation of encapsulation efficiency

The drug content and encapsulation efficiency (EE) of PCL-PEG blend nanocapsules are demonstrated in Table 2. The drug-loaded formulations showed CLZ content very similar to theoretical value and EE values higher than 99.52%, indicating no loss or drug degradation during the preparation process. These values are attributed to the poor aqueous solubility of CLZ ($3.0\text{ }\mu\text{g mL}^{-1}$ at 25°C) [44] which avoided its partitioning in aqueous phase.

3.7. Stability study

After 60 days, colloidal suspensions of PCL-PEG blend nanocapsules kept the same visual aspect with any precipitation or color change. The pH value, average particle size (nm), polydispersity index and zeta potential (mV) were compared immediately after preparation and

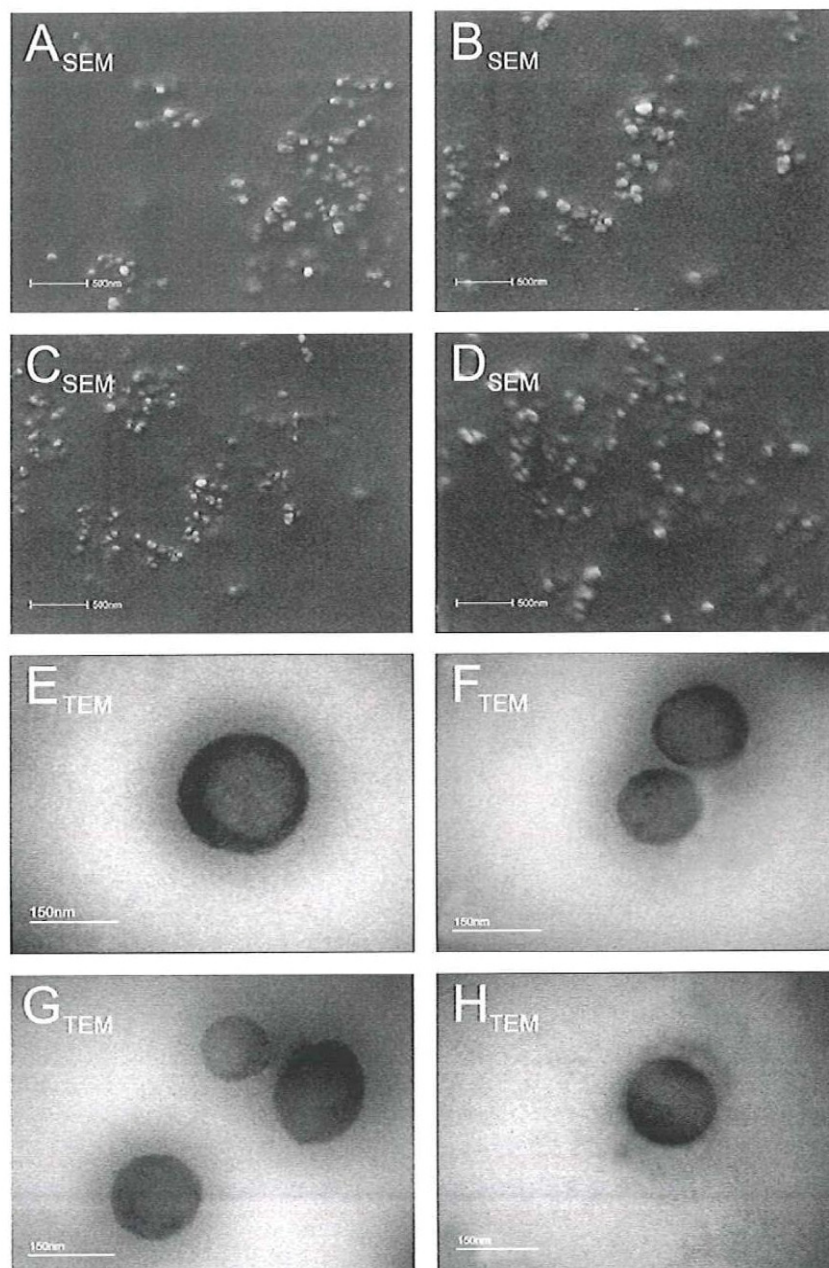


Fig. 1. Scanning electron micrographs of PCL-PEG nanocapsules: NC0 (A), NC3 (B), NC6 (C) and NC12 (D); magnifications of 15 kX. Transmission electron micrographs of NC0 (E), NC3 (F), NC6 (G) and NC12 (H); magnifications of 25 kX.

60 days after (Fig. 5).

Considering pH values, no significant decrease ($p > 0.05$) was observed after 60 days for all formulations. These results represent that no remarkable ionization of water occurred during storage. A significant increase ($p < 0.05$) of particle size was observed for PCL-PEG blend nanocapsules. However, the final diameters remained smaller

than 300 nm which are reported as suitable in literature for nanostructured systems [28]. Concerning to polydispersity, significantly higher values ($p < 0.05$) were found for the polydispersity index of all formulations after 60 days of storage. These findings indicate heterogeneity of nanoparticles and are related to the enhancement of particle size. In particular, formulations NC0 and NC3 showed mean

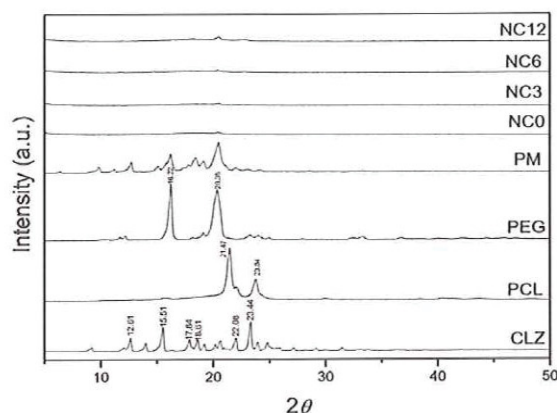


Fig. 2. XRD patterns of CLZ, PCL, PEG, physical mixture (PM) and freeze-dried nanocapsules at different concentrations (NC0, NC3, NC6 and NC12).

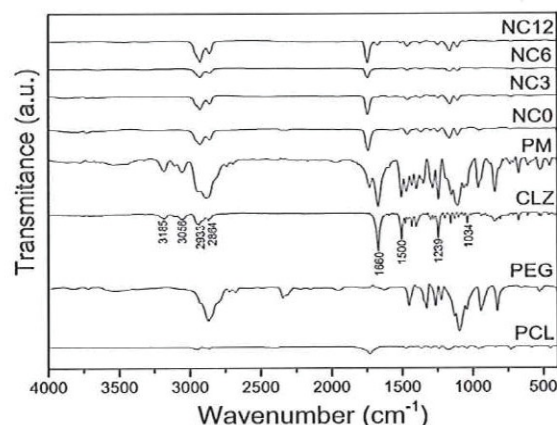


Fig. 3. FTIR spectra of CLZ, PCL, PEG, physical mixture (PM) and freeze-dried nanocapsules at different concentrations (NC0, NC3, NC6 and NC12).

polydispersity indexes of 0.58 and 0.51 after 60 days, respectively. These results are higher than 0.5 that are related to a broad distribution [44]. Regarding ζ , no significant difference ($p > 0.05$) was obtained for all formulations when it was compared initial and final ζ values. These data suggest a suitable colloidal stability [22]. Taking these findings into account, it might appear obvious that nanoparticle growth occurred which is a disadvantage of nanocolloidal systems. This effect can be related to Ostwald ripening, which can occur during processing, storage, and handling of suspensions. This thermodynamically-driven spontaneous process occurs because larger particles are more energetically favored than smaller particles [45].

3.8. *In vitro* drug release study

Concerning to the *in vitro* drug release experiments, PCL-PEG blend nanocapsules showed similar release profiles regardless of the drug concentration ($p > 0.05$). NC3, NC6 and NC12 released 80% of CLZ in 90, 96 and 108 h of experiment, respectively (Fig. 6). On the other hand, the corresponding 30% ethanol-water solution of CLZ released

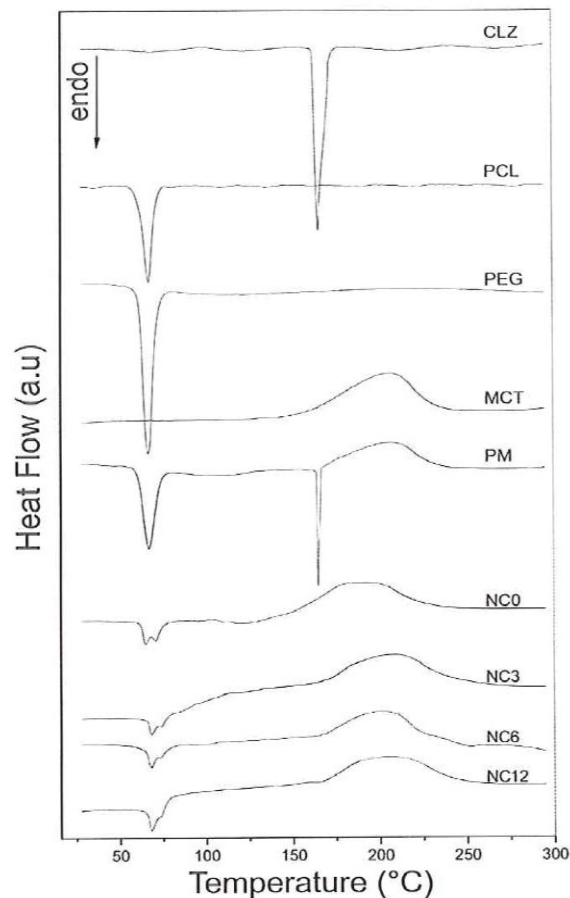


Fig. 4. DSC curves of CLZ, PCL, PEG, physical mixture (PM) and freeze-dried nanocapsules at different concentrations (NC0, NC3, NC6 and NC12).

Table 2

CLZ-loaded and encapsulation efficiency (EE) for PCL-PEG blend nanocapsules.

Formulations	Theoretical concentration ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	CLZ-loaded ($\mu\text{g mL}^{-1}$) ^a	EE (%)
NC3	3000.0	2985.51 $\pm$ 0.54	99.52
NC6	6000.0	5987.58 $\pm$ 0.67	99.79
NC12	12,000.0	11,984.64 $\pm$ 0.10	99.87

^a Mean ($n = 3$) $\pm$ standard deviation.

80% of the drug in almost 20 h. The difference in the release rate could be explained by the concentration gradient between each formulation and the dissolution medium. At higher drug concentrations, this process was faster since this gradient is the driving force for drug dissolution. Moreover, at higher drug-loading concentration, CLZ may be distributed near to the nanocapsules surface providing a more rapid *in vitro* release. This difference could be also explained by the supersaturation, nucleation and growth of CLZ at higher drug concentrations, leading to drug expulsion [41]. Therefore, the nanoencapsulation of CLZ slowed the drug release, which may prolong its therapeutic effect. In addition,

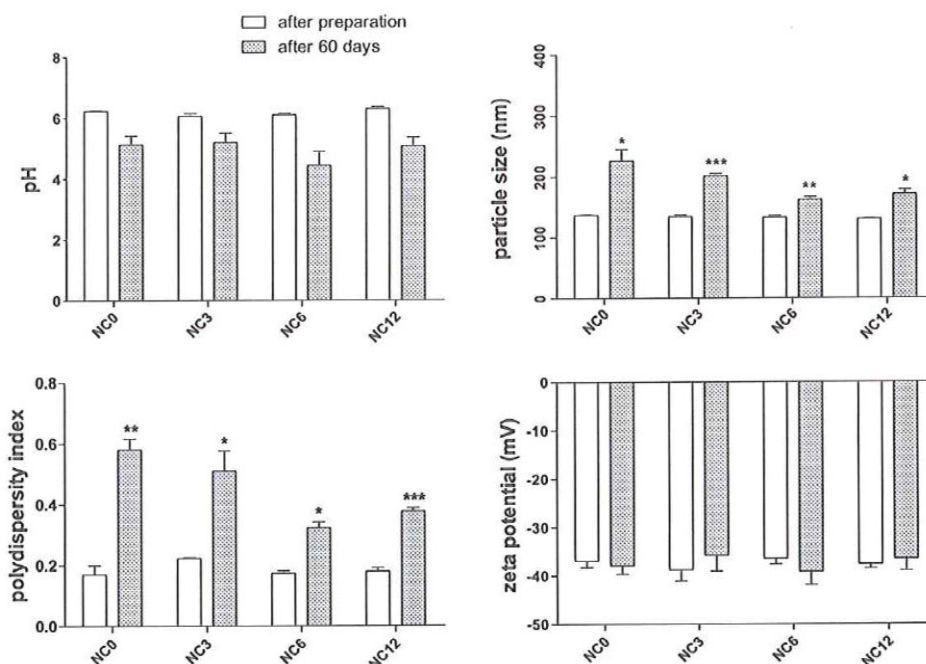


Fig. 5. Particle size, pH, polydispersity index and zeta potential of CLZ-loaded nanocapsules, after preparation and 60 days after.

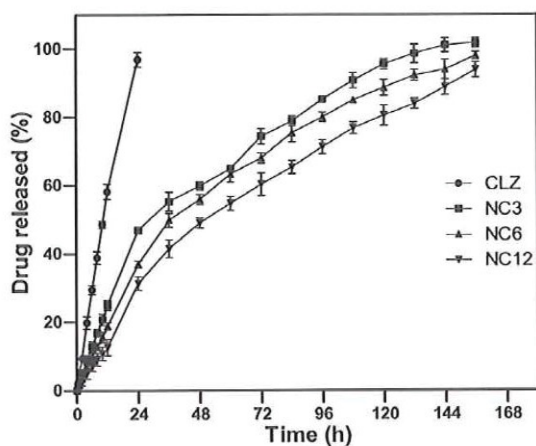


Fig. 6. *In vitro* release profiles for 30% ethanol-water solution of CLZ and PCL-PEG nanocapsules (NC3, NC6 and NC12).

the use of PEG in nanocapsules can provide a furtive effect which can maintain the drug release by days leading to a better therapeutic response [46].

The experimental data were fitted to Korsmeyer-Peppas model aiming at understanding the drug release mechanism. PCL-PEG blend nanocapsules presented n value of 0.66 (NC3), 0.67 (NC6) and 0.54 (NC12). These results indicated that CLZ release is driven by anomalous transport, *i.e.*, the drug release is controlled by polymer relaxation/degradation followed by Fickian diffusion of CLZ.

3.9. *In vivo* pharmacological experiments

Antiplatelet aggregation drugs are used as mainstream first-line drugs for prevention and cure of arterial thrombus diseases, including PAD [47]. In spite of the well-known effect of CLZ on inhibiting platelet aggregation by decrease of phosphodiesterase III [6], this drug needs to be administered twice a day for a suitable clinical result. In this paper, the *in vivo* effect of pure CLZ, CLZ-loaded nanocapsules (NC12), and aspirin on inhibiting of collagen-stimulated platelet aggregation was compared after 24 h from last dose administration in order to explore whether the nanoencapsulation had influence on prolonging drug response.

These results are summarized in Fig. 7. Nanosuspension NC0 and vehicle were used as controls and provided no inhibition of platelet aggregation. Free CLZ, CLZ-loaded nanocapsules (NC12) and aspirin presented a statistically significant antiplatelet effect compared to controls ($p < 0.01$). Moreover, CLZ-loaded nanocapsules had significant effect on inhibition of platelet aggregation compared to free CLZ ($p < 0.001$), 24 h after the last dose. Probably, CLZ-loaded nanocapsules inhibited platelet aggregation for a longer time interval by controlling the rate of drug release. Thus, it is possible to suggest that nanoencapsulation of CLZ in PCL-PEG blend nanocapsules can both decrease oral drug dosage and prolong *in vivo* antiplatelet effect in order to minimize its drawbacks in pharmacotherapy. In addition, CLZ-loaded nanocapsules (NC12) led to a similar result compared to aspirin ($p > 0.05$), a gold standard antiplatelet drug [48]. Moreover, this performance was not achieved by pure CLZ compared to aspirin ($p < 0.05$) at the same time interval. In summary, these findings demonstrate that CLZ-loaded PCL-PEG blend nanocapsules can provide an *in vivo* prolonged antiplatelet effect for CLZ and should be studied further as a new polymeric carrier to treat PAD and IC events.

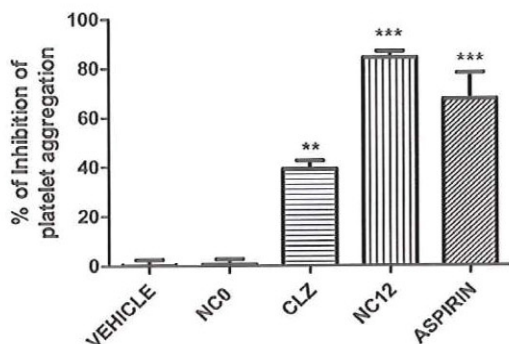


Fig. 7. Percentage of inhibition of platelet aggregation of NC0 (control), free CLZ, formulation NC12 and aspirin. Each bar represents mean $\pm$ standard error of mean from 8 independent experiments. Asterisks denote significance levels compared to control: significantly different, * $p < 0.05$ and ** $p < 0.01$, Bonferroni's test.

4. Conclusion

CLZ-loaded PCL-PEG blend nanocapsules were successfully prepared by the interfacial deposition of preformed polymer method. Nanometer-sized, monodisperse, physically stable and amorphous/non-crystalline formulations with high drug-loading efficiencies were obtained. No changes in FTIR assignments were recorded after the nanoencapsulation procedure. PCL-PEG blend nanocapsules were able to decrease the dissolution rate of CLZ and controlled the drug release by both mechanisms of polymer relaxation/degradation and Fickian diffusion. The chosen CLZ-loaded nanocapsules (NC12) demonstrated a statistically significant *in vivo* antiplatelet effect compared to controls and pure CLZ. These results support an experimental basis for the use of CLZ-loaded PCL-PEG blend nanocapsules as a feasible oral drug delivery carrier to provide a controlled release of CLZ for treating arterial thrombotic events.

Acknowledgments and disclosures

The authors are grateful to CNPq/Brazil (#310257/2013-1), CAPES/Brazil (#201500031493/2015) and Fundação Araucária/Brazil (#074/2014) for financial support. They would also like to thank the Complexo de Laboratórios Multiusuários, which is a multi-user laboratory of analytical equipment and facilities at State University of Ponta Grossa, for providing infrastructure, constant support and encouragement.

References

- [1] H. Hong, W.C. Mackey, The limits of evidence in drug approval and availability: a case study of cilostazol and nifedipine for the treatment of intermittent claudication, *Clin. Ther.* 36 (2014) 1290–1301.
- [2] K. Wattanakul, A.R. Folsom, E. Selvin, B.D. Weatherley, J.S. Pankow, F.L. Brancati, A.T. Hirsch, Risk factors for peripheral arterial disease incidence in persons with diabetes: the Atherosclerosis Risk in Communities (ARIC) Study, *Atherosclerosis* 180 (2) (2005) 389–397.
- [3] A.V. Meru, S. Mitra, B. Thyagarajan, A. Chugh, Intermittent claudication: an overview, *Atherosclerosis* 187 (2006) 221–237.
- [4] R.D. Malgor, F. Alahdab, T.A. Elralyah, A.Z. Rizvi, M.A. Lane, L.J. Prokop, O.J. Phung, W. Farah, V.M. Montori, M.S. Conte, M.H. Murad, A systematic review of treatment of intermittent claudication in the lower extremities, *J. Vasc. Surg.* 61 (3 Suppl.) (2015) 54S–73S.
- [5] M.L.S. Gomes, T. Klein, M. Simionatto, J.M. Nadal, S.M.W. Zanin, D.M. Borsato, P.V. Farago, A simple RP-HPLC/UV method for determination of cilostazol in polymeric nanoparticles suspensions: development and validation, *Lat. Am. J. Pharm.* 34 (4) (2015) 803–809.
- [6] H. Ota, M. Eto, M.R. Kano, S. Ogawa, K. Iijima, M. Akishita, Y. Ouchi, Cilostazol inhibits oxidative stress-induced premature senescence via upregulation of Sirt1 in human endothelial cells, *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 28 (2008) 1634–1639.
- [7] M.B. Elam, J. Heckman, J.R. Crouse, D.B. Hunninghake, J.A. Herd, M. Davidson, I.L. Gordon, E.B. Bortey, W.P. Forbes, Effect of the novel antiplatelet agent cilostazol on plasma lipoproteins in patients with intermittent claudication, *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 18 (12) (1998) 1942–1947.
- [8] R.L. Pande, W.R. Hiatt, M.A. Creager, A pooled analysis of the durability and predictors of treatment response of cilostazol in patients with intermittent claudication, *Vasc. Med.* 15 (3) (2010) 181–188.
- [9] W.R. Hiatt, S.R. Money, E.P. Brass, Long-term safety of cilostazol in patients with peripheral artery disease: the CASTLE study (Cilostazol: a study in long-term effects), *J. Vasc. Surg.* 47 (2) (2008) 330–336.
- [10] L. Tan, B. Margaret, J.H. Zhang, R. Hu, Y. Yin, L. Cao, H. Feng, Y. Zhang, Efficacy and safety of cilostazol therapy in ischemic stroke: a meta-analysis, *J. Stroke Cerebrovasc. Dis.* 24 (5) (2015) 930–938.
- [11] K. Agrawal, R.T. Eberhardt, Contemporary medical management of peripheral arterial disease: a focus on risk reduction and symptom relief for intermittent claudication, *Cardiol. Clin.* 33 (1) (2015) 111–137.
- [12] C.Y. Wu, L.Z. Benet, Predicting drug disposition via application of BCS: transport/absorption/elimination interplay and development of a biopharmaceutics drug disposition classification system, *Pharm. Res.* 22 (1) (2005) 11–23.
- [13] H. Xu, X. Li, H. Kong, X. Zeng, Y. Jin, X. Qi, H. Wang, W. Xie, Characterization of the uptake efficiency and cytotoxicity of tetrandrine-loaded poly(N-vinylpyrrolidone)-Block-poly(ϵ -caprolactone) (PVP-b-PCL) nanoparticles in the A549 lung adenocarcinoma cell line, *J. Biomed. Nanotechnol.* 12 (2016) 1699–1707.
- [14] X. Pu, J. Sun, M. Li, Z. He, Formulation of nanosuspensions as a new approach for the delivery of poorly soluble drugs, *Curr. Nanosci.* 5 (2009) 417–427.
- [15] D.B. Mahmoud, M.H. Shukr, E.R. Bendas, *In vitro* and *in vivo* evaluation of self-nanoemulsifying drug delivery systems of cilostazol for oral and parenteral administration, *Int. J. Pharm.* 476 (1–2) (2014) 60–69.
- [16] V.U. Gawali, P.B. Patil, S.M. Chede, S.C. Jagdale, B.S. Kuchekar, A.R. Chabukwar, Studies on cilostazol and β -cyclodextrin inclusion complexes, *Int. J. PharmTech Res.* 1 (4) (2009) 1073–1078.
- [17] S.G. Patel, S.J. Rajput, Enhancement of oral bioavailability of cilostazol by forming its inclusion complexes, *AAPS PharmSciTech* 10 (2) (2009) 660–669.
- [18] X. Miao, C. Sun, T. Jiang, L. Zheng, T. Wang, S. Wang, Investigation of nanosized crystalline form to improve the oral bioavailability of poorly water soluble cilostazol, *J. Pharm. Pharm. Sci.* 14 (2) (2011) 196–214.
- [19] S. Pund, Y. Shete, S. Jagdale, Multivariate analysis of physicochemical characteristics of lipid based nanoemulsifying cilostazol—quality by design, *Colloids Surf. B: Biointerfaces* 115 (2014) 29–36.
- [20] S. Verma, V.S. Rudraraju, Disintegration mediated controlled release super-saturating solid dispersion formulation of an insoluble drug: design, development, optimization, and *in vitro* evaluation, *AAPS PharmSciTech* 16 (1) (2015) 85–97.
- [21] J.H. Park, H.K. Choi, Enhancement of solubility and dissolution of cilostazol by solid dispersion technique, *Arch. Pharm. Res.* 38 (7) (2015) 1336–1344.
- [22] M.H.M. Sari, L.M. Ferreira, V.A. Zborowski, P.C.O. Araujo, J.M. Nadal, P.V. Farago, L. Cruz, C.W. Nogueira, p,p'-Methoxydiphenyl diselenide incorporation into polymeric nanocapsules improves its antinociceptive action: physicochemical and behavioral studies, *Colloids Surf. B: Biointerfaces* 157 (2017) 464–472.
- [23] L.M. Ferreira, V.F. Cervi, M.H.M. Sari, A.V. Barbieri, A.P. Ramos, P.M. Copetti, G.F. de Brum, K. Nascimento, J.M. Nadal, P.V. Farago, M.R. Sagrillo, C.W. Nogueira, L. Cruz, Diphenyl diselenide loaded poly(ϵ -caprolactone) nanocapsules with selective antitumor activity: development and cytotoxic evaluation, *Mater. Sci. Eng. C* 91 (2018) 1–9.
- [24] M. Gehrcke, M.H.M. Sari, L.M. Ferreira, A.V. Barbieri, L.M. Giuliani, V.C. Prado, J.M. Nadal, P.V. Farago, C.W. Nogueira, L. Cruz, Nanocapsules improve indole-3-carbinol photostability and prolong its antinociceptive action in acute pain animal models, *Eur. J. Pharm. Sci.* 111 (2018) 133–141.
- [25] J.M. Chassot, L.M. Ferreira, F.P. Gomes, L. Cruz, L. Tasso, Stability-indicating RP-HPLC method for determination of beclomethasone dipropionate in nanocapsule suspensions, *Braz. J. Pharm. Sci.* 51 (4) (2015) 803–810.
- [26] L. Kong, E. Amstad, M. Hui, X. Ke, D.A. Weitz, Biocompatible microcapsules with a water core templated from single emulsions, *Chin. Chem. Lett.* 28 (2017) 1897–1900.
- [27] M.F. Matus, M. Ludueña, C. Vilos, I. Palomo, M.M. Mariscal, Atomic-level characterization and cilostazol affinity of poly(lactic acid) nanoparticles conjugated with differentially charged hydrophilic molecules, *Beilstein J. Nanotechnol.* 9 (2018) 1328–1338.
- [28] H. Fessi, F. Puisieux, J.P. Devissaguet, N. Ammoury, S. Benita, Nanocapsule formation by interfacial polymer deposition following solvent displacement, *Int. J. Pharm.* 55 (1989) R1–R4.
- [29] J. Xiao, Y. Hu, J. Du, Polymer nanodisks by collapse of nanocapsules, *Sci. China Chem.* 61 (2018) 569–575.
- [30] S. D'Souza, A review of *in vitro* drug release test methods for nano-sized dosage forms, *Adv. Pharmacol.* 2014 (2014) 1–12.
- [31] R.W. Kormeyer, N.A. Peppas, Macromolecular and modeling aspects of swelling-controlled systems, in: T.J. Roseman, S.Z. Mansdorf (Eds.), *Controlled Release Delivery Systems*, Dekker, New York, NY, 1983, pp. 77–101.
- [32] V. Buch, A. Millet, B. Vacha, P. Jungwirth, J.P. Devlin, Water surface is acidic, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 104 (18) (2007) 7342–7347 May.
- [33] R.B. Gupta, U.B. Kompella (Eds.), *Nanoparticle Technology for Drug Delivery*, vol. 159, Taylor and Francis, New York, 2006.
- [34] M.R. Avadi, A.M. Sadeghi, N. Mohammadpour, S. Abedin, F. Ataybi, R. Dinarvand, M. Rafiee-Tehrani, Preparation and characterization of insulin nanoparticles using chitosan and Arabic gum with ionic gelation method, *Nanomedicine* 6 (1) (2010)

- 58–63 Feb.
- [35] I. Azouz, F. Dahmoune, F. Rezgui, C. G'Sell, Full factorial design optimization of anti-inflammatory drug release by PCL-PEG-PCL microspheres, *Mater. Sci. Eng. C* 58 (2016) 412–419.
 - [36] S.D. Li, L. Huang, Pharmacokinetics and biodistribution of nanoparticles, *Mol. Pharm.* 5 (4) (2008) 496–504.
 - [37] J.M. Nadal, M.L.S. Gomes, D.M. Borsato, M.A. Almeida, F.M. Barboza, S.F. Zawadzki, P.V. Farago, S.M.W. Zanin, Spray-dried solid dispersions containing ferulic acid: comparative analysis of three carriers, *in vitro* dissolution, antioxidant potential and *in vivo* anti-platelet effect, *Drug Dev. Ind. Pharm.* 42 (11) (2016) 1813–1824.
 - [38] J.M. Nadal, M.L.S. Gomes, D.M. Borsato, M.A. Almeida, F.M. Barboza, S.F. Zawadzki, C.C. Kanunfre, P.V. Farago, S.M.W. Zanin, Spray-dried Eudragit® L100 microparticles containing ferulic acid: formulation, *in vitro* cytoprotection and *in vivo* anti-platelet effect, *Mater. Sci. Eng. C* 64 (2016) 318–328.
 - [39] T. Shimizu, T. Osumi, K. Niimi, K. Nakagawa, Physico-chemical properties and stability of cilostazol, *Arzneimittelforschung* 35 (7A) (1985) 1117–1123.
 - [40] M.A. Almeida, J.M. Nadal, S. Grassioli, K.S. Paludo, S.F. Zawadzki, L. Cruz, J.P. Paula, P.V. Farago, Enhanced gastric tolerability and improved anti-obesity effect of capsaicinoids-loaded PCL microparticles, *Mater. Sci. Eng. C* 40 (2014) 345–356.
 - [41] J.M. Chassot, D. Ribas, E.F. Silveira, L.D. Grünspan, C.C. Pires, P.V. Farago, E. Braganhol, L. Tasso, L. Cruz, Beclomethasone dipropionate-loaded polymeric nanocapsules: development, *in vitro* cytotoxicity, and *in vivo* evaluation of acute lung injury, *J. Nanosci. Nanotechnol.* 14 (2014) 1–10.
 - [42] M.P. Patil, N.J. Gaikwad, Characterization of gliclazide-polyethylene glycol solid dispersion and its effect on dissolution, *Braz. J. Pharm. Sci.* 47 (1) (2011) 161–166.
 - [43] I. Dian, Z. Yang, F. Li, Z. Wang, X. Pan, X. Peng, X. Huang, Z. Guo, G. Quan, X. Shi, B. Chen, G. Li, C. Wu, Cubic phase nanoparticles for sustained release of ibuprofen: formulation, characterization, and enhanced bioavailability study, *Int. J. Nanomedicine* 8 (2013) 845–854.
 - [44] K.B.S. Lobato, K. Paese, J.C. Forgeirini, S.S. Guterres, A. Jablonski, A. de O. Rios, Characterization and stability evaluation of bixin nanocapsules, *Food Chem.* 141 (2013) 3906–3912.
 - [45] J. Khinast, R. Baumgartner, E. Roblegg, Nano-extrusion: a one-step process for manufacturing of solid nanoparticle formulations directly from the liquid phase, *AAPS PharmSciTech* 14 (2) (2013) 601–604.
 - [46] V.C. Mosqueira, P. Legrand, J.L. Morgat, M. Vert, E. Mysiakine, R. Gref, J.P. Devissaguet, G. Barratt, Biodistribution of long-circulating Peg-grafted nanocapsules in mice: effects of PEG chain length and density, *Pharm. Res.* 18 (10) (2001) 1411–1419.
 - [47] S.R. Steinhubl, P.B. Berger, J.T. Mann III, E.T.A. Fry, A. DeLago, C. Wilmer, E.J. Topol, Early and sustained dual oral antiplatelet therapy following percutaneous coronary intervention: a randomized controlled trial, *JAMA* 288 (19) (2002) 2411–2420.
 - [48] K. Schrör, Aspirin and platelets: the antiplatelet action of aspirin and its role in thrombosis treatment and prophylaxis, *Semin. Thromb. Hemost.* 23 (4) (1997) 349–356.

APÊNDICE 3 – PATENTE

GOMES, MONA LISA SIMIONATTO; MIGUEL, M. D.; MIGUEL, O. D.; DIAS, J.; FARAGO, PAULO VITOR; BORSATO, D. M.; NADAL, J.M.; NOVATSKI, A.

Processo de obtenção e uso de nanocápsulas poliméricas contendo cilostazol como antiagregante plaquetário, 2016. Categoria: Produto. Instituição onde foi depositada: INPI - Instituto Nacional da Propriedade Industrial. País: Brasil. Natureza: Patente de Invenção.

Número do registro: BR1020160184517.

Número do depósito PCT: 1020160184517.

Data de depósito: 11/08/2016.

Depositante/Titular: ZANIN, SANDRA MARIA WARUMBY. Depositante/Titular: Universidade Estadual de Ponta Grossa, Universidade Federal do Paraná.