

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA
SETOR DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

MONA LISA SIMIONATTO GOMES

DESENVOLVIMENTO TECNOLÓGICO E CARACTERIZAÇÃO DE
NANOCÁPSULAS POLIMÉRICAS CONTENDO CILOSTAZOL

PONTA GROSSA
2015

MONA LISA SIMIONATTO GOMES

DESENVOLVIMENTO TECNOLÓGICO E CARACTERIZAÇÃO DE
NANOCÁPSULAS POLIMÉRICAS CONTENDO CILOSTAZOL

Dissertação apresentada como requerimento parcial para obtenção do título de mestre em Ciências Farmacêuticas na Universidade Estadual de Ponta Grossa, no Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, área de concentração: Fármacos, Medicamentos e Biociências aplicadas à Farmácia.

Orientador: Prof. Dr. Paulo Vitor Farago
Coorientadora: Dr^a. Débora Maria Borsato

PONTA GROSSA
2015

Ficha Catalográfica
Elaborada pelo Setor de Tratamento da Informação BICEN/UEPG

G633 Gomes, Mona Lisa Simionatto
 Desenvolvimento tecnológico e
 caracterização de nanocápsulas poliméricas
 contendo cilostazol/ Mona Lisa Simionatto
 Gomes. Ponta Grossa, 2015.
 80f.

 Dissertação (Mestrado em Ciências
Farmacêuticas - Área de Concentração:
Fármacos, Medicamentos e Biociências
Aplicadas à Farmácia), Universidade
Estadual de Ponta Grossa.

 Orientador: Prof. Dr. Paulo Vitor
Farago.

 Coorientadora: Dr^a Débora Maria
Borsato.

 1.Claudicação intermitente. 2.Liberação
modificada. 3.Nanotecnologia. 4.Polímeros.
I.Farago, Paulo Vitor. II. Borsato,
Débora Maria. III. Universidade Estadual
de Ponta Grossa. Mestrado em Ciências
Farmacêuticas. IV. T.

CDD: 615.7



Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas

Associação Ampla entre a
Universidade Estadual do Centro-Oeste e a
Universidade Estadual de Ponta Grossa



Ata nº. 03/2015

ATA DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO – NÍVEL DE MESTRADO, DA PÓS-GRADUANDA MONA LISA SIMIONATTO GOMES, DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO *STRICTO SENSU* EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS, REALIZADA NO DIA 24 DE FEVEREIRO DE 2015, NA UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA.

Ao vigésimo quarto dia do mês de fevereiro de dois mil e quinze, às 10h00min, no Auditório do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Sala M 115 da Universidade Estadual de Ponta Grossa, sob a presidência do Prof. Dr. Paulo Vitor Farago, em sessão pública, reuniu-se a banca examinadora para a defesa de dissertação da pós-graduanda Mona Lisa Simionatto Gomes. Área de concentração: Fármacos, medicamentos e biociências aplicadas à Farmácia. Linha de Pesquisa: Desenvolvimento e controle de fármacos, medicamentos e correlatos. A banca foi constituída pelos pesquisadores: Prof. Dr. Paulo Vitor Farago (Presidente) / UEPG, Profa. Dra. Priscileila Colerato Ferrari / UEPG e Profa. Dra. Sandra Maria Warumby Zanin / UFPR, indicados pelo egrégio colegiado do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas – nível de Mestrado Acadêmico, desta Universidade, em associação ampla com a Universidade Estadual do Centro-Oeste. Iniciados os trabalhos, a presidência deu conhecimento aos membros da banca e à candidata das normas que regem a defesa de dissertação e definiu-se a ordem a ser seguida pelos examinadores para a arguição. O trabalho analisado foi **“DESENVOLVIMENTO TECNOLÓGICO E CARACTERIZAÇÃO DE NANOCAPSULAS POLIMÉRICAS CONTENDO CILOSTAZOL”**. Encerrada a defesa de dissertação, procedeu-se o julgamento, tendo sido a candidata

Aprovada (Aprovada/Reprovada). Foi dada ciência à mestranda que, de acordo com o Art. 34 do Regulamento do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas - UNICENTRO/UEPG, *para a obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas, área de concentração Fármacos, Medicamentos e Biociências aplicadas à Farmácia, o aluno tem o prazo de 30 (trinta) dias após esta defesa para entregar as cópias da versão definitiva, que devem ser aprovadas pelo orientador e homologadas pelo Colegiado de curso.* Nada mais havendo a tratar, lavrou-se à presente ata que vai assinada pelos membros da banca examinadora e por mim, Jessica Leme Cano, Jessica Leme Cano, secretária do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas pela UEPG.

Ponta Grossa, 24 de fevereiro de 2015

Observação (se necessária):

Prof. Dr. Paulo Vitor Farago – UEPG

Profa. Dra. Priscileila Colerato Ferrari – UEPG

Profa. Dra. Sandra Maria Warumby Zanin – UFPR

AGRADECIMENTOS

A Deus, por sua bondade infinita para comigo, proporcionando-me essa etapa de crescimento de vida.

À minha família, em especial à minha irmã, Mackelly Simionatto, por contribuírem para minhas conquistas pessoais e profissionais.

Ao meu orientador, professor Dr. Paulo Vitor Farago, pela oportunidade, generosidade e carinho, tendo me acolhido de braços abertos, e por ser uma referência pessoal e profissional.

À minha coorientadora Dr^a. Débora Maria Borsato, pelas orientações inteligentes, dedicação e presença amiga.

À professora M. Sc. Jessica Mendes Nadal, por sua disponibilidade generosa, solicitude e pelos ensinamentos compartilhados ao longo deste período.

À colega Daiane Mirante, pelo seu dinamismo, companheirismo, paciência, amizade e contribuições significativas em meus resultados.

À farmacêutica Traudi Klein, pelo auxílio e orientação no desenvolvimento e na validação do método analítico.

Ao professor Dr. Daniel Fernandes, que com suas sábias palavras, estimulou-me à conclusão desta etapa.

À professora Dr^a. Patrícia Döll Boscardin, professora Dr^a. Priscileila Corelato Ferrari e professora Dr^a. Sandra Maria Warumby Zanin, que como membros da banca, e aceitando meu convite com prontidão e generosidade, contribuíram com importantes e enriquecedoras sugestões.

A todos que cooperaram para a realização deste trabalho.

RESUMO

O cilostazol é um inibidor seletivo da fosfodiesterase III, atuando como antiagregante plaquetário e vasodilatador. É o medicamento de primeira escolha para o tratamento clínico da claudicação intermitente por doença arterial obstrutiva periférica. O fármaco pertence à classe II do Sistema de Classificação Biofarmacêutica, apresentando baixa solubilidade e alta permeabilidade no trato gastrointestinal. A dose usual é de 100 mg, via oral, duas vezes ao dia, o que representa uma desvantagem à adesão ao tratamento. O cilostazol tem característica lipofílica, podendo ser utilizado no desenvolvimento de sistemas de liberação modificada de fármaco, com a finalidade de melhorar sua biodisponibilidade. Assim, com o propósito de se elaborar sistemas de liberação modificada, o objetivo deste trabalho foi obter e caracterizar suspensões de nanocápsulas, a partir do uso dos polímeros poli(ϵ -caprolactona) (PCL), poli(D,L-ácido láctico-co-ácido glicólico) (PLGA) e de blendas com polietilenoglicol (PEG), PCL/PEG e PLGA/PEG, contendo concentrações de 0 a 3,0 mg.mL⁻¹ de cilostazol. O método analítico por cromatografia líquida de alta eficiência foi desenvolvido e validado para a quantificação do cilostazol presente nas nanocápsulas. Todas as formulações apresentaram valores de eficiência de encapsulação adequados ($\geq 99,6\%$). As nanocápsulas obtidas apresentaram valores de pH entre 6,0 e 6,4, com tamanho médio de partículas inferior a 137 nm, índice de polidispersão menor que 0,22 e potencial zeta negativo de -35,34 mV, devido aos polímeros aniônicos empregados. As imagens obtidas por microscopia eletrônica de transmissão e microscopia eletrônica de varredura revelaram formato esférico com superfície lisa e homogeneidade das nanocápsulas. Os resultados obtidos por difração de raios X revelaram a ausência de cristalinidade das nanocápsulas, evidenciando sua característica amorfa, em comparação aos polímeros e ao fármaco. As análises efetuadas por espectroscopia na região do infravermelho com transformada de Fourier demonstraram que não ocorreram reações químicas entre o fármaco e os polímeros. Em geral, as formulações de cilostazol obtidas a partir de blendas PCL/PEG foram as que apresentaram os melhores parâmetros de estabilidade após 60 dias de armazenamento. O uso de nanopartículas pode ser uma estratégia promissora na promoção do aumento da solubilização aparente do cilostazol melhorando seu perfil de dissolução e, conseqüentemente, sua ação farmacológica.

Palavras-chave: Claudicação intermitente, Liberação modificada, Nanotecnologia, Polímeros.

ABSTRACT

Cilostazol is a selective inhibitor of phosphodiesterase III. It acts as a vasodilator and antiplatelet agent. It is the main drug for the treatment of intermittent claudication related to peripheral arterial occlusive disease. 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. Cilostazol is a lipophilic drug and the development of controlled drug delivery systems can improve its bioavailability. The aim of this study was to obtain and characterize nanocapsules suspensions prepared from poly(ϵ -caprolactone) (PCL), poly(D,L-lactic-co-glycolic acid) (PLGA) and blends using polyethylene glycol (PEG), PCL/PEG and PLGA/PEG containing 0 to 3.0 mg.mL⁻¹ cilostazol. The analytical method was developed and validated for the quantification of cilostazol into the nanocapsules by high performance liquid chromatography. All formulations had suitable encapsulation efficiencies ($\geq 99.6\%$). Nanocapsules showed pH values between 6.0 and 6.4, average size lower than 137 nm, polydispersity index lower than 0.22 and average negative zeta potential of -35.34 mV. The images observed by electron transmission microscopy and scanning electron microscopy, revealed spherical shape with smooth surface. The results achieved by X-ray diffraction demonstrated no crystallinity which indicated the drug amorphization compared to the raw materials. Analyses performed by Fourier transform infrared spectroscopy showed no chemical reactions between drug and polymers. The formulations prepared from blends of PCL/PEG showed the best stability parameters after 60 days of storage. The use of nanoparticles can be a promising strategy for increasing the apparent solubility of cilostazol leading to better dissolution profiles and therapeutic effect.

Keywords: Intermittent claudication, Modified release, Nanotechnology, Polymers.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 -	Placa de ateroma em pacientes com claudicação intermitente por doença arterial obstrutiva periférica.....	19
Figura 2 -	Fórmula estrutural do cilostazol (CIL).....	20
Figura 3 -	Perfil de concentração plasmática (mg.mL ⁻¹) em relação ao tempo (horas) no estado estacionário após a administração de doses múltiplas de cilostazol, 100 mg duas vezes ao dia	21
Figura 4 -	Mecanismo intrínseco de ação do cilostazol no endotélio e nas plaquetas.....	23
Figura 5 -	Etapas do desenvolvimento da placa aterosclerótica	24
Figura 6 -	Representação esquemática de nanocápsulas e nanoesferas poliméricas.....	28
Figura 7 -	Estrutura química da poli(ε-caprolactona) – PCL	31
Figura 8 -	Estrutura química do polímero poli (D,L-ácido láctico-co-ácido glicólico) – PLGA	32
Figura 9 -	Fórmula estrutural do PEG.....	34
Figura 10 -	Representação esquemática de nanocápsula polimérica com cadeias de PEG em sua superfície.....	34
Figura 11 -	Fluxograma das etapas realizadas no desenvolvimento da pesquisa	38
Figura 12 -	Representação do método de obtenção de nanocápsulas poliméricas	39
Figura 13 -	Cromatograma do CIL (20 µg.mL ⁻¹).....	47
Figura 14 -	Cromatograma das formulações NC1-PCL/PEG (A) e NC0-PCL/PEG (B).....	48
Figura 15 -	Cromatograma das formulações NC3-PLGA/PEG (AC) e NC0-PLGA/PEG (D).....	48
Figura 16 -	Representação gráfica da curva analítica média para a determinação do CIL obtida em CLAE (λ = 254 nm) em acetonitrila 47%	49
Figura 17 -	Fotomicrografia obtida por MET da suspensão de nanocápsulas NC2-PCL (A) e NC2-PCL/PEG (B) (aumento de 25000 x)	56

Figura 18 -	Fotomicrografias obtidas por MEV da suspensão de nanocápsulas NC3-PLGA (A) em aumento de 15000x NC3-PLGA/PEG (B) em aumento de 24000 x.....	57
Figura 19 -	Fotomicrografias obtidas por MEV da suspensão de nanocápsulas NC2-PCL (C) e NC3-PCL/PEG (D) em aumento de 15000 x.....	57
Figura 20 -	Difratogramas do cilostazol (A) e dos polímeros PCL (B), PLGA (C) e PEG (D).....	58
Figura 21 -	Difratogramas do cilostazol, do polímero PCL, da mistura física (CIL:PCL, 1:1 m/m) e das suspensões de nanocápsulas preparadas com PCL	59
Figura 22 -	Difratogramas do cilostazol, dos polímeros PCL e PEG, da mistura física (CIL:PCL:PEG, 1:1:1 m/m) e das suspensões de nanocápsulas preparadas com blendas PCL/PEG	59
Figura 23 -	Difratogramas do cilostazol, do polímero PLGA, da mistura física (CIL:PLGA, 1:1 m/m) e das suspensões de nanocápsulas preparadas com PLGA	60
Figura 24 -	Difratogramas do cilostazol, dos polímeros PLGA e PEG, da mistura física (CIL:PLGA:PEG, 1:1:1 m/m) e das suspensões de nanocápsulas preparadas com blendas PLGA/PEG	60
Figura 25 -	Espectro IVTF do cilostazol	62
Figura 26 -	Espectro IVTF do polímero PCL	63
Figura 27 -	Espectro IVTF do polímero PLGA	63
Figura 28 -	Espectro IVTF do polímero PEG	64
Figura 29 -	Espectro IVTF do polímero (PCL), do cilostazol (CIL), da mistura física (MF): cilostazol + PCL (1:1 m/m) e das suspensões de nanocápsulas de PCL em diferentes concentrações	65
Figura 30 -	Espectro de IVTF dos polímeros (PCL) e (PEG), do cilostazol (CIL), da mistura física (MF): CIL+PCL+PEG (1:1:1 m/m) e das suspensões de blendas de PCL/PEG em diferentes concentrações	66
Figura 31 -	Espectro IVTF do polímero (PLGA), do cilostazol (CIL), da mistura física (MF): cilostazol + PLGA (1:1 m/m) e das suspensões de nanocápsulas de PLGA em diferentes concentrações	67

Figura 32-	Espectro de IVTF dos polímeros (PLGA) e (PEG), do cilostazol (CIL), da mistura física (MF): CIL+PLGA+PEG (1:1:1 m/m) e das suspensões de nanocápsulas de blendas de PLGA/PEG em diferentes concentrações.....	67
Figura 33 -	Valores de pH, após a preparação e após 60 dias para as formulações obtidas a partir de PCL (A), de PCL/PEG (B), de PLGA (C) e PLGA/PEG (D)	69
Figura 34 -	Tamanho médio de partícula, após a preparação e após 60 dias para as formulações obtidas a partir de PCL (A), de PCL/PEG (B), de PLGA (C) e PLGA/PEG (D)	69
Figura 35 -	Índice de polidispersão, após a preparação e após 60 dias para as formulações obtidas a partir de PCL (A), de PCL/PEG (B), de PLGA (C) e PLGA/PEG (D)	70
Figura 36 -	Potencial zeta, após a preparação e após 60 dias para as formulações obtidas a partir de PCL (A), de PCL/PEG (B), de PLGA (C) e PLGA/PEG (D)	71

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Composição das formulações das suspensões poliméricas	39
Tabela 2 -	Resultados obtidos por ANOVA para linearidade do método analítico	50
Tabela 3 -	Resultados obtidos para os ensaios de precisão na análise do cilostazol	51
Tabela 4 -	Porcentagem de recuperação e DPR obtidos a partir da análise de exatidão (n = 3)	51
Tabela 5 -	Teor de cilostazol encapsulado e eficiência de encapsulação (n = 3)	53
Tabela 6 -	Caracterização físico-química das suspensões de nanocápsulas (n = 3)	54

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

AMC	<i>Analytical Methods Committee</i>
ANOVA	Análise de variância
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
CIL	Cilostazol
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência
CV%	Coeficiente de variação percentual
DP	Desvio padrão
DPR	Desvio padrão relativo
EE	Eficiência de encapsulação
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
IVTF	Infravermelho com transformada de Fourier
NC0-PCL	Suspensões de nanocápsulas de PCL sem cilostazol
NC1-PCL	Suspensões de nanocápsulas de PCL com cilostazol (1,0 mg.mL ⁻¹)
NC2-PCL	Suspensões de nanocápsulas de PCL com cilostazol (2,0 mg.mL ⁻¹)
NC3-PCL	Suspensões de nanocápsulas de PCL com cilostazol (3,0 mg.mL ⁻¹)
NC0- PCL/PEG	Suspensões de nanocápsulas de PCL/PEG sem cilostazol
NC1-PCL/PEG	Suspensões de nanocápsulas de PCL/PEG com cilostazol (1,0 mg.mL ⁻¹)
NC2-PCL/PEG	Suspensões de nanocápsulas de PCL/PEG com cilostazol (2,0 mg.mL ⁻¹)
NC3-PCL/PEG	Suspensões de nanocápsulas de PCL/PEG com cilostazol (3,0 mg.mL ⁻¹)
NC0-PLGA	Suspensões de nanocápsulas de PLGA sem cilostazol
NC1-PLGA	Suspensões de nanocápsulas de PLGA com cilostazol (1,0 mg.mL ⁻¹)
NC2-PLGA	Suspensões de nanocápsulas de PLGA com cilostazol (2,0 mg.mL ⁻¹)

NC3-PLGA	Suspensões de nanocápsulas de PLGA com cilostazol (3,0 mg.mL ⁻¹)
NC0-PLGA/PEG	Suspensões de nanocápsulas de PLGA/PEG sem cilostazol
NC1-PLGA/PEG	Suspensões de nanocápsulas de PLGA/PEG com cilostazol (1,0 mg.mL ⁻¹)
NC2-PLGA/PEG	Suspensões de nanocápsulas de PLGA/PEG com cilostazol (2,0 mg.mL ⁻¹)
NC3-PLGA/PEG	Suspensões de nanocápsulas de PLGA/PEG com cilostazol (3,0 mg.mL ⁻¹)
IPD	Índice de polidispersão
ICH	<i>International Conference on Harmonization of Technical Requirements for the Registration of Pharmaceuticals for Human Use</i>
KBr	Brometo de potássio
kV	Quilovolts
LD	Limite de detecção
LQ	Limite de quantificação
mA	Miliampere
MEV	Microscopia eletrônica de varredura
MFA	Microscopia de força atômica
MF	Mistura física
$\overline{Mw}$	Massa molar numérica média
N	Número de repetições
PCL	Poli(ϵ -caprolactona)
PEG	Polietilenoglicol
pH	Potencial hidrogeniônico
PLA	Poli(ácido láctico)
PLGA	Poli(D,L-ácido láctico-co-ácido glicólico)
PTFE	Politetrafluoroetileno
PZ	Potencial zeta
R	Coeficiente de correlação
Span® 80	Monooleato de sorbitano

TCC	Triglicerídeos dos ácidos cáprico /caprílico
Tween® 80	Polissorbato 80, monooleato de sorbitano etoxilado
λ	Comprimento de onda

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	16
2.	OBJETIVOS.....	18
2.1	Objetivo geral	18
2.2	Objetivos específicos	18
3.	REVISÃO DA LITERATURA	19
3.1	Doença aterosclerótica e Claudicação intermitente.....	19
3.2	Aspectos biofarmacêuticos do cilostazol	20
3.2.1	Estrutura química e propriedades físico-químicas.....	20
3.2.2	Farmacocinética.....	21
3.2.3	Mecanismo de ação do cilostazol.....	22
3.2.4	Ações farmacológicas do cilostazol.....	23
3.2.5	Indicação do uso de cilostazol.....	24
3.2.6	Posologia e esquema terapêutico do cilostazol.....	25
3.2.7	Efeitos colaterais do uso de cilostazol.....	25
3.2.8	Formas farmacêuticas de liberação modificada contendo cilostazol.....	26
3.3	Nanopartículas poliméricas como sistemas de liberação modificada de fármacos	26
4.	MATERIAL E MÉTODOS	35
4.1	Equipamentos	35
4.2	Reagentes e solventes	36
4.2.1	Fármaco.....	36
4.2.2	Polímeros.....	36
4.2.3	Água Purificada.....	36
4.2.4	Solventes e demais reagentes.....	37
4.2.5	Outros materiais.....	36

4.3	Desenho experimental	37
4.4	Procedimento experimental	38
4.4.1	Obtenção das suspensões de nanocápsulas poliméricas.....	38
4.4.1.1	Obtenção das misturas físicas	41
4.4.2	Determinação do cilostazol incorporado às nanocápsulas poliméricas e eficiência de encapsulação.....	41
4.4.2.1	Desenvolvimento e validação do método analítico por CLAE.....	41
4.4.2.1.1	Equipamentos e condições cromatográficas	42
4.4.2.1.2	Validação do método para a quantificação do cilostazol incorporado às nanocápsulas	42
4.4.2.1.3	Análise estatística da validação do método analítico por CLAE	43
4.4.3	Caracterização das suspensões de nanocápsulas poliméricas.....	44
4.4.3.1	Determinação do pH	44
4.4.3.2	Determinação do diâmetro médio e do potencial zeta	44
4.4.3.3	Análises morfológicas e de superfície por microscopia eletrônica de transmissão (MET)	44
4.4.3.4	Análises morfológicas e de superfície por microscopia eletrônica de varredura (MEV)	44
4.4.3.5	Análise por difração de raios X (DRX)	45
4.4.3.6	Avaliação por espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (IVTF)	45
4.4.4	Estudo de estabilidade.....	45
4.4.4.1	Análise estatística do estudo de estabilidade	46
5.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	46
5.1	Obtenção das suspensões de nanocápsulas poliméricas.....	46
5.2	Determinação do cilostazol encapsulado às nanocápsulas poliméricas e eficiência de encapsulação (EE).....	46
5.2.1	Validação do método	47
5.2.1.1	Especificidade	47

5.2.1.2	Linearidade.....	49
5.2.1.3	Limite de Detecção (LD) e Limite de Quantificação (LQ).....	50
5.2.1.4	Precisão	50
5.2.1.5	Exatidão	51
5.2.1.6	Robustez	52
5.2.2	Determinação do teor de cilostazol incorporado nas nanocápsulas e eficiência de encapsulação	53
5.3	Caracterização das suspensões de nanocápsulas poliméricas.....	55
5.4	Análise por microscopia eletrônica de transmissão (MET).....	55
5.5	Análise por microscopia eletrônica de varredura (MEV).....	56
5.6	Análise por difração de raios X (DRX).....	57
5.7	Espectroscopia de absorção na região do infravermelho (IVTF).....	61
5.8	Estudo de estabilidade das suspensões de nanocápsulas poliméricas.....	68
6.	CONCLUSÕES	73
7.	REFERÊNCIAS.....	74

1 INTRODUÇÃO

A V Diretriz Brasileira de Dislipidemias (2013) define a aterosclerose como sendo uma doença inflamatória crônica de origem multifatorial que ocorre em resposta à agressão endotelial, acometendo principalmente a camada íntima de artérias de médio e grande calibre. A formação da placa aterosclerótica inicia-se com a agressão ao endotélio vascular devida a diversos fatores de risco como elevação de lipídeos séricos, hipertensão arterial, diabetes, obesidade ou tabagismo. Alguns mediadores da inflamação estimulam a migração e proliferação das células musculares lisas da camada média arterial que formará parte da capa fibrosa da placa aterosclerótica. A ruptura desta capa leva à formação de um trombo neste local, o que diminui o fluxo sanguíneo resultando em alterações vasculares e sistêmicas significativas.

A doença arterial obstrutiva periférica (DAOP) causada pela aterosclerose dos membros inferiores apresenta como principal manifestação, a claudicação intermitente (CI), e que é definida a partir de um quadro de sintomas como: dor, câibras, entorpecimento ou fadiga dos músculos das pernas após caminhada, os quais são aliviados em poucos minutos de descanso. A qualidade de vida do paciente apresenta-se reduzida pela tendência de sintomas depressivos associados com a restrição de mobilidade (HONG; MACKEY, 2014).

O fármaco de escolha para o tratamento da claudicação intermitente é o cilostazol (CIL) (BORGES, 2009). Esse fármaco é um antiagregante plaquetário e antitrombótico com ação vasodilatadora, cuja ação é de inibir potente e seletivamente a fosfodiesterase III, promovendo relaxamento dos vasos sanguíneos (ROSA; BARONI; PORTAL, 2008).

Entretanto, o esquema terapêutico apresenta-se prejudicado pelos efeitos colaterais do medicamento vinculado à administração em duas doses diárias de 100 mg. Entre os efeitos colaterais mais comuns, destacam-se: cefaleia, taquicardia, palpitações, fezes pastosas e diarreia (ROSA et al., 2008).

Muitos fármacos, empregados sem qualquer modificação química ou físico-química, resultam efeitos farmacológicos reduzidos ou na presença de efeitos colaterais. O uso de nanocarreadores pode oferecer numerosas vantagens, comparados às formas farmacêuticas convencionais. Tais sistemas possibilitam a associação de um fármaco a um sistema que permita a alteração e/ou adequação

de suas propriedades físico-químicas, sem alterar a sua estrutura química. Portanto, são úteis para carrear fármacos hidrofóbicos e protegê-los frente à degradação no meio biológico, e ainda, por reduzir os efeitos colaterais indesejáveis.

Nesse contexto, a existência de poucos trabalhos voltados à liberação modificada do cilostazol, aliada aos seguintes fatores: I) necessidade de aumentar a disponibilidade biológica do fármaco, reduzindo a posologia de 2 vezes ao dia para 1 vez ao dia, favorecendo a adesão do paciente ao tratamento; II) necessidade de redução dos efeitos colaterais, principalmente, almejando uma distribuição mais seletiva e ofertando uma maior segurança na administração; e III) necessidade de otimizar a atividade vasodilatadora e antiagregante plaquetária do cilostazol, são os principais argumentos que justificam a realização do presente estudo.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Desenvolver e caracterizar nanocápsulas poliméricas contendo cilostazol para uso potencial no tratamento farmacológico da claudicação intermitente.

2.2 Objetivos específicos

- Obter suspensões de nanocápsulas contendo CIL, a partir dos polímeros poli(ϵ -caprolactona)(PCL), poli(D,L-ácido láctico-co-ácido glicólico) (PLGA) e de blendas PCL/polietilenoglicol (PEG) e PLGA/PEG;
- Determinar a concentração do CIL incorporado nas nanocápsulas poliméricas pelo método de cromatografia líquida de alta eficiência, previamente validado, avaliando a eficiência de encapsulação do fármaco;
- Caracterizar as nanocápsulas poliméricas por meio de análises físico-químicas, morfológicas e espectroscópicas;
- Investigar a estabilidade das nanocápsulas poliméricas durante 60 dias de armazenamento à temperatura ambiente.

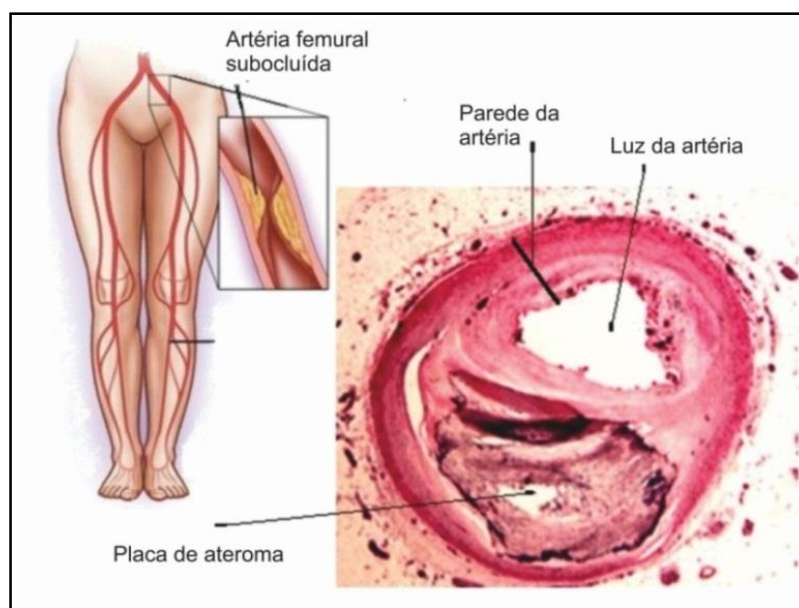
3 REVISÃO DA LITERATURA

3.1 Doença aterosclerótica e claudicação intermitente

A doença aterosclerótica pode comprometer todo o sistema arterial, resultando em sérias complicações cardiovasculares e levando a óbito um grande número de pacientes, tanto em países desenvolvidos quanto em desenvolvimento. Sua manifestação mais comum é a DAOP. 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, e um terço delas tem claudicação intermitente (TORRENT et al., 2014).

A claudicação intermitente resulta da DAOP devido à aterosclerose da aorta abdominal e das artérias dos membros inferiores (Figura 1).

Figura 1: Placa de ateroma em paciente com claudicação intermitente por doença arterial obstrutiva periférica



Fonte: MEDICINA GERIÁTRICA. Disponível em: www.medicinageriatrica.com.br/tag/clauidacao-intermitente/ Acesso em: 25 nov. 2014

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 no quadril, glúteos, coxas, panturrilhas ou pés, induzidos pelo exercício e aliviados com repouso (OLIN, 2002).

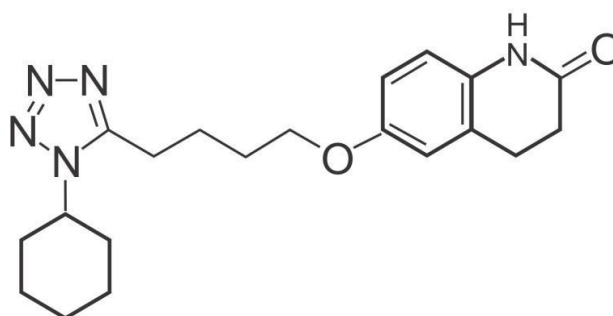
Com o intuito de aumentar a capacidade funcional e melhorar a claudicação intermitente e a qualidade de vida do paciente, o CIL é o agente farmacológico de primeira escolha para esse fim. Apresenta propriedades vasodilatadoras e antiagregante plaquetária emergindo como uma eficiente opção no combate às graves consequências desse processo patológico (NORGREN et al., 2007).

3.2 Aspectos biofarmacêuticos do cilostazol

3.2.1 Estrutura química e propriedades físico-químicas

O CIL é um derivado quinolônico (2-oxo-quinolona). A fórmula empírica do CIL é $C_{20}H_{27}N_5O_2$, com massa molecular de $369,46 \text{ g.mol}^{-1}$ e fórmula estrutural 6-[4-(1-ciclohexil-1H-tetrazol-5-il)butoxi]-3,4-diidro-2(1H)-quinolinona, representada na Figura 2. Ocorre 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) (SHIMIZU et al., 1985; SHI et al., 2005).

Figura 2: Fórmula estrutural do cilostazol



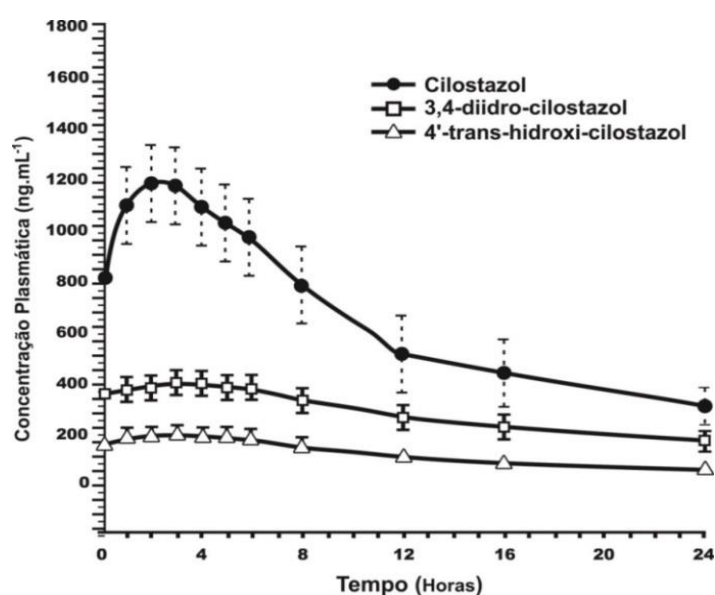
3.2.2 Farmacocinética

O CIL pertence ao Grupo II do Sistema de Classificação Biofarmacêutica (SCB), o qual possui baixa solubilidade e alta permeabilidade (WU, BENET, 2005; CHEN et al., 2014).

A biodisponibilidade relativa do CIL 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. A biodisponibilidade absoluta não é conhecida e sua absorção é aumentada pela associação com alimentos gordurosos. O início de ação ocorre duas a quatro semanas após o início do tratamento. Uma porcentagem de 95 a 98% do CIL se ligam às proteínas plasmáticas, predominantemente à albumina. Sofre biotransformação hepática pelas enzimas do citocromo P450 e os principais metabólitos produzidos são ativos, o 3,4-diidro-cilostazol (97,4%) e o 4'-*trans*-hidroxi-cilostazol (66%)(CEBRIM/CFF, 2004).

O CIL e os seus metabólitos ativos acumulam-se, em média, duas vezes mais com a administração gradualmente crescente do fármaco e atingem os níveis plasmáticos em estado estacionário dentro de poucos dias (Figura 3) (DRUG INDEX, 2007).

Figura 3: Perfil de concentração plasmática (mg.mL^{-1}) em relação ao tempo (horas) no estado estacionário após a administração de doses múltiplas de cilostazol, 100 mg duas vezes ao dia



Fonte: RXLIST. Disponível em: <http://www.rxlist.com/pletal-drug/clinical-pharmacology.htm/> Acesso em 25 nov. 2014

Cerca de 75% do CIL é excretado pela urina e de 20% pelas fezes, somente nas formas biotransformadas. A meia-vida de eliminação é de 11 a 13 horas (CEBRIM/CFF, 2004).

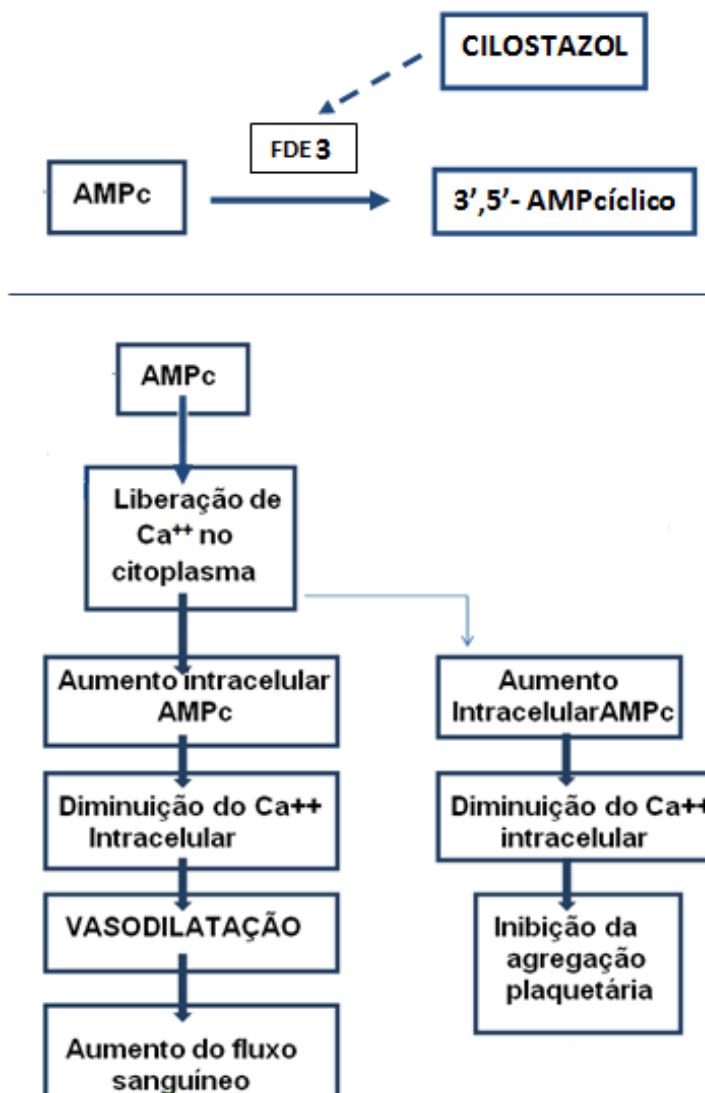
3.2.3 Mecanismo de ação do cilostazol

O monofosfato de adenosina cíclico (AMPc) é um mensageiro químico que desempenha um papel fundamental na regulação da proliferação celular, apoptose, agregação de plaquetas e dilatação dos vasos sanguíneos. Tal processo de promoção e de regulação ocorre devido a sua conversão em 3',5'- AMP cíclico pela atividade da enzima fosfodiesterase III (FDE3). O CIL é um potente e seletivo inibidor da FDE3 (Figura 4). Sua ação é justificada por evitar a agregação plaquetária e estimular o relaxamento dos vasos pelo aumento dos níveis de AMPc (KOHDA et al., 1999; CRAIG, 2001; MORISHITA, 2006; ROSA; BARONI; PORTAL, 2008).

Também inibe reversivelmente a agregação plaquetária induzida pelo difosfato de adenosina (ADP), colágeno, ácido araquidônico, epinefrina, tromboxano A₂, fator de ativação plaquetária e o estresse associado à deformação da plaqueta. Outras propriedades incluem broncodilatação e diminuição da concentração plasmática de trombomodulina em diabéticos (CEBRIM/CFF, 2004).

Devido às propriedades vasodilatadoras, o CIL atua regulando o tônus vasomotor arterial que abrange tanto, a microcirculação cerebral, quanto os vasos de membros inferiores. Também estimula canais de potássio ativados por cálcio, o que leva a hiperpolarização da membrana plasmática, ao relaxamento da musculatura e contribui para os efeitos inibidores da reestenose pós-angioplastia pelo uso deste fármaco (BORGES, 2009).

Figura 4: Mecanismo intrínseco de ação do cilostazol no endotélio e nas plaquetas



Fonte: Adaptado de ZHAO et al., 2007

3.2.4 Ações farmacológicas do cilostazol

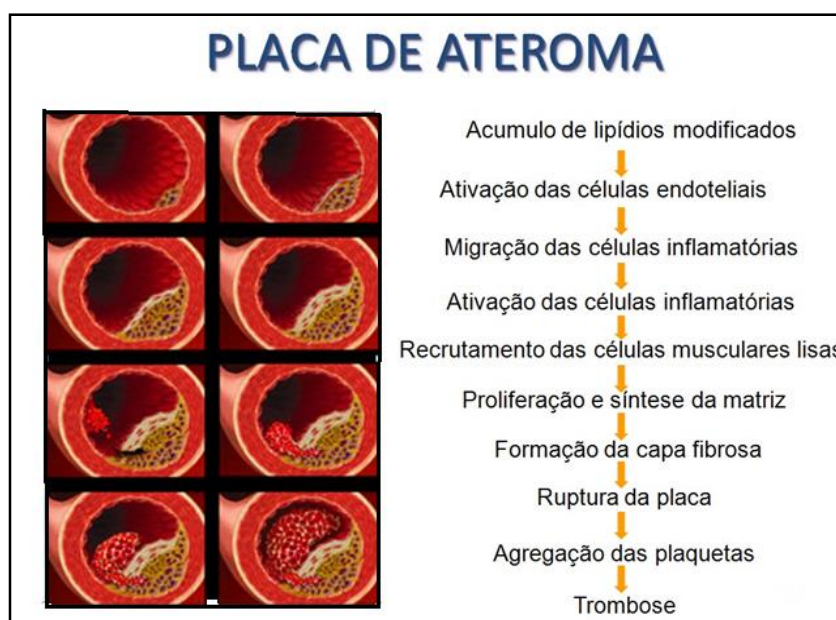
Como já mencionado, o CIL é um antiagregante plaquetário e antitrombótico com ação vasodilatadora, não existindo evidências de prolongamento do tempo de sangramento quando comparado a outros medicamentos como ácido acetilsalicílico (AAS), clopidogrel ou ticlopidino, mesmo nas diversas combinações (ROSA et al., 2008).

Inibe a replicação e o crescimento das células musculares lisas da artéria (BORGES, 2009). Tal fato leva a um efeito antiproliferativo responsável pela prevenção de reestenose após *stent* coronariano (ROSA; BARONI; PORTAL, 2008).

Na dislipidemia, é capaz de reduzir eficazmente os níveis séricos de triglicerídeos e de elevar significativamente o HDL-colesterol no sangue, promovendo a redução do risco cardiovascular, principalmente em pessoas com diabetes mellitus (DM) (BORGES, 2009).

Pode reduzir marcadores inflamatórios envolvidos na resposta à lesão endotelial da aterosclerose, controlando a adesão de leucócitos mononucleares, migração e proliferação de células musculares lisas, além da deposição de matriz extracelular (Figura 5) (ROSA; BARONI; PORTAL, 2008).

Figura 5: Etapas do desenvolvimento da placa aterosclerótica



Fonte: BIOQUÍMICA CELULAR. Disponível em: bioquimica.faculdade.zip.net/Acesso em 25 nov. 2014

3.2.5 Indicação do uso de cilostazol

O CIL foi lançado no Japão e em outros países asiáticos em 1988 e aprovado nos Estados Unidos em 1999, para o tratamento clínico da claudicação intermitente por DAOP. Tornou-se o medicamento de primeira escolha para este fim, de acordo com as diretrizes atuais (BORGES, 2009).

O tratamento é independente do gênero, da idade, do hábito de fumar, da presença de DM, do uso concomitante de betabloqueadores ou de antagonistas do cálcio. O CIL demonstrou ser de uso seguro em pacientes com infarto agudo do

miocárdio, apesar de aumentar o índice cardíaco, o fluxo coronariano e a contratilidade (ROSA; BARONI; PORTAL, 2008).

3.2.6 Posologia e esquema terapêutico do cilostazol

A dose recomendada de CIL para tratar os sintomas de claudicação intermitente é de 100 mg, duas vezes ao dia, 30 minutos antes ou duas horas após as refeições. O tempo para a resposta terapêutica pode variar entre duas a quatro semanas, em alguns casos pode requerer doze semanas. Quando houver a coadministração de inibidores do citocromo, como cetoconazol, itraconazol, eritromicina, diltiazem e omeprazol, a dose deverá ser reduzida pela metade, 50 mg, duas vezes ao dia (CEBRIM/CFF, 2004).

3.2.7 Efeitos colaterais do uso de cilostazol

Os efeitos colaterais mais frequentes incluem cefaleia, taquicardia, palpitações, fezes pastosas e diarreia (ROSA et al., 2008). Outros efeitos também são relatados como: 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).

Considerando o expressivo número de efeitos colaterais, 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.

3.2.8 Formas farmacêuticas de liberação modificada contendo cilostazol

A literatura relata poucos trabalhos versando sobre a alteração da liberação do CIL.

Gawali et al. (2009) elaboraram complexos de inclusão entre β -ciclodextrina e CIL por meio de diferentes métodos de obtenção. Esses autores relataram que o complexo de inclusão preparado por liofilização apresentou um aumento na solubilização aparente do fármaco e melhorou o seu perfil de dissolução, sendo uma estratégia interessante para a liberação rápida do fármaco. Estudo semelhante foi relatado por Patel e Rajput (2009), onde os complexos de inclusão de CIL-dimetil-beta-ciclodextrina (1:3), preparados pelo método de co-precipitação, resultaram em um aumento de 2,10 vezes na taxa de absorção e de dissolução em comparação com a apresentação comercial de CIL (Pletoz[®] 50 mg) e aumento de 2,97 vezes em relação ao CIL puro.

Pund, Shete e Jagadale (2014) demonstraram que nanoemulsões lipídicas de CIL apresentaram 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.

3.3 Nanopartículas poliméricas como sistemas de liberação modificada de fármacos

A nanotecnologia farmacêutica é uma área das ciências farmacêuticas direcionada ao desenvolvimento, à caracterização e à aplicação de sistemas terapêuticos em escala nanométrica. O estudo desses sistemas tem sido realizado com o objetivo de direcionar e/ou controlar a liberação de inúmeros fármacos (SAKATA et al., 2007).

Essa tecnologia surgiu a partir de 1960, resultante do elevado desenvolvimento da microencapsulação, técnica de transformação de líquidos (polímeros e outras substâncias) em pós com tamanhos de partículas micrométricos. A microencapsulação já apresentava um amplo potencial em diversas indústrias, como, por exemplo, na área alimentícia, têxtil, farmacêutica e cosmética, pela proteção que confere às substâncias lábeis e voláteis (MARQUES et al., 2009).

Entretanto, foi no final da década de 1960 que Peter Paul Speiser desenvolveu as primeiras nanopartículas. Embora seu objetivo inicial fosse a liberação sustentada a partir de nanocápsulas, com o propósito de permitir a administração intravenosa, Speiser centrou-se no desenvolvimento de nanopartículas para fins de vacinação e não para a liberação de fármacos (KREUTER, 2007).

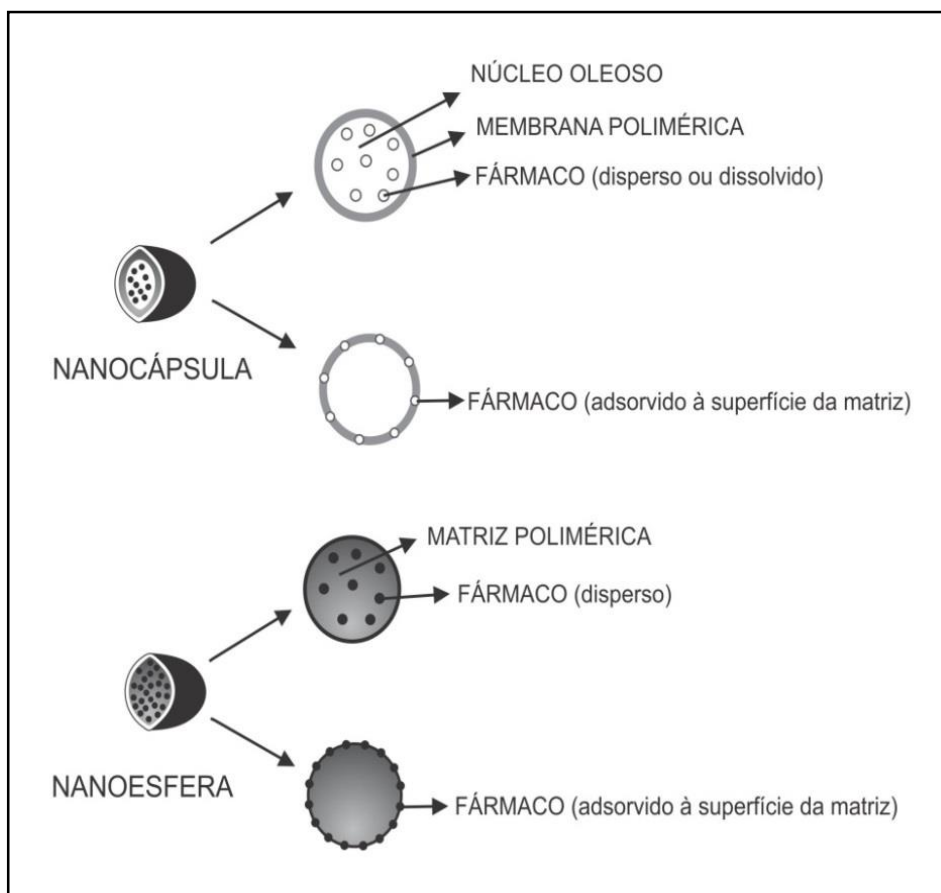
Atualmente, a nanotecnologia farmacêutica compreende a investigação de diferentes sistemas nanoestruturados como: nanopartículas poliméricas, nanopartículas lipídicas sólidas, lipossomas e nanoemulsões; além de se interessar pela consequente aplicação desses sistemas como dispositivos carreadores de fármacos, proteínas, genes e vacinas. A versatilidade, a flexibilidade e a adaptabilidade dos sistemas de liberação nanoestruturados são algumas das vantagens dessa tecnologia, que têm provado seus benefícios na área médica/farmacêutica, principalmente no aumento da adesão à terapêutica pelos pacientes (LU et al., 2004).

Essa área de estudo, de intensa pesquisa nos últimos anos, investe no controle da liberação de fármacos em sítios específicos de ação, inclusive usando vetores que permitam a otimização da velocidade de liberação e o regime posológico.

As nanopartículas, constituídas por polímeros biodegradáveis, têm sido alvo de grande interesse dos pesquisadores, devido às suas potencialidades terapêuticas e à maior estabilidade nos fluídos biológicos e durante o armazenamento (SCHAFFAZICK et al., 2003).

As nanopartículas poliméricas são sistemas carreadores de fármacos que apresentam diâmetro inferior a 1 μm . O termo nanopartícula inclui as nanocápsulas e as nanoesferas, as quais diferem entre si segundo a composição e organização estrutural (Figura 6). As nanocápsulas apresentam um invólucro polimérico ao redor de um núcleo oleoso, onde o fármaco pode estar dissolvido nesse núcleo e/ou estar aderido à superfície da partícula na parede polimérica. Em contrapartida, as nanoesferas são destituídas de óleo em sua composição, sendo formadas por uma matriz polimérica, na qual o fármaco pode ficar retido ou adsorvido (PUISIEUX et al., 1994).

Figura 6: Representação esquemática de nanocápsulas e nanoesferas poliméricas



Fonte: Adaptado de KUMARI; YADAV; YADAV, 2010

As nanopartículas são capazes de proteger o fármaco da degradação (estabilidade física durante o armazenamento e nos fluídos biológicos) e promover vantajosas propriedades *in vivo*, como o aumento da sua absorção, a maior capacidade de ultrapassar barreiras biológicas, a distribuição diferenciada e otimizada. Dessa forma, podem ser direcionadas para células e tecidos específicos (macrófagos, células tumorais, cérebro, etc.), uma vez que a superfície e a carga superficial podem ser modificadas pela inserção de determinados ligantes, como, por exemplo: anticorpos, tensoativos, polímeros, entre outros. Assim, são estratégias de alto desempenho para prolongar a liberação do fármaco e, conseqüentemente, potencializar o tempo de meia-vida nos compartimentos biológicos (OPPENHEIM, 1981; ALLÉMAN et al., 1993).

O preparo baseia-se na razão fármaco/polímero adequada à obtenção de uma eficiência de encapsulação elevada e toxicidade reduzida. Em regra, a escolha

de um método de preparação é determinada pelas características de solubilidade da substância terapeuticamente ativa (QUINTANAR-GUERRERO et al., 1998; VAUTHIER; BOUCHEMAL, 2009).

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 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).

Segundo Pinto Reis et al. (2006) e Souto et al. (2012), são muitos os métodos relatados na literatura para o preparo de sistemas constituídos por nanopartículas poliméricas, que podem ser classificados baseando-se na polimerização de monômeros ou no uso de polímeros pré-formados. A metodologia de polimerização não é amplamente utilizada, pois pode formar polímeros não biodegradáveis e ainda, levar à toxicidade da formulação por meio da presença de moléculas residuais (PINTO REIS et al., 2006).

Os métodos de preparação de nanoesferas a partir de polímeros pré-formados, como poliésteres alifáticos, são particularmente adaptados para incorporar fármacos lipofílicos. Os mesmos oferecem maior rendimento e são de fácil controle (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).

Dentre os diversos métodos de obtenção de nanocápsulas, destaca-se o método de deposição interfacial do polímero pré-formado, estabelecido e descrito por Fessi e colaboradores (1989). Baseia-se na dissolução do fármaco, polímero, óleo e tensoativo em um solvente orgânico miscível em água constituindo a fase orgânica, a qual 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 entre as fases levando à formação de pequenas gotículas de solvente orgânico, devido ao aumento da área de superfície. 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. A acetona tem sido empregada como solvente orgânico de escolha para tais preparações.

As nanocápsulas formadas por este método apresentam tamanho médio entre 200 e 350 nm (GUTERRES et al., 2007), característica fundamental para o transporte de forma eficiente na corrente sanguínea (GUPTA e KOMPELLA, 2006).

Em resumo, os fatores que influenciam o tamanho das nanocápsulas poliméricas são: a concentração e a natureza química do polímero, do fármaco, do óleo e do tensoativo e, finalmente, o método de preparação. 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 et al., 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).

Entre os óleos utilizados, os triglicerídeos dos ácidos cáprico/caprílico são os mais empregados, devido a sua biocompatibilidade e solubilidade de grande escala de fármacos. Outros óleos como, por exemplo, girassol, soja, benzoato de benzila, álcool benzílico, ácido oleico e oleato de etila são boas alternativas de uso, embora não muito frequentemente utilizados (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).

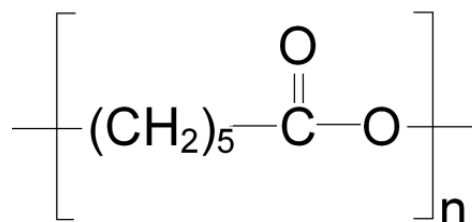
Quanto aos polímeros, devem ser biocompatíveis e biodegradáveis. Podem ser de origem natural, como: albumina, gelatina, quitosana e colágeno; ou sintéticos, como: poli(ácido láctico) (PLA), poli(ácido láctico-co-ácido glicólico) (PLGA), poli(ϵ -caprolactona) (PCL), polietilenoglicol (PEG), entre outros.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

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 (SALTZMAN, 2001; COIMBRA, 2010).

A PCL, cuja estrutura química está representada na Figura 7, é um poliéster alifático de cadeia linear, semicristalino e de caráter hidrofóbico. Possui boas propriedades mecânicas e apresenta facilidade em formar blendas com outros polímeros. Apesar das suas propriedades promissoras, possui uma baixa

temperatura de fusão (59 - 64°C), o que pode gerar problemas durante o processamento (AMASS et al, 1998; WESSLER, 2006; MARIANI, 2010; SOLOMÃO, 2011).

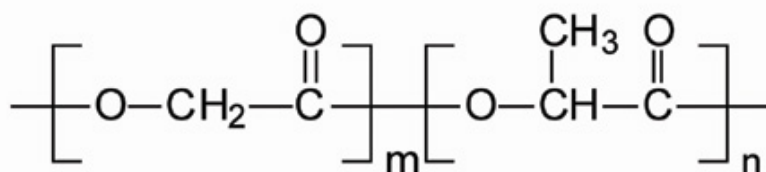
Figura 7: Estrutura química da poli(ε-caprolactona) – PCL



A degradação da PCL ocorre por hidrólise de suas ligações ésteres, sendo os produtos de degradação completamente aproveitados pelo metabolismo (REZWAN et al., 2006, PINTO, 2007). Entretanto, em relação a polímeros como PLA e PLGA, sua lenta degradação devido a sua elevada hidrofobicidade dificulta a penetração da água nas cadeias poliméricas (NAIR; LAURECIN, 2007). Possui menor custo de produção e promove a liberação de fármacos por um período mais prolongado (AL HAUSHEY et al., 2007).

O PLGA (Figura 8) é um copolímero sintético formado a partir de monômeros de ácido láctico e ácido glicólico, em diferentes proporções. É um poliéster relativamente hidrofóbico, instável na presença de umidade, biocompatível e biodegradável a subprodutos atóxicos, produzido a partir de recursos renováveis (ROBINSON, 1995). Necessita de um menor tempo para sua completa degradação, através de hidrólise, implicando em menor probabilidade de reações adversas (ERBETTA, 2009). Seus metabólitos são totalmente reabsorvidos pelo organismo ao serem incorporados nas rotas metabólicas (DANHIER et al.; 2012).

Figura 8: Estrutura química do polímero poli (D,L-ácido láctico-co-ácido glicólico) – PLGA



A cristalinidade do PLGA é influenciada pelos isômeros moleculares e pela razão molar dos ácidos láctico e glicólico envolvidos em sua composição, que estando na razão molar 50:50, apresentam caráter amorfo e, conseqüentemente, são hidrolisados mais rapidamente em relação ao padrão cristalino (DANHIER et al.; 2012).

Por essas razões, as pesquisas de nanopartículas com PLGA envolvidas no carregamento de fármacos como, antifúngicos (VAN DE VEM et al., 2012), antitumorais, hormônios, psicotrópicos, entre outros, têm despertado grande interesse no campo farmacêutico (KUMARI; YADAV; YADAV, 2010).

Entretanto, fármacos em sistemas nanoparticulados podem defrontar-se com uma barreira fisiológica, que resulta na rápida ligação das proteínas plasmáticas à superfície das nanoestruturas administradas, fenômeno esse, da opsonização. O mecanismo de defesa ocorre pelo reconhecimento de tais 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). Assim, muitas técnicas têm sido desenvolvidas para modificar a superfície de nanopartículas com o objetivo de diminuir, retardar ou até mesmo eliminar a adsorção às proteínas plasmáticas e, conseqüentemente prolongar o tempo de circulação das nanopartículas no organismo (GREF et al., 1994; SOPPIMATH et al., 2001; MOSQUEIRA et al., 2001; MOGHIMI; SZE BENI, 2003; OWENS & PEPPAS, 2006).

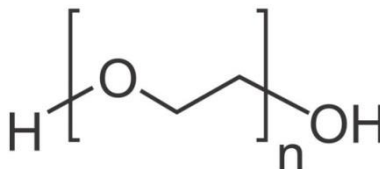
Um método que tem sido largamente usado é a modificação de superfície das nanopartículas realizada principalmente por: (I) revestimento da superfície com polímeros hidrofílicos/tensoativos; e (II) desenvolvimento de copolímeros biodegradáveis com segmentos hidrofílicos, que podem reduzir as interações

eletrostáticas e hidrofóbicas, pelas quais as opsoninas se adsorvem à superfície das partículas (MOSQUEIRA et al., 2001; GREF et al., 2000).

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

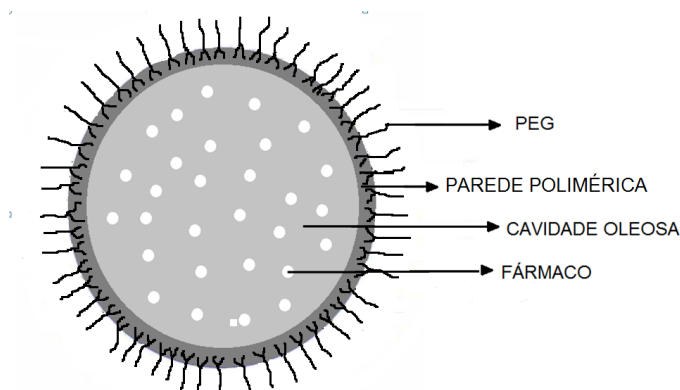
Entre os polímeros com a finalidade de estabilização estérica, o polietilenoglicol (PEG) é o polímero mais comumente utilizado para promover a modificação da superfície e sua fórmula estrutural pode ser observada na Figura 9. O modo de fixação desse polímero sobre a superfície das partículas pode, como mencionado, envolver a adsorção física ou a ligação covalente com o polímero formador da matriz ou da parede polimérica (HANS; LOWMAN, 2002).

Figura 9: Fórmula estrutural do PEG



O PEG é utilizado em formulações parenterais, tópicas, oftálmicas e orais. É um polímero produzido pelo método de polimerização catalítica heterogênea, a partir de monômeros de óxido de etileno. Em formulações líquidas apresentam-se como soluções límpidas, transparentes ou ligeiramente amareladas, enquanto na forma sólida, são brancos ou translúcidos, de consistência pastosa e cerosa. São estáveis, hidrofílicos, possuem cadeias flexíveis e neutralidade elétrica. Tais características auxiliam na prevenção de interações com componentes biológicos, como as células do sistema fagocítico mononuclear (GREF et al., 1995; STORM et al., 1995). Além de evitar o reconhecimento pelos anticorpos do organismo, a presença de PEG na superfície das nanopartículas (Figura 10) prolonga o tempo desses sistemas na circulação sistêmica, podendo otimizar as respostas terapêuticas (MOSQUEIRA et al., 2001; HANS; LOWMAN, 2002).

Figura 10: Representação esquemática de nanocápsula polimérica com cadeias de PEG em sua superfície



Fonte: Adaptado de Almeida, 2010

Em relação aos tensoativos aniônicos, os mais utilizados são os polissorbato 20, 40, 60 e 80, e possuem características anfifílicas que diminuem a tensão superficial entre partícula e célula permitindo um maior contato entre ambas. Na sua maioria promove a liberação da nanopartícula em sítios-alvo, portanto, são também modificadores superficiais para nanopartículas (KREUTER et al., 2007).

Considerando o potencial da nanotecnologia farmacêutica em solucionar problemas relacionados aos fármacos, especialmente no que se refere aos inconvenientes da terapia com o CIL, o presente projeto propõe o desenvolvimento de nanocápsulas poliméricas a fim de otimizar o tratamento da claudicação intermitente em pacientes com DAOP.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Equipamentos

- Agitador magnético com aquecimento (SOLAB, modelo SL-91, Piracicaba, Brasil);
- 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);
- Ultracentrífuga refrigerada (HITACHI, modelo Himac CR21GII, Tóquio, Japão);
- Destilador de água (FANEM LTDA, modelo 724/2-A, São Paulo, Brasil);
- Difratorômetro de raios X (RIGAKU, modelo Ultima IV, Quioto, 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);
- Cromatógrafo líquido de alta eficiência (MERCK-HITACHI, modelo Lachrom D-7000, Tóquio, Japão);
- 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)
- Sistema de ultrapurificação de água (Milli-Q®, MILLIPORE, Bedford, Estados Unidos);
- 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 (100,1% de pureza, IPCA Laboratories Limited, Mumbai, Índia).

4.2.2 Polímeros

- Poli(ϵ -caprolactona) (PCL, $\overline{M_w}$ 10.000-14000 g.mol⁻¹, SIGMA-ALDRICH, St. Louis, MO, Estados Unidos);
- Poli (D,L-ácido láctico-co-ácido glicólico) (PLGA, $\overline{M_w}$ 76.000-115.000 g.mol⁻¹, SIGMA-ALDRICH, St. Louis, MO, Estados Unidos);
- Polietilenoglicol (PEG, $\overline{M_w}$ 5.400-6.600 g.mol⁻¹, CROMATO PRODUTOS QUÍMICOS, Diadema, Brasil).

4.2.3 Água Purificada

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

4.2.4 Solventes e demais reagentes

- Acetona P.A (VETEC, Rio de Janeiro, Brasil);
- Acetonitrila grau HPLC (SIGMA-ALDRICH, St. Louis, MO, Estados Unidos);
- Brometo de potássio grau espectroscópico (KBr) (SIGMA-ALDRICH, St. Louis, Estados Unidos);
- 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).

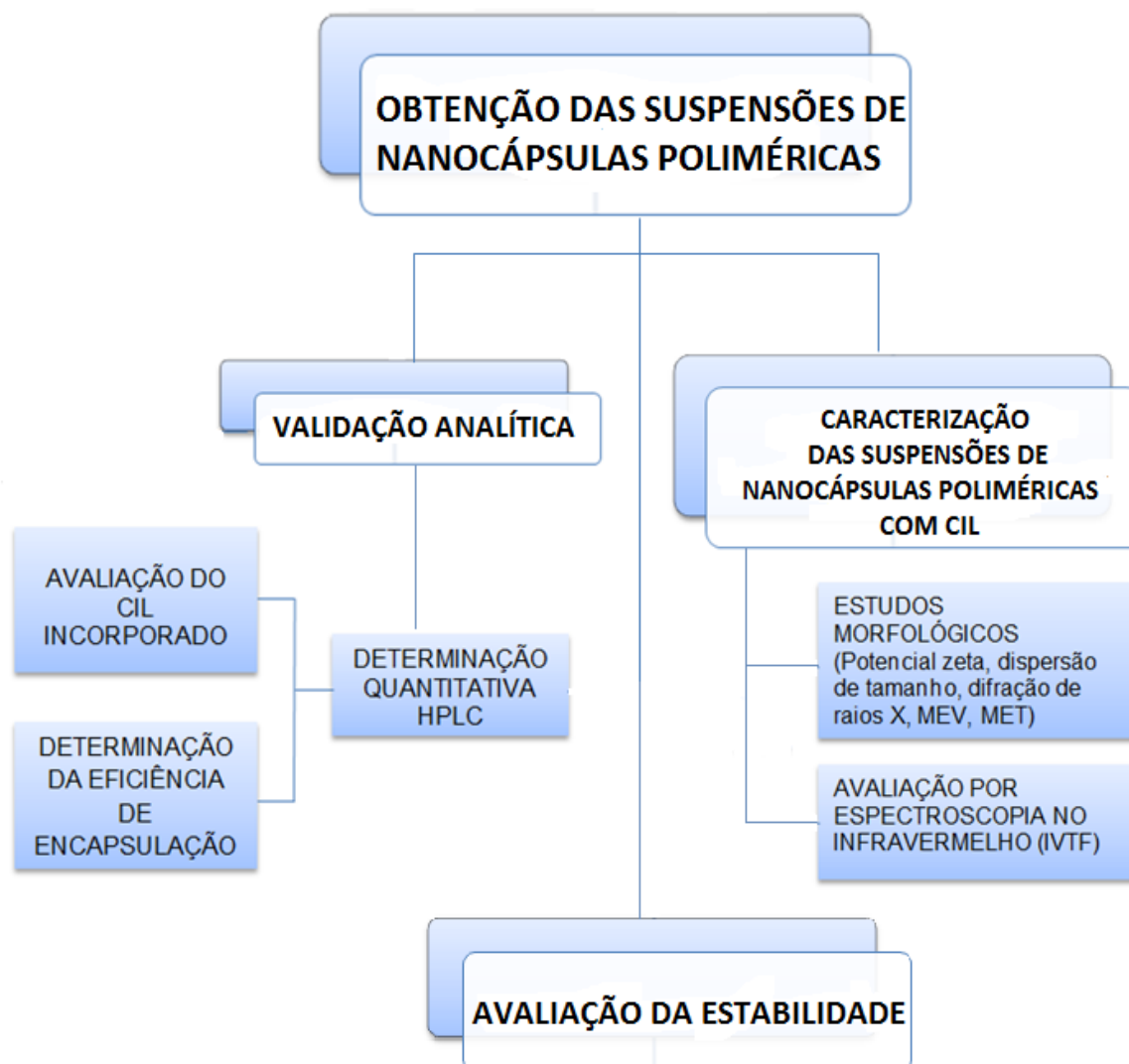
4.2.5 Outros materiais

- Membranas de ultrafiltração (Amicon® Ultra-0,5 mL 10K, MILLIPORE, Bedford, MA, Estados Unidos);
- Filtro para seringa de PTFE (0,45 µm x 25 mm, Cromafil®, Xtra, MACHEREY-NAGEL GNBH & CO. KG, Düren, Alemanha).

4.3 Desenho experimental

A pesquisa iniciou com a obtenção das suspensões de nanocápsulas poliméricas. Para a determinação quantitativa do CIL incorporado nas nanopartículas poliméricas foi utilizado o método de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), previamente validado, avaliando a eficiência de incorporação do fármaco. As nanopartículas poliméricas foram caracterizadas por meio de estudos morfológicos e espectroscópicos. A estabilidade das nanopartículas poliméricas foi investigada por meio de características físico-químicas. As etapas descritas estão esquematizadas no fluxograma da Figura 11.

Figura 11: Fluxograma das etapas realizadas no desenvolvimento da pesquisa



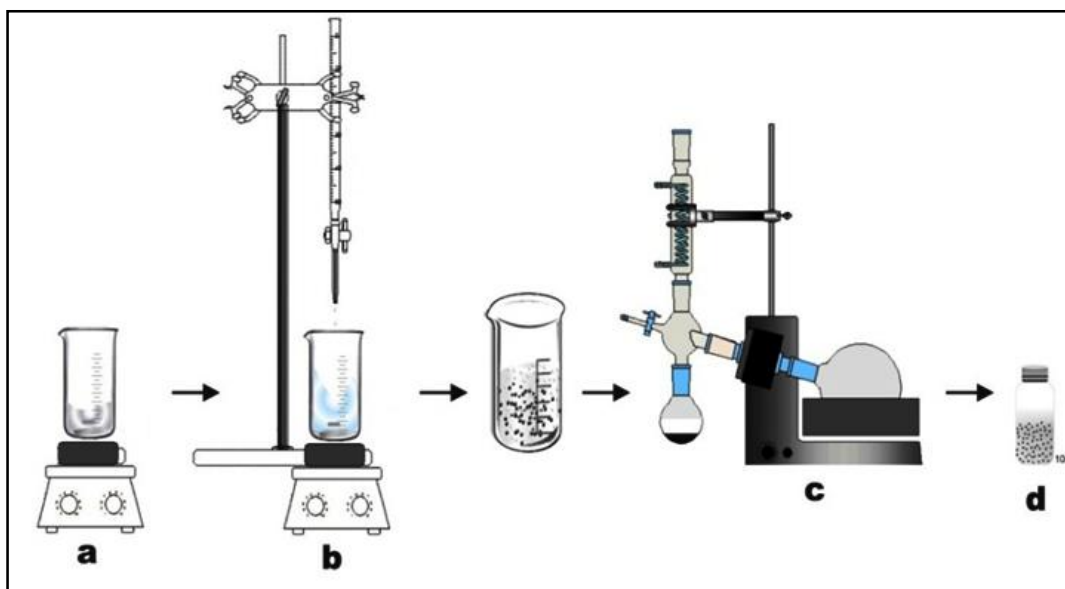
4.4 Procedimento experimental

4.4.1 Obtenção das suspensões de nanocápsulas poliméricas

As suspensões de nanocápsulas obtidas a partir dos polímeros poli(ϵ -caprolactona) (PCL), poli(D,L-ácido lático-co-ácido glicólico) (PLGA) e de blendas com polietilenoglicol (PEG), PCL-PEG e PLGA-PEG contendo CIL foram preparadas pelo procedimento de deposição interfacial do polímero pré-formado (Figura 12) desenvolvido e descrito por Fessi et al (1989). Resumidamente, o polímero ou blenda polimérica foi solvatado em acetona em presença de

Span 80®, CIL (em diferentes concentrações) e triglicerídeos dos ácidos cáprico/caprílico (TCC), constituindo assim a fase orgânica. Em seguida, foi gotejado lentamente na fase aquosa contendo Tween 80®, previamente preparada e mantida sob agitação magnética vigorosa e temperatura controlada de 40 °C. A agitação magnética foi mantida por mais 10 minutos após o término do gotejamento e o solvente orgânico foi, então, eliminado por rotaevaporação, atingindo um volume final de 10 mL e concentração de CIL de 1,0 mg.mL⁻¹ (NC-1), 2,0 mg.mL⁻¹ (NC-2) e 3,0 mg.mL⁻¹ (NC-3). Para fins comparativos, foi preparada uma suspensão de nanocápsulas sem a adição do fármaco (NC-0), como controle negativo.

Figura 12: Representação do método de obtenção das suspensões de nanocápsulas poliméricas



a) Preparo da fase orgânica; b) método: deposição interfacial do polímero pré-formado; c) rotaevaporação; d) suspensão de nanocápsulas poliméricas

Todas as formulações foram preparadas em triplicata. As composições das formulações estão indicadas na Tabela 1.

Tabela 1: Composição das formulações das suspensões de nanocápsulas poliméricas

Formulação	Fase Orgânica							Fase aquosa	
	CIL (g)	PCL (g)	PLGA (g)	PEG (g)	TCC (g)	Acetona (mL)	Span 80® (g)	Tween 80® (g)	Água Purificada (mL)
NC0-PCL ¹	–	0,100	–	–	0,300	27	0,077	0,077	53
NC1-PCL ²	0,01	0,100	–	–	0,300	27	0,077	0,077	53
NC2-PCL ²	0,02	0,100	–	–	0,300	27	0,077	0,077	53
NC3-PCL ²	0,03	0,100	–	–	0,300	27	0,077	0,077	53
NC0-PCL/PEG ¹	–	0,075	–	0,025	0,300	27	0,077	0,077	53
NC1-PCL/PEG ³	0,01	0,075	–	0,025	0,300	27	0,077	0,077	53
NC2-PCL/PEG ³	0,02	0,075	–	0,025	0,300	27	0,077	0,077	53
NC3-PCL/PEG ³	0,03	0,075	–	0,025	0,300	27	0,077	0,077	53
NC0-PLGA ¹	–	–	0,100	–	0,300	27	0,077	0,077	53
NC1-PLGA ⁴	0,01	–	0,100	–	0,300	27	0,077	0,077	53
NC2-PLGA ⁴	0,02	–	0,100	–	0,300	27	0,077	0,077	53
NC3-PLGA ⁴	0,03	–	0,100	–	0,300	27	0,077	0,077	53
NC0-PLGA/PEG ¹	–	–	0,075	0,025	0,300	27	0,077	0,077	53
NC1-PLGA/PEG ⁵	0,01	–	0,075	0,025	0,300	27	0,077	0,077	53
NC2-PLGA/PEG ⁵	0,02	–	0,075	0,025	0,300	27	0,077	0,077	53
NC3-PLGA/PEG ⁵	0,03	–	0,075	0,025	0,300	27	0,077	0,077	53

¹controle negativo das nanocápsulas poliméricas; ²nanocápsulas de poli(ε-caprolactona);

³nanocápsulas de poli(ε-caprolactona) com polietilenoglicol; ⁴nanocápsulas de poli(D,L-ácido láctico-co-ácido glicólico); ⁵nanocápsulas de poli(D,L-ácido láctico-co-ácido glicólico) com polietilenoglicol

4.4.1.1 Obtenção das misturas físicas

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 (CIL:PCL e CIL:PLGA) e 1:1:1 (CIL:PCL:PEG e CIL:PLGA:PEG).

4.4.2 Determinação do cilostazol incorporado às nanocápsulas poliméricas e eficiência de encapsulação

A quantificação do CIL encapsulado nas nanopartículas foi realizada pelo método indireto, o qual determina a concentração de fármaco não associado ao sistema carreador no ultrafiltrado das suspensões de nanocápsulas poliméricas, após o procedimento de ultrafiltração/centrifugação (HITACHI, Himac CR21GII), a 2200 xg durante 30 minutos, em dispositivo Amicon® (10.000, MILLIPORE). As amostras foram analisadas por CLAE, em triplicata. A eficiência de encapsulação (EE%) foi calculada a partir da Equação 1:

$$EE\% = \frac{CIL_{inicial} - CIL_{livre}}{CIL_{inicial}} \times 100 \quad (\text{Equação 1})$$

Onde, $CIL_{inicial}$ corresponde à concentração do fármaco adicionada inicialmente à formulação e, CIL_{livre} , à concentração de CIL não incorporado às nanocápsulas, quantificadas por CLAE. Os valores de EE% foram expressos como média $\pm$ DP.

4.4.2.1 Desenvolvimento e validação do método analítico por CLAE

O método analítico por CLAE foi desenvolvido e validado para quantificar o CIL incorporado nas nanocápsulas. Foi utilizado para a determinação do teor do fármaco encapsulado e avaliação da eficiência de encapsulação das formulações.

4.4.2.1.1 Equipamentos e condições cromatográficas

As análises por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) foram realizadas em cromatógrafo MERCK-HITACHI (Lachrom D-7000), equipado com detector de UV L-74000, bomba L-7100, degaseificador e injetor manual Rheodyne (volume de injeção: 20 μ L), controlado por *software* Chromquest. As amostras foram injetadas com seringa de 100 μ L (HAMILTON, Microliter 710).

Foi utilizada uma coluna analítica de fase reversa GL Sciences Inertsil® ODS3 (150 mm x 4.6 mm, 5 μ m) e uma pré-coluna GL Sciences Inertsil® ODS3 (10 mm x 4 mm, 5 μ m), mantidas à temperatura ambiente. A eluição foi realizada de modo isocrático, fase móvel constituída de acetonitrila:água (47:53 v/v) e vazão de 1,0 mL.min⁻¹. O tempo de análise foi de 10 minutos e a detecção ocorreu em 254 nm.

4.4.2.1.2 Validação do método para a quantificação do cilostazol incorporado às nanocápsulas

A validação do método analítico por CLAE foi realizada segundo os critérios propostos pelo *International Conference on Harmonization of Technical Requirements for the Registration of Pharmaceuticals for Human Use* (ICH, 2005) e pela Resolução 899 de 29 de maio de 2003 (ANVISA, 2003). Os parâmetros avaliados foram: especificidade, linearidade, limites de detecção e de quantificação, precisão, exatidão e robustez.

A especificidade foi determinada pela análise dos cromatogramas obtidos para as suspensões de nanocápsulas sem CIL (controle negativo) e para as suspensões contendo o fármaco, com o objetivo de confirmar se os outros componentes da formulação não interferiram na quantificação do fármaco.

Para o estudo da linearidade, foram elaboradas três curvas analíticas nas concentrações de 10,0; 25,0; 40,0; 55,0 e 70,0 μ g mL⁻¹ de CIL, em uma mistura de acetonitrila:água (47:53 v/v). A equação da reta e o coeficiente de correlação (*r*) foram determinados com base no cálculo de regressão linear de mínimos quadrados.

O limite de detecção (LD) e o limite de quantificação (LQ) foram calculados pelas equações 2 e 3 (ICH, 2005):

$$LD = \frac{3,33 \times DP}{S} \quad (\text{Equação 2})$$

$$LQ = \frac{10 \times DP}{S} \quad (\text{Equação 3})$$

Sendo, LD, o limite de detecção; LQ, o limite de quantificação; DP, o desvio padrão da curva analítica; e S, o coeficiente angular.

A precisão foi comprovada pela repetibilidade e precisão intermediária. A repetibilidade foi realizada a partir da análise de seis amostras independentes, na concentração de 20,0 µg.mL⁻¹, no mesmo dia e nas mesmas condições experimentais. Para a avaliação da precisão intermediária as amostras (20,0 µg.mL⁻¹) foram analisadas em três dias consecutivos, em triplicata. Os resultados foram expressos como desvio padrão relativo (DPR) intra-dia e inter-dia.

A exatidão foi determinada calculando a porcentagem de recuperação do CIL em três níveis de concentração, baixo, intermediário e alto (20,0; 35,0 e 50,0 µg.mL⁻¹) em triplicata. O valor da concentração média obtida foi comparado com o valor teórico, considerado 100%.

Para o estudo da robustez, foi variada a vazão para 0,995 e 1,005 mL.min⁻¹, em triplicata. Os resultados foram analisados por meio do DPR e comparados com seis valores obtidos para a condição padrão.

4.4.2.1.3 Análise estatística da validação do método analítico por CLAE

A análise estatística foi realizada por Análise de variância (ANOVA), teste *t-student* e análise de resíduos, utilizando *software* Statistica 8.0 (Statsoft, Inc.).

4.4.3 Caracterização das suspensões de nanocápsulas poliméricas

4.4.3.1 Determinação do pH

A determinação do pH foi realizada em potenciômetro digital previamente calibrado com soluções tampão pH 4,0 e 7,0, diretamente nas suspensões coloidais, após a preparação. Os resultados representam a média de três amostras diferentes.

4.4.3.2 Determinação do diâmetro médio e do potencial zeta

O tamanho médio de partícula e o índice de polidispersão (distribuição de tamanho) foram medidos ($n = 3$) por espectroscopia de correlação de fótons após a diluição de uma alíquota de suspensão de nanocápsulas em água ultrapurificada (1:500 v/v). As medidas foram realizadas utilizando o equipamento Zetasizer Nano Series ZS90 (MALVERN INSTRUMENTS). No mesmo equipamento, o potencial zeta foi determinado por meio da técnica de mobilidade eletroforética, com o mesmo preparo de amostras para a análise do tamanho de partícula.

4.4.3.3 Análises morfológicas e de superfície por microscopia eletrônica de transmissão (MET)

Uma alíquota de 5 μ L da suspensão de nanopartículas foi colocada sobre uma tela de parlódio e levada para secar em estufa a temperatura de 30 °C durante aproximadamente 10 minutos. As nanopartículas foram examinadas em microscópio eletrônico de transmissão (JEOL, modelo JEM 1200 EX-II).

4.4.3.4 Análises morfológicas e de superfície por microscopia eletrônica de varredura (MEV)

A avaliação morfológica e de superfície das nanocápsulas foi realizada em microscópio eletrônico de varredura SSX-550 Superscan (SHIMADZU). As amostras foram fixadas em suporte metálico e levadas à estufa a vácuo (TECNAL, modelo TE 395). Após, foram submetidas à metalização com ouro no equipamento IC-50 Ion Coater (SHIMADZU). As fotomicrografias foram obtidas empregando

voltagens de aceleração de 10 ou 15 kV e registradas por meio da utilização de *software* específico.

4.4.3.5 Análise por difração de raios X (DRX)

As suspensões de nanocápsulas poliméricas foram depositadas sobre lamínula de vidro e secas em temperatura ambiente. 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 (RIGAKU, modelo Ultima IV), scan de $2^\circ \cdot \text{min}^{-1}$ e 2θ de 5° a 80° , radiação $K\alpha$ de cobre ($\lambda=1.5418\text{\AA}$), corrente de 40 mA e voltagem 30 kV, para a observação de possíveis picos indicativos de cristalinidade.

4.4.3.6 Avaliação por espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (IVTF)

As suspensões de nanocápsulas poliméricas 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.

4.4.4 Estudo de estabilidade

As suspensões de nanocápsulas poliméricas foram armazenadas à temperatura ambiente (25°C) e protegidas da luz em frascos âmbar, as quais foram monitoradas durante dois meses de armazenamento pelas determinações de pH, tamanho médio de partícula, índice de polidispersão (IPD) e potencial zeta.

Os resultados obtidos após 60 dias foram comparados aos valores encontrados logo após a preparação.

4.4.4.1 Análise estatística do estudo de estabilidade

As análises estatísticas foram realizadas por ANOVA seguida do 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).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

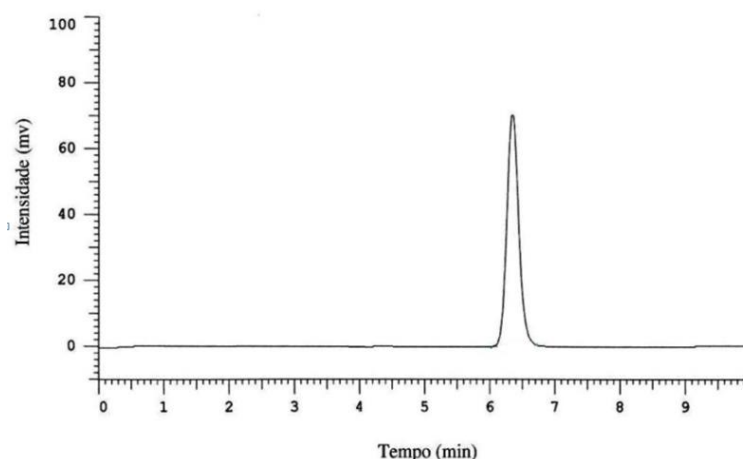
5.1 Obtenção das suspensões de nanocápsulas poliméricas

As suspensões de nanocápsulas poliméricas obtidas apresentaram macroscopicamente o aspecto de um líquido leitoso e opalescente com reflexo azulado, relacionado ao movimento browniano das estruturas coloidais (Efeito Tyndall) em acordo com os resultados previamente relatados para outros sistemas nanoparticulados (SCHAFFAZICK et al., 2003; MORA-HUERTAS; FESSI; ELAISSARI, 2010).

5.2 Determinação do cilostazol encapsulado às nanocápsulas poliméricas e eficiência de encapsulação (EE)

Durante o desenvolvimento e validação do método analítico por CLAE para quantificação do CIL presente nas nanocápsulas, foram testadas diferentes fases móveis empregando metanol e água e acetonitrila e água, com base nos métodos descritos na literatura (FAYED, et al., 2007; JOTI et al., 2011; UMA DEVI et al., 2012). Diversos sistemas de gradiente e tempos de análise foram testados, como também várias proporções no modo isocrático. O melhor resultado foi obtido com a fase móvel de acetonitrila:água (47:53 v/v) e vazão de 1,0 mL.min⁻¹. O tempo de análise foi de 10 minutos e o tempo de retenção de 6,33 minutos (Figura 13).

Figura 13: Cromatograma do CIL (20 $\mu\text{g.mL}^{-1}$)



5.2.1 Validação do método

Para garantir que um novo método analítico gere informações confiáveis e interpretáveis sobre a amostra, ele deve passar por um processo de avaliação denominado validação, que garante a confiabilidade e rastreabilidade dos resultados (RIBANI, et al., 2004).

5.2.1.1 Especificidade

A especificidade avalia o grau de interferência de outras substâncias, como outros fármacos, excipientes, impurezas e produtos de degradação. Garante que o tempo de retenção seja exclusivamente do analito de interesse, de modo a não comprometer a linearidade, a precisão e a exatidão (RIBANI, et al., 2004).

Foi avaliada por meio de análises comparativas entre os cromatogramas da suspensão de nanocápsulas poliméricas sem CIL (NC0-PCL/PEG e NC0-PLGA/PEG) e das suspensões com CIL e os polímeros PCL/PEG e PLGA/PEG, como ilustrado nas Figuras 14 e 15, respectivamente.

Figura 14: Cromatograma das formulações NC1-PCL/PEG (A) e NC0-PCL/PEG (B)

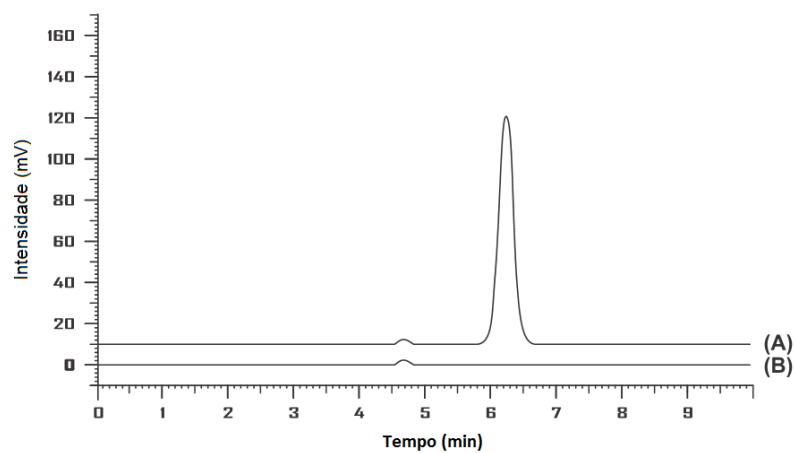
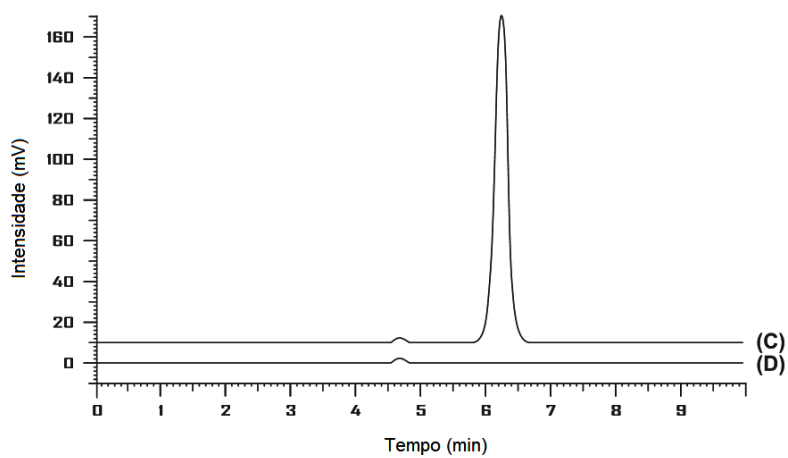


Figura 15: Cromatograma das formulações NC3-PLGA/PEG (C) e NC0-PLGA/PEG (D)



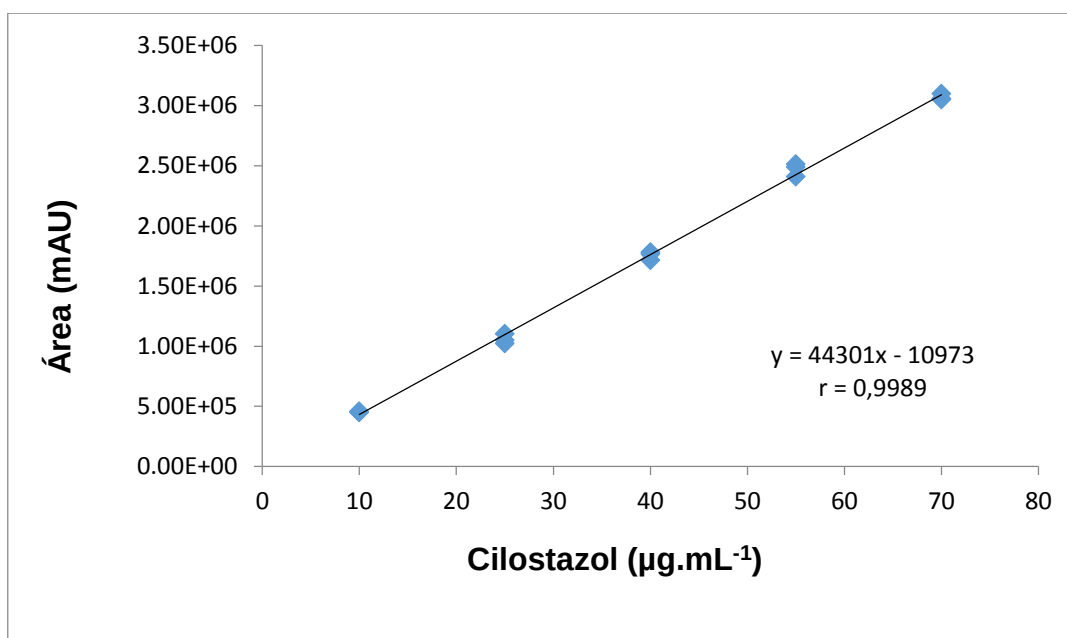
Comparando os cromatogramas obtidos (Figura 14 e 15), demonstrou-se a especificidade do método, sem apresentar interferentes no tempo de retenção do analito, em concordância com as especificações oficiais (BRASIL, 2003; ICH, 2005).

5.2.1.2 Linearidade

A linearidade de um método analítico corresponde à capacidade do método em fornecer resultados diretamente proporcionais à concentração da substância em análise dentro de um determinado intervalo (BRASIL, 2003).

As curvas analíticas foram lineares no intervalo de 10 a 70 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. A equação da reta representativa da linearidade foi $y = 44301x + 10973$ ($n = 3$, $r = 0,9989$) (Figura 16).

Figura 16: Representação gráfica da curva analítica média para a determinação do CIL obtida em CLAE ($\lambda = 254 \text{ nm}$) em acetonitrila 47%



De acordo com o *Analytical Methods Committee* (AMC), um valor de coeficiente de regressão próximo a 1,00 não é, necessariamente, o resultado de uma relação linear e, em consequência, o teste para a falta de ajuste que avalia a variação dos valores residuais deve ser aplicado. A análise de variância (ANOVA) para a linearidade do método está apresentada na Tabela 2. O valor de F para a falta de ajuste foi menor que o valor de F tabelado para o intervalo de 95% de confiança ($\alpha = 0,05$). Dessa forma, a regressão linear não mostrou falta de ajuste.

Tabela 2: Resultados obtidos por ANOVA para linearidade do método analítico

	SS	DF	MS	F	F _{tab}
Modelo	$1,3247 \times 10^{13}$	1	$1,3247 \times 10^{13}$	6609,851	4,67
Resíduo	$2,6054 \times 10^{10}$	13	$2,0042 \times 10^9$	Linear	–
Falta de ajuste	$1,3222 \times 10^{10}$	3	$4,4074 \times 10^9$	3,434774	3,71
Erro puro	$1,2832 \times 10^{10}$	10	$1,2832 \times 10^9$	Não há falta de ajuste	–

SS: soma dos quadrados dos resíduos; df: graus de liberdade; MS: quadrados médios dos resíduos; F: valor do teste F; F_{tab}: valor de F tabelado

5.2.1.3 Limite de Detecção (LD) e Limite de Quantificação (LQ)

O LD é a menor quantidade de analito presente em uma amostra que pode ser detectada, porém não necessariamente quantificada. Já o LQ representa a menor quantidade presente em uma amostra que pode ser determinada com precisão e exatidão aceitáveis sob as condições experimentais estabelecidas (BRASIL, 2003).

Os valores obtidos para o LD e LQ, empregando as Equações 2 e 3, foram 0,41 e 1,23 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, respectivamente, indicando uma boa sensibilidade do método para a determinação do CIL.

5.2.1.4 Precisão

Os resultados obtidos para a precisão (repetibilidade e precisão intermediária) estão demonstrados na Tabela 3. O desvio padrão relativo (DPR) para a repetibilidade foi de 0,69% e para a precisão intermediária foi de 0,60%, indicando que o método desenvolvido é preciso dentro da faixa de concentração e das condições adotadas.

Tabela 3: Resultados obtidos para os ensaios de precisão na análise do cilostazol

	Concentração teórica ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	Concentração experimental ($\mu\text{g.mL}^{-1} \pm \text{DP}$)	DPR (%)
Repetibilidade (n = 6)	20,0	19,80 $\pm$ 0,14	0,69
Precisão intermediária			
Dia 1 (n = 3)	20,0	19,80 $\pm$ 0,09	0,46
Dia 2 (n = 3)	20,0	19,78 $\pm$ 0,12	0,63
Dia 3 (n = 3)	20,0	19,63 $\pm$ 0,15	0,70
Média $\pm$ DP (n = 9)		19,74 $\pm$ 0,12	0,60

DP: desvio padrão e DPR: desvio padrão relativo

5.2.1.5 Exatidão

A exatidão foi verificada como porcentagem de recuperação e DPR da concentração média do analito em três diferentes concentrações (20,0; 35,0; e 50,0 $\mu\text{g.mL}^{-1}$). Os resultados obtidos (Tabela 4) foram satisfatórios, pois as porcentagens de recuperação ficaram entre 99,94 e 101,86%, estando em conformidade com os limites estabelecidos pelas normas do ICH (2005).

Tabela 4: Porcentagem de recuperação e DPR obtidos a partir da análise de exatidão (n = 3)

Solução padrão ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	Recuperação (% $\pm$ DP)	DPR (%)
20,0	100,62 $\pm$ 0,42	2,10
35,0	101,86 $\pm$ 0,29	0,82
50,0	99,94 $\pm$ 0,11	0,23

DP: desvio padrão e DPR: desvio padrão relativo

5.2.1.6 Robustez

A robustez de um método analítico indica a confiabilidade do método frente a pequenas variações dos parâmetros analíticos. Não houve diferenças significativas ($p < 0,05$) na área sob a curva e no tempo de retenção do CIL quando a vazão variou para 0,995 e 1,005 mL.min⁻¹ (DPR = 1,08 e 1,02%, respectivamente). Assim, o método demonstrou-se robusto para a substância analisada sob as condições avaliadas.

5.2.2 Determinação do teor de cilostazol incorporado nas nanocápsulas e eficiência de encapsulação

Os resultados da concentração do fármaco incorporado às nanocápsulas (mg.mL⁻¹) e da eficiência de encapsulação (%) para as formulações estão resumidos na Tabela 5. Considerando o conteúdo do fármaco as formulações apresentaram concentrações com valores muito próximos aos teóricos, indicando que praticamente não houve perda durante sua preparação. Além disso, todas as formulações apresentaram valores de EE superiores a 99,60%, o que está relacionado à baixa solubilidade aquosa (3,0 µg.mL⁻¹ a 25°C) do CIL (SHIMIZU *et al.*, 1985), que acarretou aumento da concentração do fármaco incorporada à nanopartícula.

Tabela 5: Teor de cilostazol encapsulado e eficiência de encapsulação (n = 3)

Amostras	Concentração teórica ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	CIL encapsulado ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	EE (%)
NC1-PCL ¹	1000,0	997,05 ($\pm 0,22$)	99,70 ($\pm 0,02$)
NC2-PCL ¹	2000,0	1996,28 ($\pm 0,16$)	99,81 ($\pm 0,01$)
NC3-PCL ¹	3000,0	2996,17 ($\pm 0,16$)	99,87 ($\pm 0,01$)
NC1-PCL/PEG ²	1000,0	995,17 ($\pm 0,15$)	99,60 ($\pm 0,01$)
NC2-PCL/PEG ²	2000,0	1995,86 ($\pm 0,15$)	99,79 ($\pm 0,01$)
NC3-PCL/PEG ²	3000,0	2996,16 ($\pm 0,10$)	99,87 ($\pm 0,01$)
NC1-PLGA ³	1000,0	997,15 ($\pm 0,08$)	99,71 ($\pm 0,01$)
NC2-PLGA ³	2000,0	1996,07 ($\pm 0,07$)	99,80 ($\pm 0,01$)
NC3-PLGA ³	3000,0	2996,33 ($\pm 0,17$)	99,88 ($\pm 0,01$)
NC1-PLGA/PEG ⁴	1000,0	997,01 ($\pm 0,04$)	99,70 ($\pm 0,01$)
NC2-PLGA/PEG ⁴	2000,0	1997,17 ($\pm 0,25$)	99,86 ($\pm 0,01$)
NC3-PLGA/PEG ⁴	3000,0	2997,31 ($\pm 0,05$)	99,91 ($\pm 0,01$)

¹nanocápsulas de poli(ϵ -caprolactona); ²nanocápsulas de poli(ϵ -caprolactona) com polietilenoglicol;

³nanocápsulas de poli(D,L-ácido láctico-co-ácido glicólico); ⁴nanocápsulas de poli(D,L-ácido láctico-co-ácido glicólico) com polietilenoglicol

Não há relatos na literatura sobre a avaliação da eficiência de encapsulação do CIL em sistemas nanoestruturados. No entanto, alguns pesquisadores descreveram esse parâmetro para outros fármacos lipofílicos usando o método de deposição interfacial do polímero pré-formado. Blouza et al. (2006) desenvolveram e caracterizaram nanocápsulas de PCL com espironolactona para uso pediátrico em escala laboratorial e industrial, obtendo porcentagens de EE de 96,21 e 90,56%, respectivamente. No trabalho de Noronha et al. (2013), foram produzidas nanocápsulas de PCL contendo α -tocoferol as quais revelaram EE variando de 75,55 a 99,97%. Em um estudo realizado por Santos et. al. (2014), em que foram avaliadas nanocápsulas poliméricas de clotrimazol, preparadas a partir do Eudragit® RS 100, foram observados valores de EE acima de 99,9%.

Esse método de preparação, de acordo com a literatura, é um dos que apresenta os melhores resultados para a EE alcançando valores iguais ou superiores a 80% (MORA-HUERTAS; FESSI; ELAISSARI, 2010). Dessa forma, as formulações desenvolvidas no presente trabalho apresentaram valores condizentes

aos estudos já realizados, considerando as características físico-químicas do fármaco e o método de obtenção empregado.

5.3 Caracterização das suspensões de nanocápsulas poliméricas

Os resultados obtidos de pH, tamanho de partícula, índice de polidispersão (IPD) e potencial zeta (PZ) podem ser observados na Tabela 6.

Tabela 6: Caracterização físico-química das suspensões de nanocápsulas (n=3)

Amostras	CIL (mg.mL ⁻¹)	pH	Tamanho de partícula (nm)	IPD	PZ (mV)
NC0-PCL ¹	–	6,3 ± 0,36	132 ± 6,40	0,17 ± 0,04	-30,5 ± 0,69
NC1-PCL ²	1,0	6,4 ± 0,10	128 ± 3,10	0,20 ± 0,01	-33,7 ± 2,00
NC2-PCL ²	2,0	6,3 ± 0,10	125 ± 3,60	0,20 ± 0,08	-34,9 ± 1,88
NC3-PCL ²	3,0	6,4 ± 0,10	128 ± 2,20	0,21 ± 0,08	-32,3 ± 4,38
NC0-PCL/PEG ¹	–	6,3 ± 0,10	137 ± 1,60	0,17 ± 0,05	-36,9 ± 2,20
NC1-PCL/PEG ³	1,0	6,1 ± 0,10	134 ± 3,70	0,22 ± 0,01	-36,3 ± 0,60
NC2-PCL/PEG ³	2,0	6,1 ± 0,10	133 ± 4,90	0,17 ± 0,01	-36,4 ± 2,00
NC3-PCL/PEG ³	3,0	6,3 ± 0,10	130 ± 0,80	0,18 ± 0,01	-37,6 ± 1,50
NC0-PLGA ¹	–	6,2 ± 0,20	122 ± 2,00	0,20 ± 0,06	-34,3 ± 2,30
NC1-PLGA ⁴	1,0	6,0 ± 0,10	124 ± 1,50	0,18 ± 0,02	-38,3 ± 3,60
NC2-PLGA ⁴	2,0	6,4 ± 0,20	121 ± 0,50	0,18 ± 0,01	-34,5 ± 0,70
NC3-PLGA ⁴	3,0	6,3 ± 0,07	125 ± 2,30	0,19 ± 0,05	-38,7 ± 0,50
NC0-PLGA/PEG ¹	–	6,4 ± 0,02	122 ± 1,70	0,17 ± 0,06	-36,4 ± 1,76
NC1-PLGA/PEG ⁵	1,0	6,1 ± 0,10	123 ± 3,60	0,17 ± 0,02	-36,0 ± 2,30
NC2-PLGA/PEG ⁵	2,0	6,2 ± 0,01	126 ± 2,80	0,20 ± 0,04	-32,9 ± 3,00
NC3-PLGA/PEG ⁵	3,0	6,1 ± 0,10	128 ± 1,50	0,17 ± 0,02	-35,7 ± 1,60

¹controle negativo das nanocápsulas poliméricas; ²nanocápsulas de poli(ε-caprolactona); ³nanocápsulas de poli(ε-caprolactona) com polietilenoglicol; ⁴nanocápsulas de poli(D,L-ácido láctico-co-ácido glicólico); ⁵nanocápsulas de poli(D,L-ácido láctico-co-ácido glicólico) com polietilenoglicol

As concentrações utilizadas do fármaco variaram de 0 a 3,0 mg.mL⁻¹ e não interferiram nos parâmetros avaliados para suspensões de nanocápsulas poliméricas de PCL e PLGA, e blends de PCL/PEG e PLGA/PEG. O pH apresentou

valores entre 6,0 e 6,4 para todas as formulações. A composição dos polímeros PCL e PLGA contribuiu para a obtenção de suspensões de caráter ácido visto à presença do grupo éster (DURÁN et al., 2006). Todas as formulações preparadas apresentaram partículas com tamanhos adequados, inferiores a 137 nm, caracterizando sistemas nanoparticulados eficientes para carreamento de fármacos, uma vez que devem possuir diâmetros menores que 300 nm (GUPTA; KOMPELLA, 2006). O índice de polidispersão não ultrapassou o valor de 0,22, garantindo homogeneidade da dispersão (AVADI et al., 2010).

O potencial zeta (PZ) das amostras obtidas apresentou valores negativos, entre -30,5 e -38,7 mV, que é condizente com a natureza aniônica dos polímeros, sugerindo estabilidade das suspensões de nanocápsulas poliméricas. Em geral, a estabilidade das partículas é garantida quando o valor absoluto do potencial zeta é próximo de 30 mV, enquanto que valores próximos a 0 e 5,0 mV podem acarretar floculação (NEVES et al., 2013).

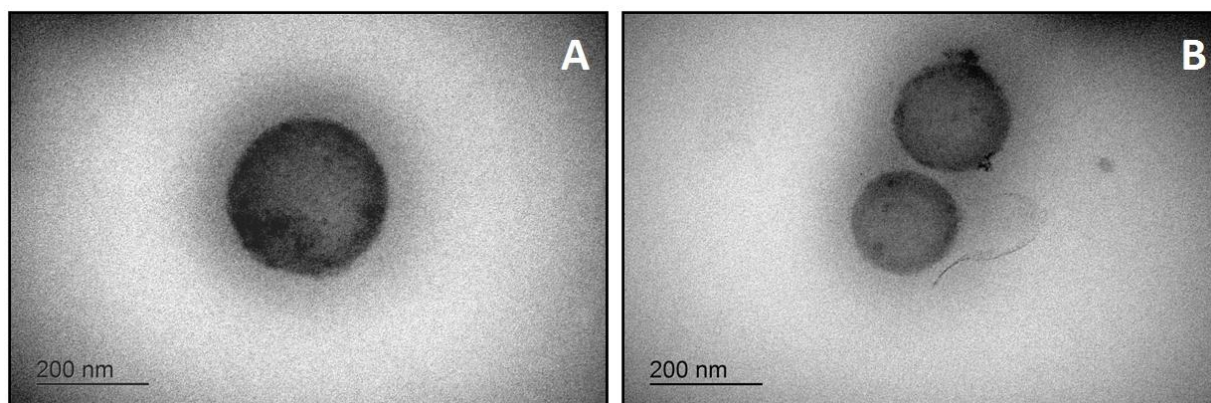
Essa característica negativa da superfície das nanocápsulas promove o aumento do seu tempo de permanência no sangue, visto que partículas carregadas positivamente tendem a ser depuradas mais rapidamente da corrente sanguínea e acumuladas nos pulmões e fígado (LI; HUANG, 2008).

5.4 Análise por microscopia eletrônica de transmissão (MET)

Observou-se nas fotomicrografias (Figura 17) obtidas a partir das suspensões de nanocápsulas poliméricas preparadas com CIL associado ao polímero PCL e à blenda PCL/PEG, estruturas esféricas de superfície lisa, com diâmetro médio de 200 nm. As nanoestruturas foram similares entre si e compatíveis com os resultados encontrados no método de espectroscopia de correlação de fótons para o tamanho de partícula e índice de polidispersão.

Não foram verificadas diferenças na morfologia e superfície das nanocápsulas preparadas com o PLGA e PLGA/PEG.

Figura 17: Fotomicrografia obtida por MET da suspensão de nanocápsulas NC2-PCL (A) e NC2-PCL/PEG (B) (aumento de 25000 x)



5.5 Análise por microscopia eletrônica de varredura (MEV)

Por meio das análises das fotomicrografias foram comprovadas as dimensões nanométricas nas suspensões de nanocápsulas poliméricas. Foi observado que mesmo alterando a concentração do fármaco nas formulações e o revestimento com os diferentes polímeros de partida, as estruturas apresentaram-se morfologicamente similares, como demonstrado nas figuras 18 e 19.

Foram visualizados aglomerados polidispersos de superfície lisa e tamanhos similares aos resultados encontrados no método de espectroscopia de correlação de fótons para o tamanho de partícula e índice de polidispersão.

Figura 18: Fotomicrografias obtidas por MEV da suspensão de nanocápsulas NC3-PLGA em aumento de 15000 x (A) e NC3-PLGA/PEG em aumento de 30000 x (B)

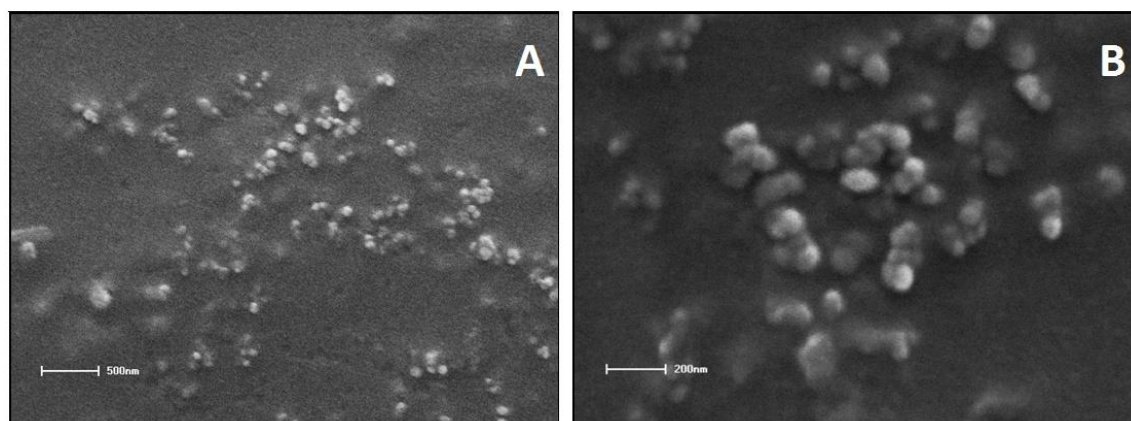
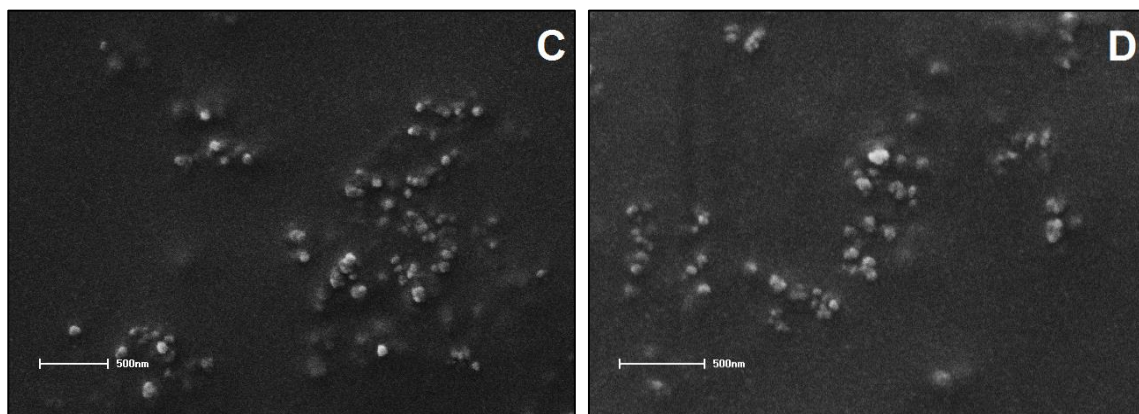


Figura 19: Fotomicrografias obtidas por MEV da suspensão de nanocápsulas NC2-PCL (C) e NC2-PCL/PEG em aumento de 15000 x (D)

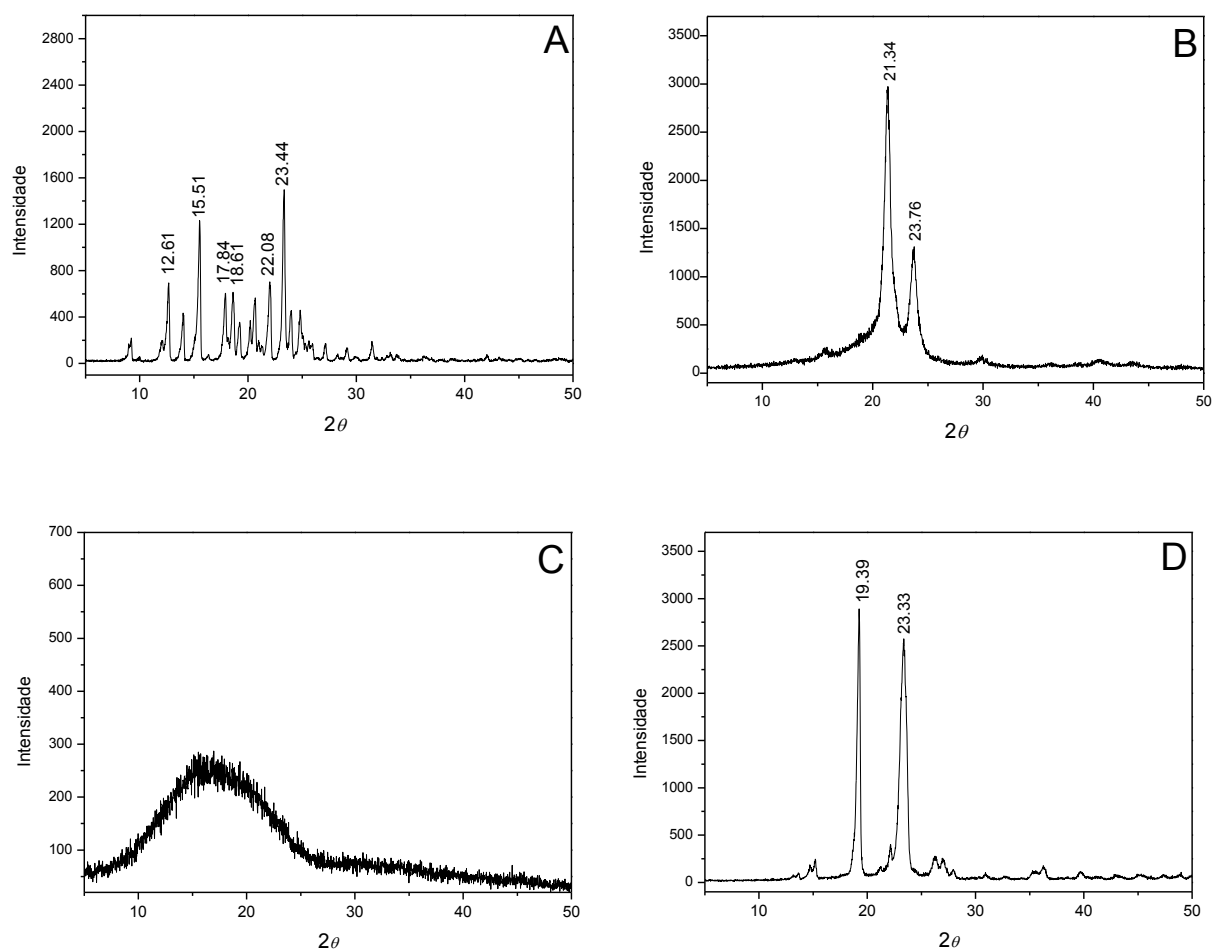


5.6 Análise por difração de raios X (DRX)

A difração de raios X demonstra a característica do fármaco quanto à cristalinidade ou amorfismo, o que é de extrema importância quanto ao potencial de solubilidade e a velocidade de dissolução do fármaco. Substâncias cristalinas possuem picos bem definidos em relação às substâncias amorfas, entretanto, sólidos amorfos são mais solúveis devido à disposição aleatória de suas moléculas, precisando de pouca energia para separá-los (RIEKES et. al., 2011).

A Figura 20 apresenta os difratogramas para o fármaco puro (A) e os polímeros PCL (B), PLGA (C) e PEG (D) utilizados na obtenção das suspensões de nanocápsulas.

Figura 20: Difratomogramas do cilostazol (A) e dos polímeros PCL (B), PLGA (C) e PEG (D)



As análises de difração de raios X para o CIL demonstraram picos bem característicos em aproximadamente $2\theta = 12,61^\circ$, $15,51^\circ$, $17,84^\circ$, $18,61^\circ$, $22,08^\circ$, $23,44^\circ$, além de outros de menores intensidades. Esses resultados são compatíveis com os estudos de SHIMIZU et al. (1985) e PATEL; RAJUD (2009). Para os polímeros PCL e PEG, foram obtidos alguns indicativos de cristalinidade. Os resultados obtidos para PLGA demonstram que ele é um polímero de caráter amorfo (REZENDE et al., 2005; KURTI et al., 2011).

As figuras 21, 22, 23 e 24 apresentam os difratogramas comparativos entre o fármaco puro (CIL), os polímeros de partida (PCL, PLGA, PEG), a mistura física (MF) e as suspensões de nanocápsulas preparadas em diferentes concentrações (NC0, NC1, NC2 e NC3).

Figura 21: Difrátogramas do cilostazol, do polímero PCL, da mistura física (CIL:PCL, 1:1 m/m) e das suspensões de nanocápsulas poliméricas preparadas com PCL

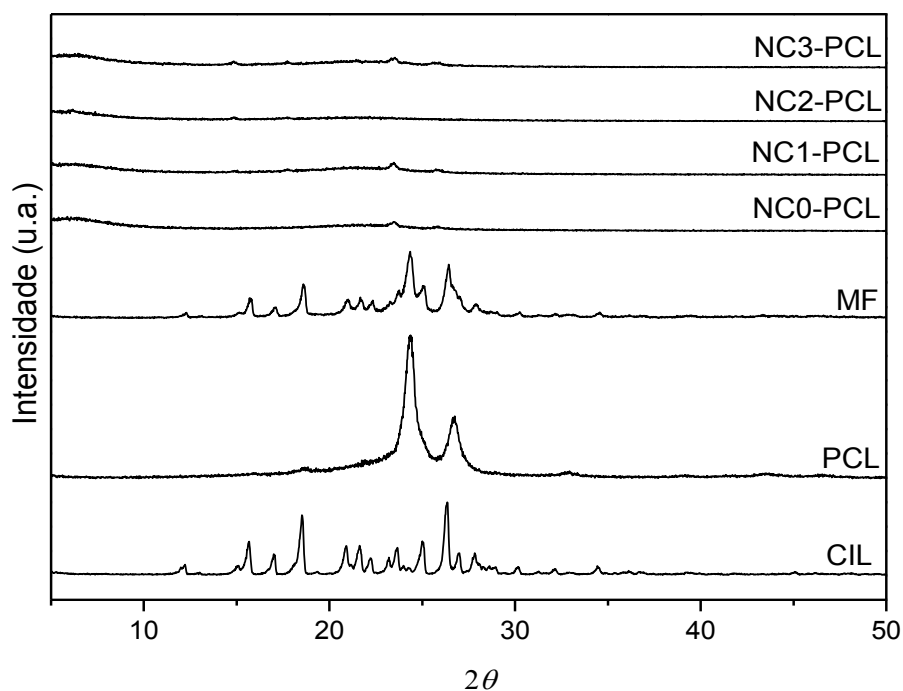


Figura 22: Difrátogramas do cilostazol, dos polímeros PCL e PEG, da mistura física (CIL:PCL:PEG, 1:1:1 m/m) e das suspensões de nanocápsulas poliméricas preparadas com blends PCL/PEG

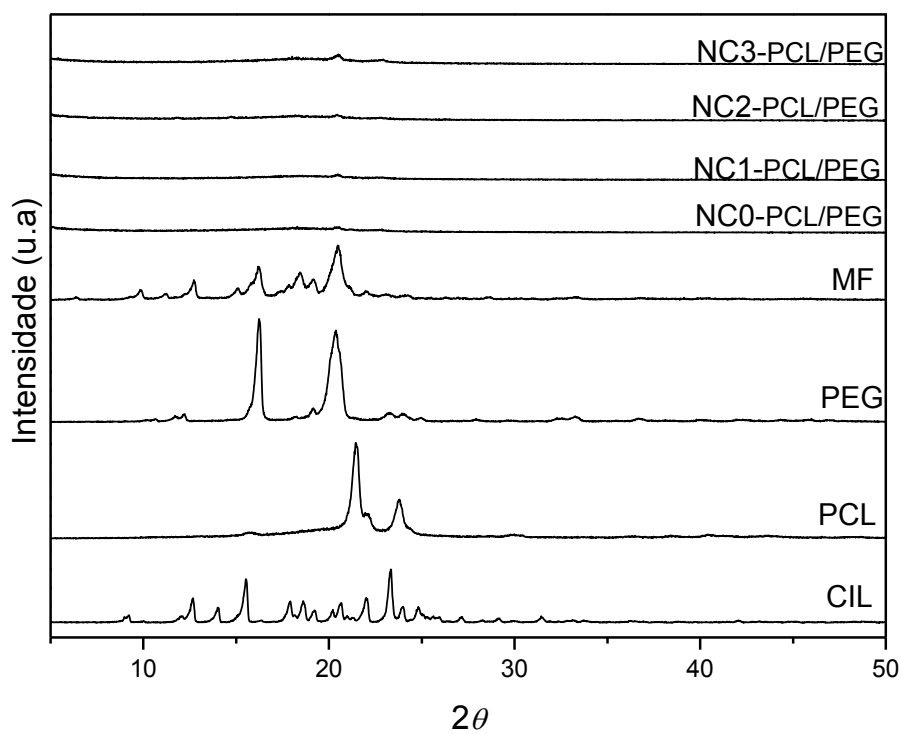


Figura 23: Difrátogramas do cilostazol (CIL), do polímero PLGA, da mistura física (CIL:PLGA, 1:1 m/m) e das suspensões de nanocápsulas poliméricas preparadas com PLGA

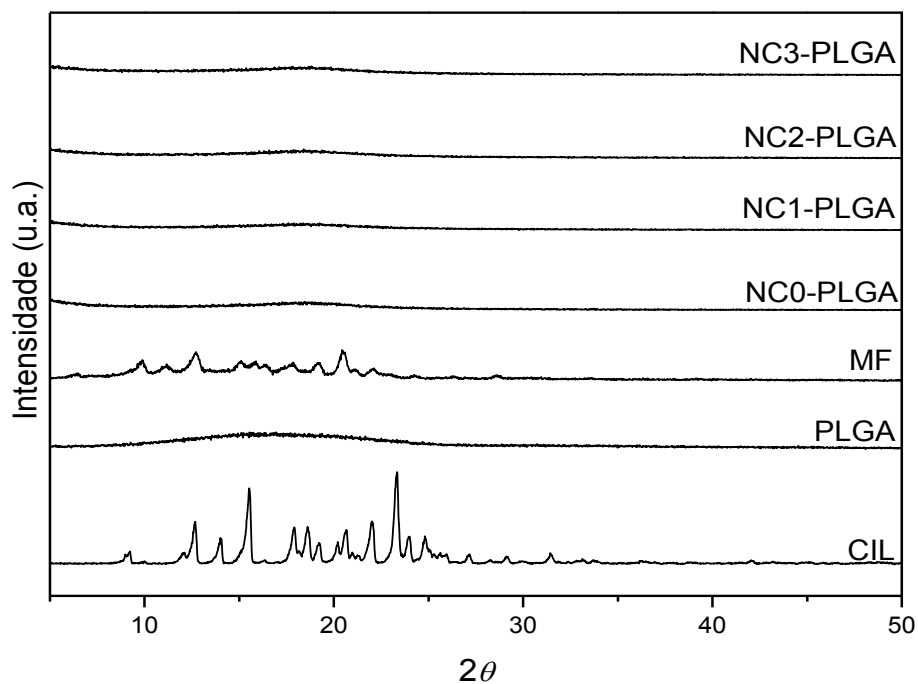
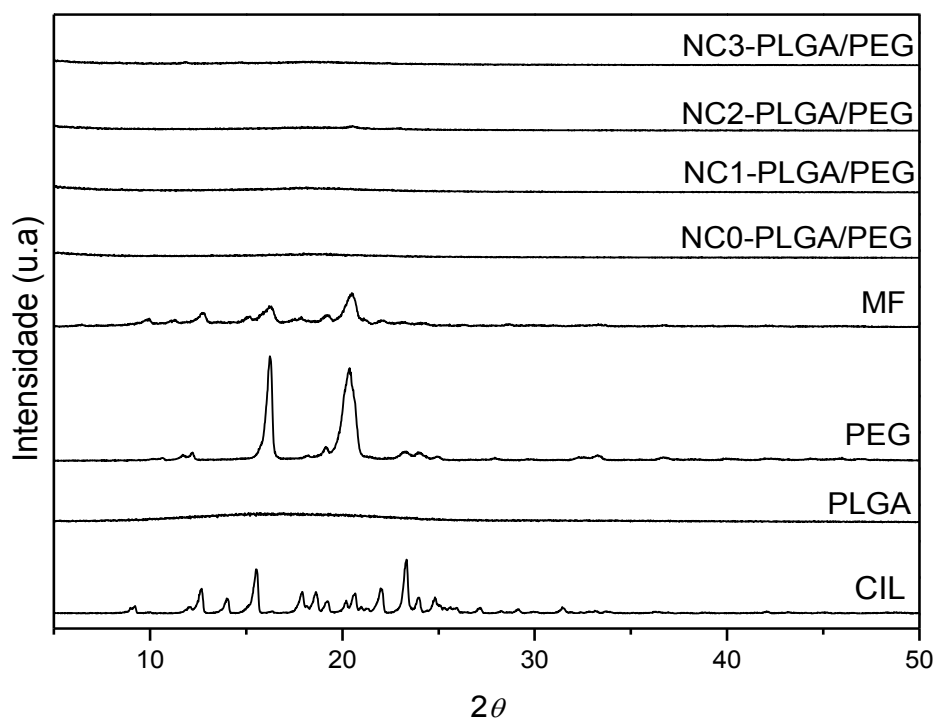


Figura 24: Difrátogramas do cilostazol, dos polímeros PLGA e PEG, da mistura física (CIL:PLGA:PEG, 1:1:1 m/m) e das suspensões de nanocápsulas poliméricas preparadas com blendas PLGA/PEG



A análise por difração de raios X detecta picos indicativos de cristalinidade correlacionados às estruturas cristalinas de sólidos, portanto a presença de halos amorfos em baixas intensidades confirma a ausência de cristalinidade e é condizente com a estrutura de nanocápsulas.

Para todas as formulações preparadas, os perfis obtidos são similares entre si e apresentam grande redução da cristalinidade dos seus componentes em decorrência do processo de nanoencapsulação. Esses resultados sugerem a dispersão molecular entre o CIL e os polímeros, resultando em nanopartículas de caráter amorfo, para as quais se espera melhores características de solubilidade em relação ao fármaco puro.

Conclusões semelhantes foram obtidas por Patel e Rajput (2009), os quais obtiveram um aumento na taxa de dissolução do CIL por meio de complexos de inclusão em ciclodextrinas.

5.7 Espectroscopia de absorção na região do infravermelho (IVTF)

As análises obtidas por espectroscopia vibracional de absorção na região do infravermelho permitem a identificação e elucidação estrutural de substâncias orgânicas em função da detecção de suas ligações e grupos funcionais. Também apontam possíveis interações moleculares entre o fármaco encapsulado e o polímero, pela comparação de deslocamentos, variações de intensidade, alargamento ou aparecimento de novas bandas com espectro característico ao da amostra (LOPES; FASCIO, 2004). Para tanto, os espectros obtidos visaram confirmar os principais grupos químicos dos compostos nas formulações como verificar a integridade do CIL após sua encapsulação.

O espectro IVTF obtido a partir da análise do CIL, representado na Figura 25, demonstrou bandas em 3185 cm^{-1} , referente à vibração de estiramento N – H de amida secundária e 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} .

Esses resultados são consistentes com os apresentados por Shimizu et al. (1985) e Patel e Rajput (2009), indicando que as ligações químicas encontradas são compatíveis com a estrutura química do CIL.

Para o poliéster PCL, o espectro (Figura 26) exibiu uma banda intensa em 1725 cm^{-1} , correspondente à vibração de deformação axial do grupamento $\text{C}=\text{O}$ de ésteres alifáticos simples. As bandas em 2944 e 2860 cm^{-1} correspondem às vibrações simétricas e assimétricas do grupamento $-\text{CH}_2$, respectivamente. Bandas observadas em 1171 e 1044 cm^{-1} são referentes ao estiramento $\text{C}-\text{O}$ (HOIDY et al., 2010; PAIVA et al., 2012).

Figura 25: Espectro IVTF do cilostazol

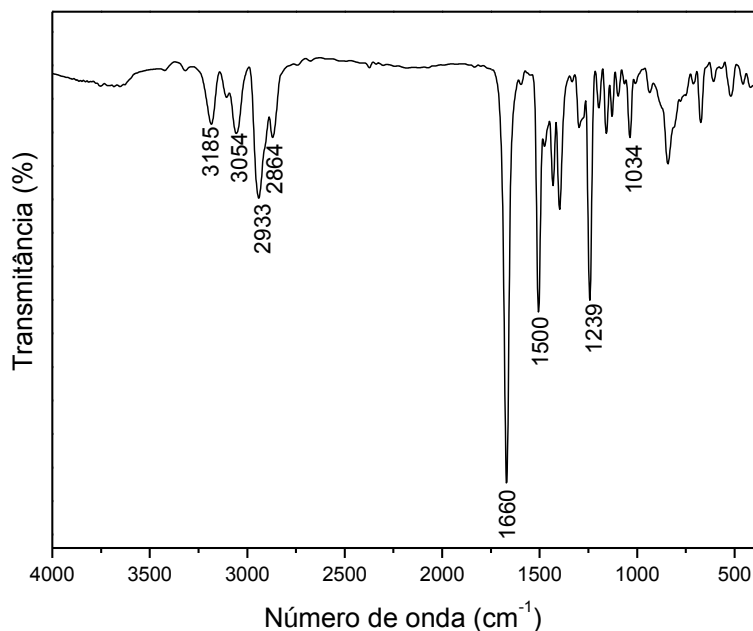
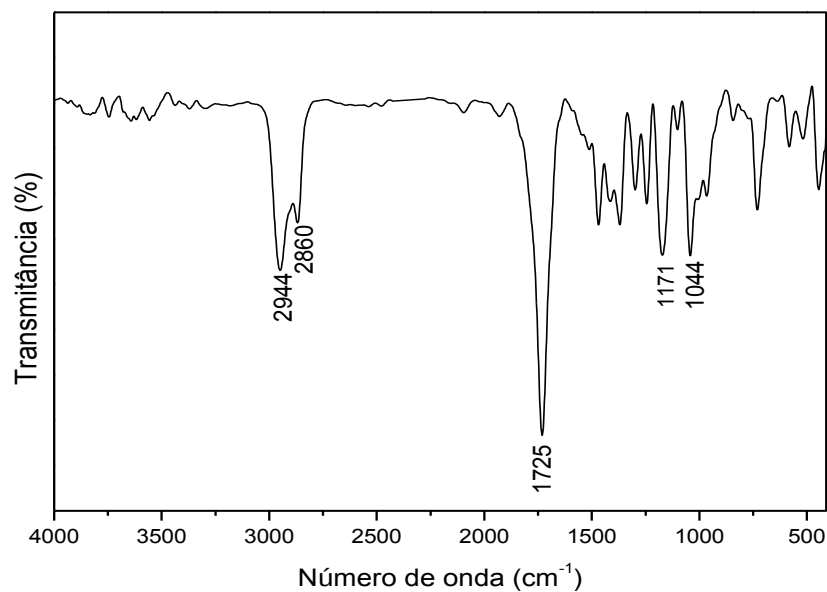
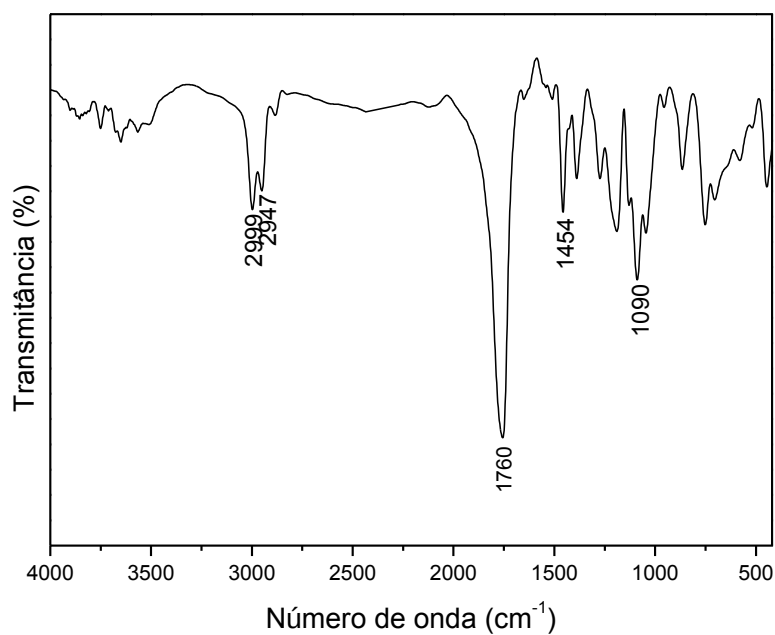


Figura 26: Espectro IVTF do polímero PCL



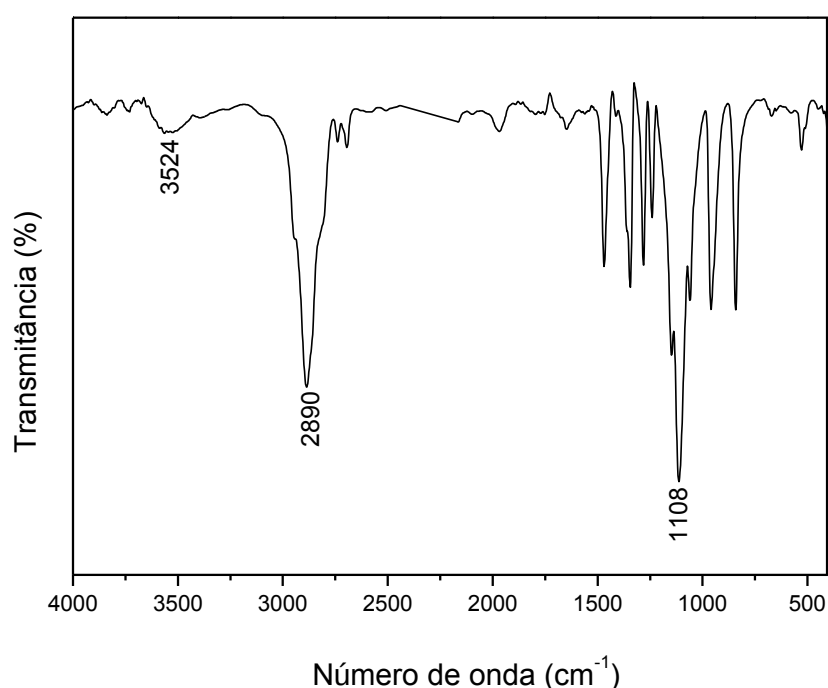
O polímero PLGA, representado na Figura 27 apresentou uma banda em 1758 cm^{-1} atribuída à frequência de estiramento de grupos carbonilas $\text{C}=\text{O}$ de ésteres. O estiramento dos grupos metila CH_3 são apresentados nas bandas em 2999 e 2947 cm^{-1} , enquanto as bandas em 1460 e 1090 cm^{-1} representam o estiramento das ligações $\text{C}-\text{O}$ presentes na molécula (YANG et al., 2007; SILVA et al., 2014).

Figura 27: Espectro IVTF do polímero PLGA



O espectro do polímero PEG (Figura 28), demonstrou absorções características em 3524 cm^{-1} referente aos grupos hidroxilas terminais -OH associados por ligações de hidrogênio. O grupamento C-H da cadeia alifática exibe uma banda em 2890 cm^{-1} e a vibração do estiramento assimétrico C-O-C de éteres dialquílicos está representada em 1108 cm^{-1} (BISWAL et al., 2008; PAIVA et al., 2012).

Figura 28: Espectro IVTF do polímero PEG



Os espectros comparativos de IVTF para o fármaco puro, os polímeros e blendas poliméricas, as misturas físicas e as suspensões de nanocápsulas (em diferentes concentrações) estão demonstrados nas Figuras 29, 30, 31 e 32.

Figura 29: Espectro IVTF do polímero (PCL), do cilostazol (CIL), da mistura física (MF): cilostazol + PCL (1:1 m/m) e das suspensões de nanocápsulas de PCL em diferentes concentrações

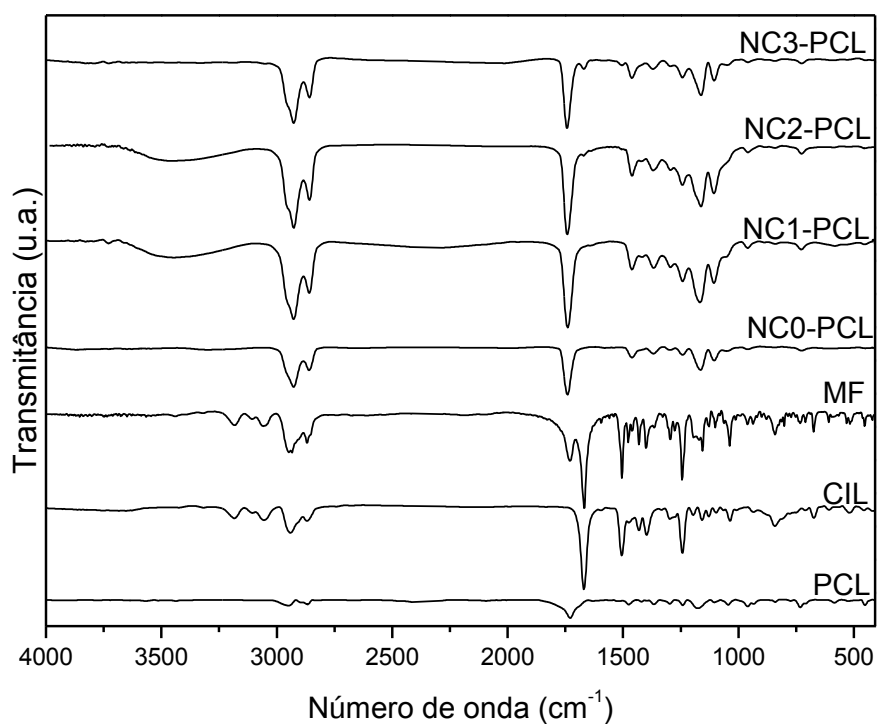


Figura 30: Espectro de IVTF dos polímeros (PCL) e (PEG), do cilostazol (CIL), da mistura física (MF): CIL+PCL+PEG (1:1:1 m/m) e das suspensões de blendas de PCL/PEG em diferentes concentrações

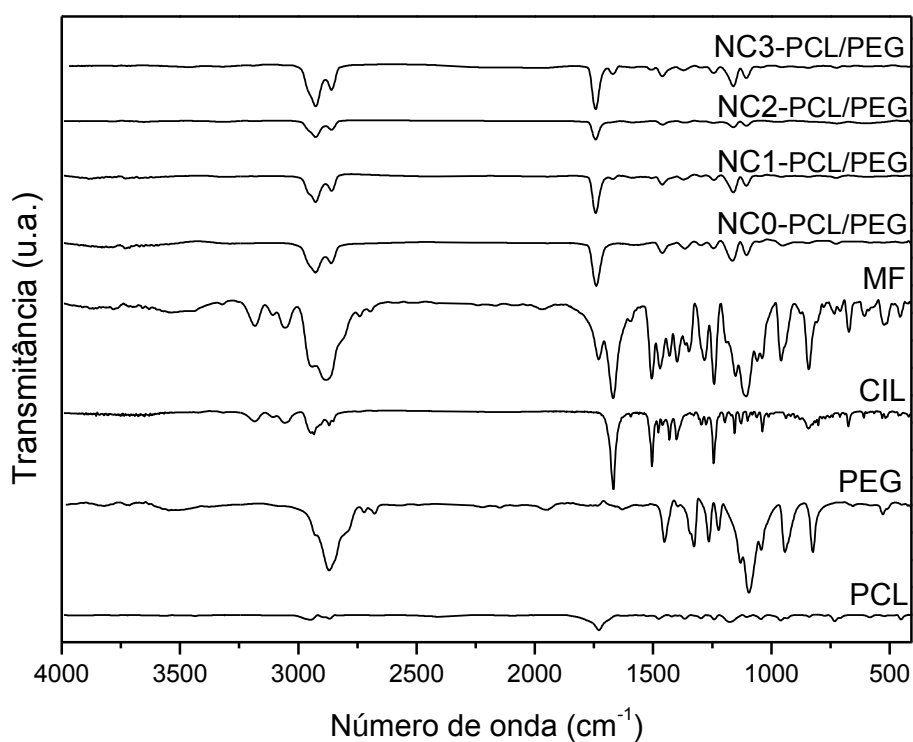


Figura 31: Espectro IVTF do polímero (PLGA), do cilostazol (CIL), da mistura física (MF): cilostazol + PLGA (1:1 m/m) e das suspensões de nanocápsulas de PLGA em diferentes concentrações

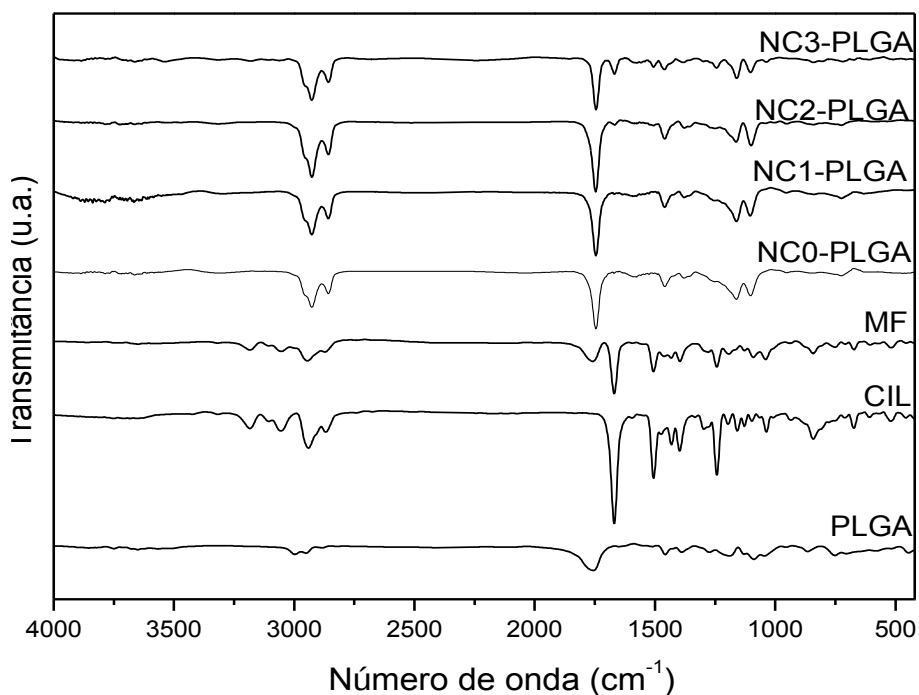
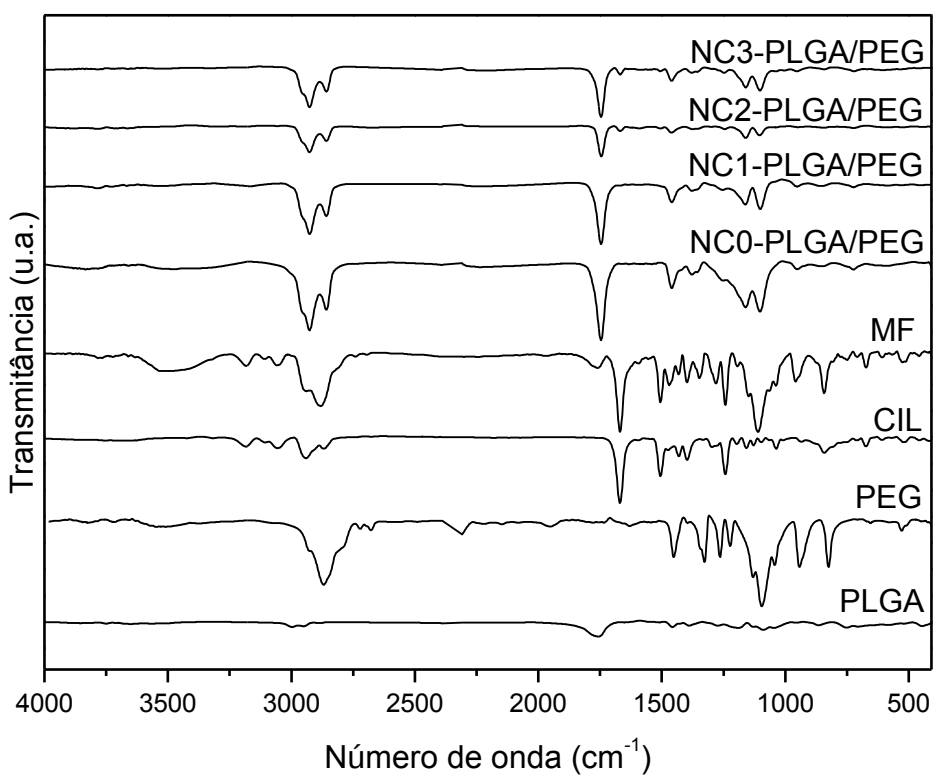


Figura 32: Espectro de IVTF dos polímeros (PLGA) e (PEG), do cilostazol (CIL), da mistura física (MF): CIL+PLGA+PEG (1:1:1 m/m) e das suspensões de blendas de PLGA/PEG em diferentes concentrações



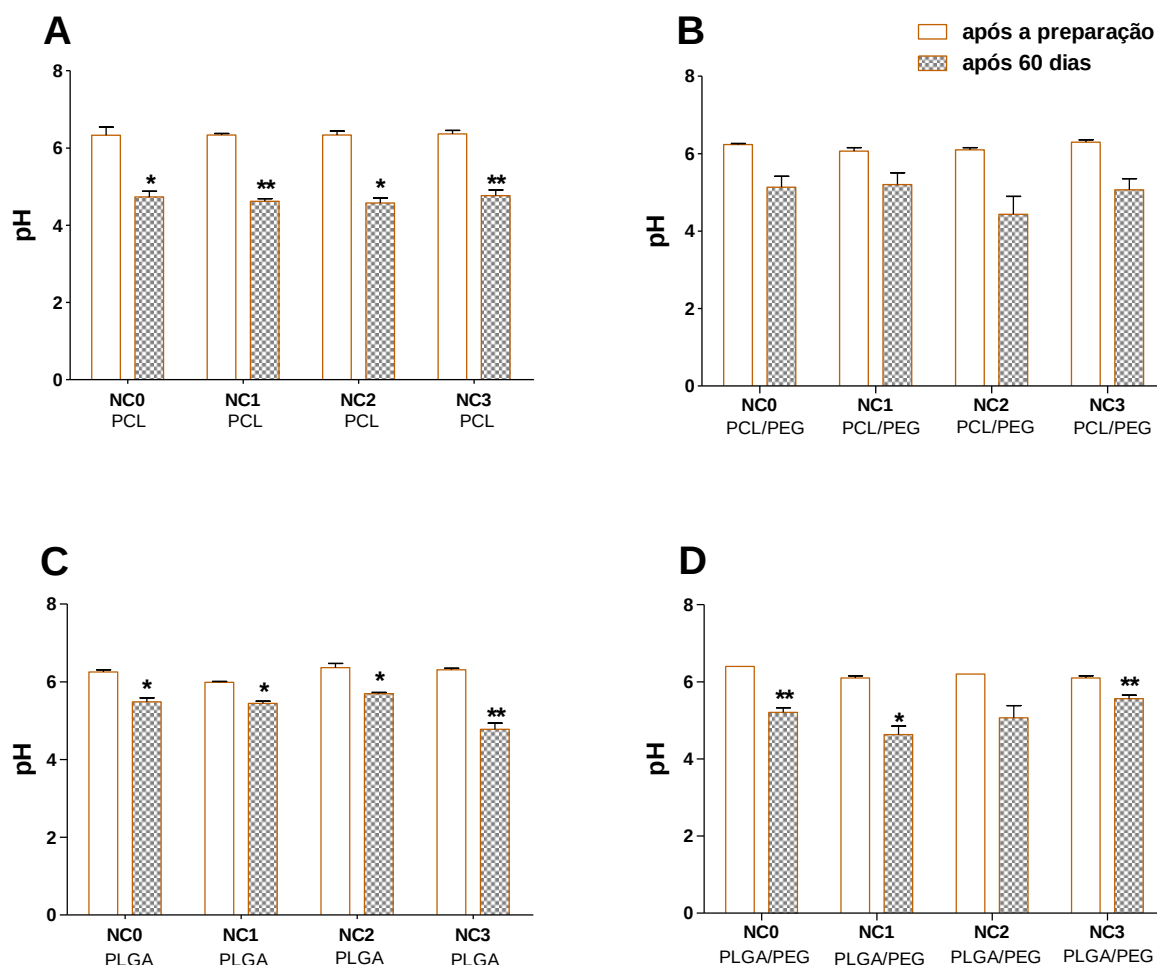
As análises espectrais das amostras demonstraram que não houve alteração dos grupos funcionais específicos dos componentes das formulações, sugerindo que não ocorreram reações químicas entre eles. Para as misturas físicas, suas bandas correspondem à soma das bandas encontradas para os compostos individuais (LOPES; FASCIO, 2004).

5.8 Estudo de estabilidade das suspensões de nanocápsulas poliméricas

Após 60 dias de armazenamento, à temperatura ambiente e protegido da incidência de luz, as formulações apresentaram a mesma aparência, sem alteração de cor, cremagem ou formação de precipitado. Os parâmetros de pH, tamanho médio de partícula (nm), índice de polidispersão e potencial zeta (mV) foram avaliados para todas as formulações e foram esquematizados nas Figuras 33, 34, 35 e 36, respectivamente.

Todas as formulações apresentaram um decréscimo nos valores de pH após o período de 60 dias (Figura 33). A diminuição foi significativa ($p < 0,05$) para a maioria das formulações. De acordo com Schaffazick et al. (2003), a diminuição dos valores de pH de suspensões coloidais poliméricas, em um curto período de tempo pode estar relacionada tanto à ionização de grupos carboxílicos presentes no polímero, quanto à hidrólise, dependendo da hidrofobicidade do poliéster.

Figura 33 - Valores de pH, após a preparação e após 60 dias para as formulações obtidas a partir de PCL (A), de PCL/PEG (B), de PLGA (C) e PLGA/PEG (D)

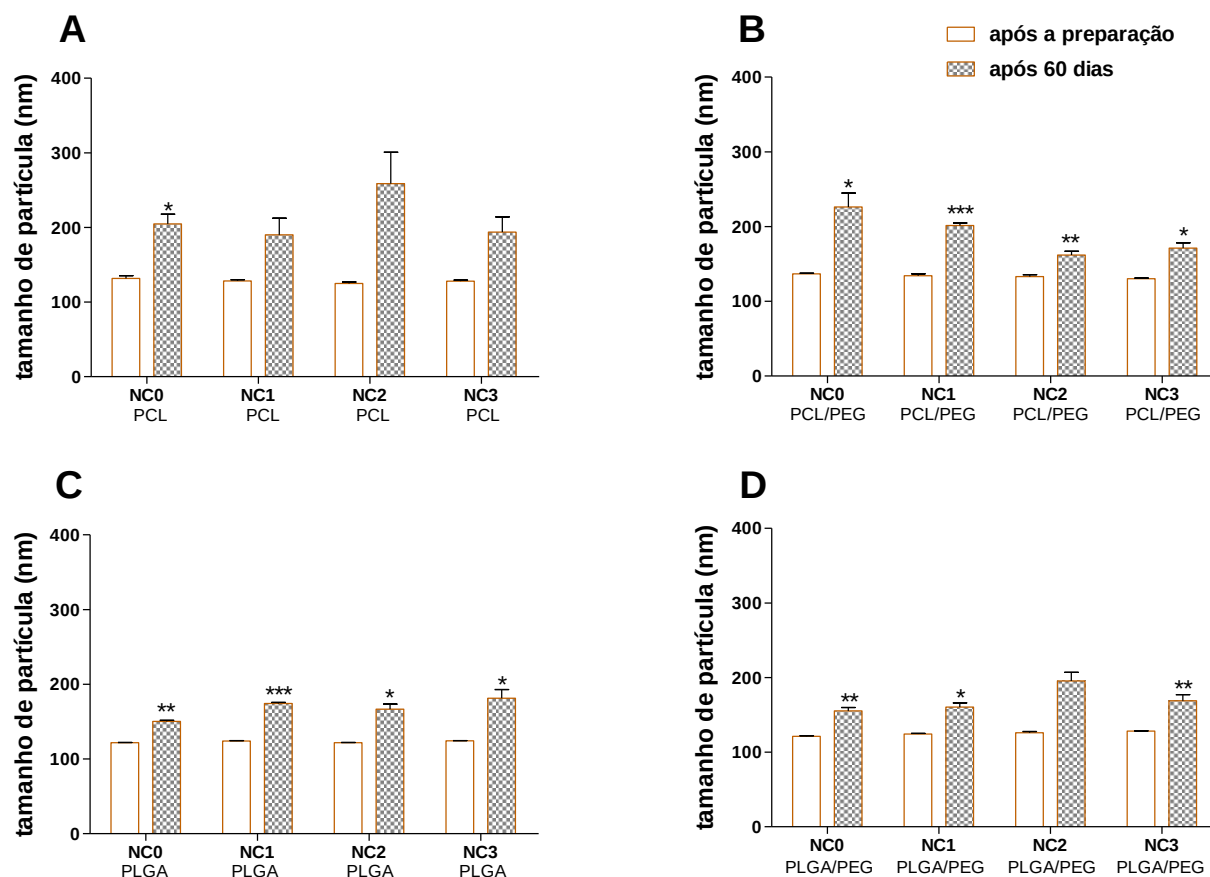


Nanocápsulas controle (NC0); nanocápsulas de cilostazol 0,01 mg.mL⁻¹ (NC1); nanocápsulas de cilostazol 0,02 mg.mL⁻¹ (NC2); nanocápsulas de cilostazol 0,03 mg.mL⁻¹ (NC3); * p<0,05; ** p<0,01

Os resultados obtidos no presente estudo estão em acordo com a literatura. Guterres et al. (1995) relataram um decréscimo significativo ($4,6 \pm 0,2$ a $3,8 \pm 0,1$) de pH nas formulações de nanocápsulas de PLA, devido à degradação do polímero, produzindo ácido láctico livre. Em estudo realizado por Santos et al. (2005) também foi verificada a redução do pH em nanocápsulas de PLGA ($7,40 \pm 0,03$ a $6,98 \pm 0,05$), devido à degradação de seus constituintes. Após um período de 60 dias, Santos et al. (2014) observaram um decréscimo significativo nos valores de pH de formulações de nanocápsulas elaboradas a partir do polímero Eudragit® RS 100.

A partir da mudança do tamanho médio das partículas (Figura 34) pode-se determinar a tendência de agregação das nanopartículas, em função do tempo.

Figura 34: Tamanho médio de partícula, após a preparação e após 60 dias para as formulações obtidas a partir de PCL (A), de PCL/PEG (B), de PLGA (C) e PLGA/PEG (D)

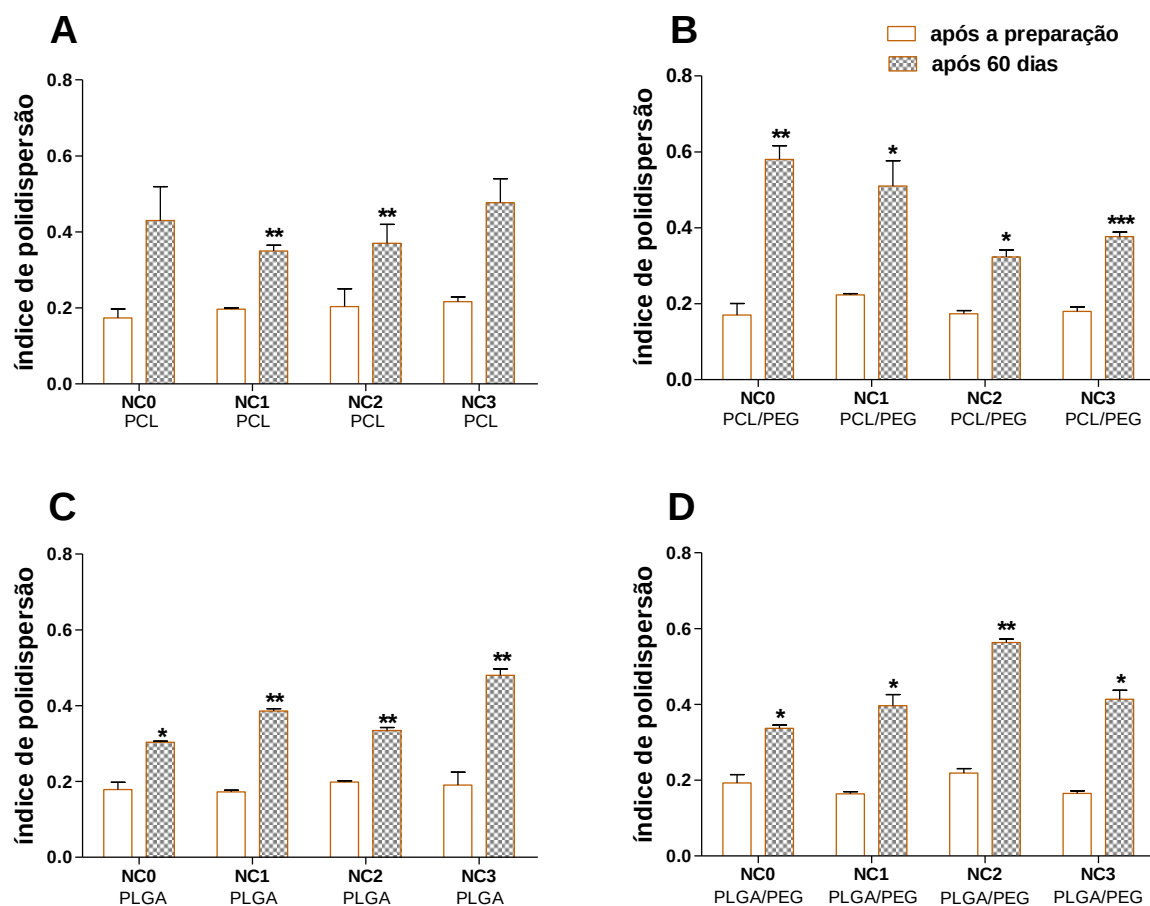


Nanocápsulas controle (NC0); nanocápsulas de cilostazol $0,01 \text{ mg.mL}^{-1}$ (NC1); nanocápsulas de cilostazol $0,02 \text{ mg.mL}^{-1}$ (NC2); nanocápsulas de cilostazol $0,03 \text{ mg.mL}^{-1}$ (NC3); * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$

Considerando os dados apresentados, pode-se observar que houve um aumento significativo ($p < 0,05$) para a maioria das formulações. No entanto, as nanocápsulas mantiveram-se com diâmetros inferiores a 300 nm, como anteriormente mencionado, o que assegura a eficiência de sistemas nanoparticulados para o carregamento de fármacos (GUPTA; KOMPELLA, 2006). O aumento do tamanho de nanopartículas também foi observado em outros estudos de estabilidade, como os realizados por Kùlkamp et al. (2009) e Almeida (2010).

Com relação ao índice de polidispersão, foi possível verificar que houve variação estatística ($p < 0,05$) para as formulações, após 60 dias de armazenamento (Figura 35).

Figura 35: Índice de polidispersão, após a preparação e após 60 dias para as formulações obtidas a partir de PCL (A), de PCL/PEG (B), de PLGA (C) e PLGA/PEG (D)

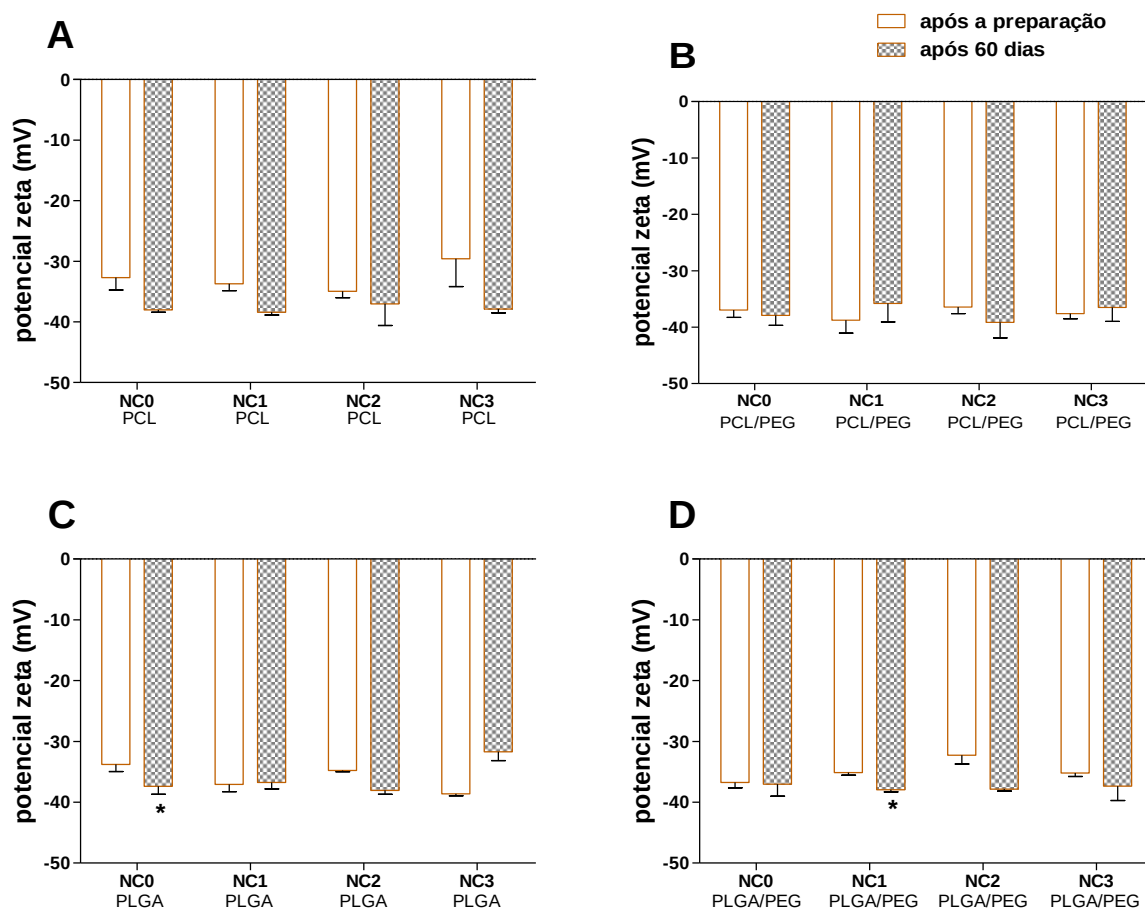


Nanocápsulas controle (NC0); nanocápsulas de cilostazol 0,01 mg.mL⁻¹ (NC1); nanocápsulas de cilostazol 0,02 mg.mL⁻¹ (NC2); nanocápsulas de cilostazol 0,03 mg.mL⁻¹ (NC3); * p<0,05; ** p<0,01; ***p<0,001

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 (Figura 36), não foram observadas diferenças estatísticas ($p > 0,05$) após o armazenamento, com exceção das formulações NC0-PLGA e NC1-PLGA/PEG, o que permite prever uma boa estabilidade coloidal, devido a uma alta energia de limitação entre as partículas (MORA-HUERTAS; FESSI; ELAISSARI, 2010).

Figura 36: Potencial zeta, após a preparação e após 60 dias para as formulações obtidas a partir de PCL (A), de PCL/PEG (B), de PLGA (C) e PLGA/PEG (D)



Nanocápsulas controle (NC0); nanocápsulas de cilostazol $0,01 \text{ mg.mL}^{-1}$ (NC1); nanocápsulas de cilostazol $0,02 \text{ mg.mL}^{-1}$ (NC2); nanocápsulas de cilostazol $0,03 \text{ mg.mL}^{-1}$ (NC3); * $p < 0,05$

Embora os resultados do estudo de estabilidade apresentados para o potencial zeta não tenham sido estatisticamente diferentes, em geral, os valores tornaram-se mais negativos após 60 dias. Isso também foi descrito no trabalho realizado por Kulkamp et.al. (2009), em que foi observado um aumento significativo do potencial zeta, para mais negativo, durante 28 dias de armazenamento de nanopartículas de ácido lipoico, justificado pela ionização de grupos ácido da parede polimérica.

A partir dos resultados obtidos, pode-se observar que as formulações mantiveram uma boa estabilidade em suspensão, garantida pelo potencial zeta. Entretanto, do ponto de vista de tamanho de partícula e índice de polidispersão essas suspensões apresentaram uma considerável variação.

6 CONCLUSÕES

Os resultados obtidos neste trabalho permitem concluir que as nanocápsulas dos polímeros PCL e PLGA contendo CIL, com ou sem modificação superficial por PEG, foram obtidas com sucesso pelo método de deposição interfacial do polímero. O método analítico desenvolvido e validado por CLAE mostrou-se seletivo, linear, preciso, exato e robusto para a quantificação do CIL. Foram obtidos valores elevados de eficiência de encapsulação. As nanopartículas apresentaram parâmetros físico-químicos adequados quando recentemente preparadas. As imagens fornecidas por microscopia eletrônica de varredura e de transmissão demonstraram-se concordantes entre si, apresentando nanocápsulas de formas esféricas, com superfícies lisas e homogeneidade na distribuição de tamanho. Os resultados de difração de raios X revelaram a ausência de cristalinidade das nanocápsulas, evidenciando que o processo de nanoencapsulação conduziu a uma amorfização do fármaco. Os espectros revelados por espectroscopia na região do infravermelho demonstraram que não ocorreram reações químicas entre o CIL e os polímeros durante o processo de nanoencapsulação. As formulações de CIL obtidas a partir de blendas PCL/PEG foram as que apresentaram melhores parâmetros de estabilidade após 60 dias.

7. REFERÊNCIAS

- AL HAUSHEY, L. et al. Improvement of a bovine serum albumin microencapsulation process by screening design. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 344, p. 6-25, 2007.
- ALLÉMANN, E.; GURNY, R.; DOELKER, E. Drug loaded nanoparticles preparation methods and drug targeting issues. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 39, p. 173-191, 1993.
- ALMEIDA, F. J. F. **Desenvolvimento, caracterização e avaliação da atividade antitumoral de nanocápsulas convencionais e furtivas contendo ácido úsnico**. 2010, 84 f. Dissertação (Mestrado em Bioquímica e Fisiologia) – Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2010.
- 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.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RE 899 de 29 de maio de 2003. Determina a publicação do guia para a validação de métodos analíticos. Diário Oficial da República Federativa do Brasil. Brasília, 02 de julho de 2003. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/hotsite/genericos/legis/resolucoes/2003/899_03re_e.pdf>. Acesso em: 02 fev. 2015.
- AVADI, M. R. et al. Preparation and characterization of insulin nanoparticles using chitosan and arabic gum with ionic gelation method. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine**. v. 6. p. 58–63. 2010.
- BISWAL, S. et al. Enhancement of dissolution rate of gliclazide using solid dispersions with polyethylene glycol 6000. **AAPS PharmSciTech**, v. 9 n.2, p. 563-570. Jun. 2008.
- BLOUZA, I. L. et al. Preparation and characterization os spironolactone-loaded nanocapsules for paediatric use. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 325, p. 124-131, 2006.
- BORGES, J. L. Cilostazol e aterosclerose. **Revista Brasileira Médica**, v. 66, n. 11, p. 390-404, nov. 2009.
- CENTRO BRASILEIRO DE INFORMAÇÃO SOBRE MEDICAMENTOS. Conselho Federal de Farmácia. Evidência farmacoterapêutica do cilostazol. Brasília, 2004. Disponível em: <http://www.cff.org.br/cebrim.html>>. Acesso em: 15 jan. 2015.
- CHEN, Y. et al. 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.

CILOSTAZOL. The internet drug index. 12 set. 2007. Disponível em: <http://www.rxlist.com/script/main/rxlist.asp.articlekey=66866&pf=3&page=1>>. Acesso em: 31 mai. 2014.

COIMBRA, M. et al. 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.

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

DALPIAZ, A. et al. Fabrication via a nonaqueous nanoprecipitation method, characterization and in vitro biological behavior of N6 - Cyclopentyladenosine-Loaded Nanoparticles. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 98, n. 11, p. 4272-4284, 2009.

DANHIER, F.; ANSORENA, E.; SILVA, J. M.; COCO, R.; LE BRETON, A.; PRÉAT, V. PLGA - based nanoparticles: An overview of biomedical applications. **Journal of Controlled Release**, v. 161, p. 505-522, 2012.

DURÁN, N.; MATOSSO, L. H. C.; MORAIS, P. C. **Nanotecnologia, introdução, preparação e caracterização de nanomateriais e exemplos de aplicação**. 1. ed. São Paulo: Artliber, p. 161-164, 2006.

DURAZZO, A. E. et al. Doença arterial obstrutiva periférica: que atenção temos dispensado à abordagem clínica dos pacientes? **Jornal Vascular Brasileiro**, v. 4, n. 3, p. 255-264, 2005.

ERBETTA, C. D. C. et al. Síntese e caracterização térmica e química do copolímero poli(D,L-lactídeo-co-glicolídeo). **Polímeros**, v. 21, n.5, p. 376-382, 2011.

FAYED, A. S. et al. Validated stability-indicating methods for determination of cilostazol in the presence of its degradation products according to the ICH guidelines. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 45, p. 407-416, 2007.

FESSI, H. et al. Nanocapsule formation by interfacial polymer deposition following solvent displacement. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 55, n. 1, p. R1-R4, 1989.

GAWALI, V. U. et al. Studies on cilostazol and β - cyclodextrin inclusion complexes. **International Journal of PharmTech Research**, v. 1, n. 4, p. 1073-1078, 2009.

GRAF, R. et al. Biodegradable long-circulating polymeric nanospheres. **Science**, v. 263; p. 1600-03, 1994.

GRAF, R. et al. The controlled intravenous delivery of drugs using PEG-coated sterically stabilized nanospheres. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 16, p. 215-233, 1995.

GRAF, R. et al. '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.

GUPTA, R. B.; KOMPELLA, U. B. Nanoparticles Technology for Drug Delivery. **Taylor & Francis Group**, v. 159, p. 199-229, 2006.

GUTERRES S. S. et al. Poly (DL-lactide) nanocapsules containing diclofenac: I. Formulation and stability study. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 113, p. 57-63, 1995.

GUTERRES, S.S. et al. 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.

HOIDY, W. H. et al. Preparation and characterization of polylactic acid/polycaprolactone clay nanocomposites. **Journal of Applied Sciences**, v.10, n. 2, p. 97-106, 2010.

HONG, H.; MACKEY, W.C. The limits of evidence in drug approval and availability: a case study of cilostazol and naftidrofuryl for the treatment of intermittent claudication. **Clinical Therapeutics**, v. 36, p. 1290-1301, 2014.

ICH - International Conference on Harmonization of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human use: Q2B – Validation of analytical procedures: Text and methodology, ICH Steering Committee: Geneva, 2005. Disponível em: http://www.ich.org/fileadmin/Public_Web_Site/ICH_Products/Guidelines/Quality/Q2_R1/Step4/Q2_R1__Guideline.pdf. Acesso em: 02 fev 2015.

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

JOTI J. et al. Validation and optimization of a simple RP-HPLC method for determination of cilostazol in human serum. **Indian Journal of Novel Drug Delivery**, v. 3, n. 2, p. 143-148, 2011.

KANDIL, B. A. et al. Evaluation of the imaging efficiency of gold nanoparticles and iodine encapsulated in polymer nanocapsules as X-ray contrast agents. **International Journal of Chemical & Applied Biological Sciences**, v. 1, n. 5, p. 18-23, 2014.

KOHDA, N. et al. Effect of cilostazol, a phosphodiesterase iii inhibitor, on experimental thrombosis in the porcine carotid artery. **Thrombosis Research**, v. 96, p. 261-268, 1999.

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.

KÜRT, L. et al. Study of the parameters influencing the co-grinding process for the production of meloxicam nanoparticles. **Powder Technology**, v. 212, p. 210-217, 2011.

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

KÜLKAMP, I. et al. Estabilização do ácido lipoico via encapsulação em nanocápsulas poliméricas planejadas para aplicação cutânea. **Química Nova**, v. 32, n. 8, 2009.

LEE, K. Y.; YUK, S.H., Polymeric protein delivery systems. **Progress in Polymer Science**, v. 32, n. 7, p. 669-697, 2007.

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

LOPES, W. A.; FASCIO, M. Esquema para interpretação de espectros de substâncias orgânicas na região do infravermelho. **Química Nova**, vol. 27. n. 4, p. 670-673, 2004.

LU, Z. et al. Paclitaxel-loaded gelatin nanoparticles for intravesical bladder cancer therapy. **Clinical Cancer Research**, v.10, p. 7677-7784, 2004.

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**. 2010, 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.

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. et al. 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.

NEVES, A. R. et al. Novel resveratrol nanodelivery systems based on lipid nanoparticles to enhance its oral bioavailability. **International Journal of Nanomedicine**, v. 8, p. 177-187, 2013.

NAGAWARMA, B. V. N. et al. 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.

NORGREN, L. et al. Inter-Society Consensus for the Management of Peripheral Arterial Disease (TASC II). **European Journal Vascular et Endovascular Surgery**, v. 33, p. S1-75, 2007.

NORONHA, C. M. et al. Optimization of α -tocopherol loaded nanocapsules by the nanoprecipitation method. **Industrial Crops and Products**, v. 50, p. 806-903, 2013.

OLIN, J. T. et al. Provisional diagnostic criteria for depression of Alzheimer disease. **American Journal of Geriatric Psychiatry**, v. 10, p. 125-128, 2002.

OPPENHEIM, R. C. Solid colloidal drug delivery systems: nanoparticles. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 8, p. 217-234, 1981.

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

PAVIA, D.L. et al. **Introdução à Espectroscopia**. 4. ed. São Paulo: Cengage Learning, 2010, 716 p.

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.

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

PINTO REIS C.; NEUFELD RJ., RIBEIRO AJ., 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, jun. 2006.

PUISIEUX, F.; BARRAT, G.; COUARRAZE, G.; COUVREUR, P.; DEVISSAGUET, J. P.; DUBERNET, C.; FATTAL, E.; FESSI, H.; VAUTHIER, C.; BENITA, S. **Polymeric Biomaterials**, Dekker, New York, 1994, cap. 16.

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

QUINTANAR-GUERRERO, D. et al. 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.

REIS, C. P. et al. Nanoencapsulation. I. Methods for preparation of drug-loaded polymeric nanoparticles. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine**, v. 2, p. 8-21, 2006.

REZENDE, C. A. et al. Membranas de poli (ácido láctico-co-ácido glicólico) como curativos para pele: degradação *in vitro* e *in vivo*. **Polímeros**, v. 15, n. 3, p. 232-238, jul. 2005.

REZWAN, K. et al. Biodegradable and bioactive porous polymer/inorganic composite scaffold for bone tissue engineering. **Biomaterials**, v. 27, p. 3412-3431, 2006.

RIBANI, M. et al. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Química Nova**, v. 27, n. 5, p. 771-780, set./out. 2004.

RIEKES, M. K. et al. Evaluation of oral carvedilol microparticles prepared by simple emulsion technique using poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) and polycaprolactone as polymers. **Materials Science and Engineering**, v. 31, p. 962-968, 2011.

ROBINSON, B. P. et al. Calvarial bone repair with porous D, L-polyacide. **Otolaryngol Head Neck Surg**, v. 112, p. 707-712, 1995.

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.

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.

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

SANTOS, N. P.; NASCIMENTO, S. C.; SILVA, J. F.; PEREIRA, E.C.G.; SILVA, N.H.; HONDA, N.K.; SANTOS-MAGALHÃES, N.S. Usnic acid nanocapsules: na evaluation of cytotoxicity. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**, v. 15, n. 5, p. 355-361, 2005.

SANTOS, S. S. et al. A simple RP-HPLC method for the determination of clotrimazole from acrylic nanocapsule suspensions. **Latin American Journal of Pharmacy**, v. 31, n. 3, p. 482-486, 2012.

SANTOS, S. S. et al. 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.

SCHAFFAZICK, S. R. et al. Caracterização e estabilidade físico-química de sistemas poliméricos nanoparticulados para administração de fármacos. **Química Nova**, v. 26, n. 5, p. 726-737, 2003.

SEVERINO, P. et al. Polímeros sintéticos biodegradáveis: matérias-primas e métodos de produção de micropartículas para uso em drug delivery e liberação controlada. **Polímeros**, v. 21, n. 4, p. 286-292, 2011.

SHI, S. et al. 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.; NAKAGAWA, K., Physico-chemical properties and stability of cilostazol. **Arzneimittelforschung**, v. 35, p. 1117– 1123, 1985.

SILVA, A. T. C. R. et al. Síntese e caracterização do copolímero PLGA e sua produção em nanofibras contendo o fármaco atenolol. **XII Congresso Internacional de Polímeros**, Porto de Galinhas, 2014.

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

SOPPIMATH, K. S. et al. 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.

STORM, G. et al. Surface modification of nanoparticles to oppose uptake by the mononuclear phagocyte system. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 17, p. 31-48, 1995.

TORRENT, J. D. et al. 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.

UMA DEVI, S. et al. New RP-HPLC method development and validation for estimation of cilostazol in bulk sample and dosage form and its application to forced degradation studies. **Journal of Pharmacy Research**, v. 5, n. 12, p. 5397, 2012.

VAN DE VEN, H. et al. PLGA nanoparticles and nanosuspensions with amphotericin B: Potent in vitro and in vivo alternatives to Fungizone and AmBisome. **Journal of Controlled Release**, v. 161, n. 3, p. 794-303, 2012.

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

WESSLER, K. et al. 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, p.11-23, 2005.

ZHAO, Y.; BROWN, M.B.; JONES, S.A. The topical delivery of benzoyl peroxide using elegant dynamic hydrofluoroalkane foams. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 99, p. 1384-1398, 2010.