



República Federativa do Brasil
Ministério da Indústria, Comércio Exterior
e Serviços
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(21) **BR 102016018451-7 A2**

(22) **Data do Depósito:** 11/08/2016

(43) **Data da Publicação:** 29/05/2018



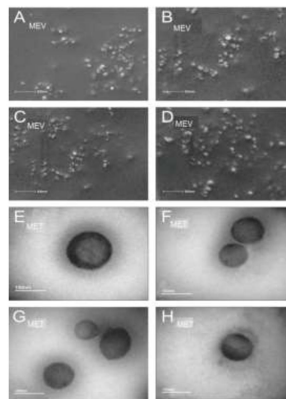
(54) Título: PROCESSO DE OBTENÇÃO E USO DE NANOCÁPSULAS POLIMÉRICAS CONTENDO CILOSTAZOL COMO ANTIAGREGANTE PLAQUETÁRIO

(51) Int. Cl.: A61K 9/51; A61K 9/22; A61K 31/4709; B82Y 5/00; A61P 7/02

(73) Titular(es): UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ, UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA

(72) Inventor(es): SANDRA MARIA WARUMBY ZANIN; MONA LISA SIMIONATTO GOMES; MARILIS DALLARMI MIGUEL; OBDULIO GOMES MIGUEL; JOSIANE DE FÁTIMA GASPARI DIAS; YASMINE MENDES PUPO; PAULO VITOR FARAGO; DÉBORA MARIA BORSATO; JESSICA MENDES NADAL; ANDRESSA NOVATSKI

(57) Resumo: O cilostazol é altamente recomendável o tratamento sintomático de claudicação intermitente e doença arterial periférica. No entanto, a interrupção do tratamento é, infelizmente, muito comum; estima-se que até 60% dos pacientes deixam de tomar cilostazol após 36 meses, devido aos seus efeitos colaterais e a frequência de administração. Além disso, o cilostazol é classificado como um fármaco de classe II pelo sistema de classificação biofarmacêutica e tem a solubilidade do fármaco como fator que interfere na velocidade e na extensão da absorção, o que pode comprometer a biodisponibilidade. Esta patente descreve o processo de obtenção e uso de nanocápsulas de blendas de PCL-PEG contendo cilostazol para diminuir a dose oral do fármaco e prolongar o efeito antiplaquetário in vivo, a fim de minimizar os inconvenientes da farmacoterapia.



PROCESSO DE OBTENÇÃO E USO DE NANOCÁPSULAS POLIMÉRICAS CONTENDO CILOSTAZOL COMO ANTIAGREGANTE PLAQUETÁRIO

Campo da Invenção

[001]. A presente invenção refere-se à identificação, processo e uso das propriedades antiagregante plaquetária e antitrombótica com ação vasodilatadora, antiproliferativa das células musculares lisas da artéria, antilipêmica, cardioprotetora e anti-inflamatória envolvida na resposta à lesão endotelial da aterosclerose de nanocápsulas poliméricas contendo cilostazol obtidas pelo método de deposição interfacial do polímero pré-formado.

[002]. A invenção está relacionada também às formas farmacêuticas, tais como soluções, suspensões, emulsões, pós, cápsulas, tabletes, comprimidos e drágeas, todas as quais contendo nanocápsulas poliméricas de cilostazol, obtidas pelo processo mencionado acima.

Estado da Arte

[003]. 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). 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).

[004]. 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.

[005]. 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. 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).

[006]. 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).

[007]. 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.

[008]. 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).

[009]. Os polímeros utilizados 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).

[010]. 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).

[011]. A PCL 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).

[012]. 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).

[013]. 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).

[014]. 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).

[015]. 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).

[016]. Entre os polímeros com a finalidade de estabilização estérica, o polietilenoglicol (PEG) é o polímero mais comumente utilizado para promover a modificação da superfície. 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).

[017]. 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 prolonga o tempo desses sistemas na circulação sistêmica, podendo otimizar as respostas terapêuticas (MOSQUEIRA et al., 2001; HANS; LOWMAN, 2002).

[018]. A literatura relata poucos trabalhos versando sobre a alteração da liberação do cilostazol. Gawali et al. (2009) elaboraram complexos de inclusão entre β -ciclodextrina e cilostazol 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 cilostazol-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 cilostazol (Pletoz® 50 mg) e aumento de 2,97 vezes em relação ao cilostazol puro. Pund, Shete e Jagadale (2014) demonstraram que nanoemulsões lipídicas de cilostazol apresentaram aumento na

solubilidade em Tween® 80 de 8,00 para 9,82 mg.mL⁻¹, em relação ao cilostazol 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 cilostazol puro.

[019]. Considerando os poucos trabalhos voltados a sistemas de liberação modificada envolvendo o cilostazol, bem como o potencial da nanotecnologia farmacêutica em solucionar problemas relacionados aos fármacos, especialmente no que se refere aos inconvenientes da terapia com o cilostazol, a presente invenção propõe o desenvolvimento de nanocápsulas poliméricas a fim de otimizar o tratamento da claudicação intermitente.

Histórico da Invenção

[020]. A presente patente de invenção refere-se a um estudo científico inédito por identificar propriedades antiagregante plaquetária e antitrombótica com ação vasodilatadora, antiproliferativa das células musculares lisas da artéria, antilipêmica, cardioprotetora e anti-inflamatória envolvida na resposta à lesão endotelial da aterosclerose de nanocápsulas poliméricas contendo cilostazol obtidas pelo método de deposição interfacial do polímero pré-formado.

[021]. O cilostazol é um derivado quinolônico (2-oxo-quinolona). Sua fórmula empírica é C₂₀H₂₇N₅O₂, com massa molecular de 369,46 g.mol⁻¹ e fórmula estrutural 6-[4-(1-ciclohexil-1H-tetrazol-5-il)butoxi]-3,4-diidro-2(1H)-quinolinona. 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).

[022]. 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).

[023]. A biodisponibilidade relativa do cilostazol 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 cilostazol 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).

[024]. O cilostazol 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 (DRUG INDEX, 2007). Cerca de 75% do cilostazol 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).

[025]. É um potente e seletivo inibidor da enzima fosfodiesterase III (FDE3). Sua ação é justificada por evitar a agregação plaquetária e estimular o relaxamento dos vasos pelo aumento dos níveis de monofosfato de adenosina cíclico (AMPc) (KOHDA et al., 1999; CRAIG, 2001; MORISHITA, 2006; ROSA; BARONI; PORTAL, 2008). O 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 FDE3.

[026]. 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).

[027]. Devido às propriedades vasodilatadoras, 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).

[028]. O cilostazol 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).

[029]. 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 (ROSA; BARONI; PORTAL, 2008).

[030]. 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 doença arterial obstrutiva periférica (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 cilostazol 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).

[031]. A dose recomendada de cilostazol 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).

[032]. 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).

[033]. 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 cilostazol 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.

[034]. Dessa forma, o uso de nanocápsulas poliméricas contendo cilostazol apresenta-se como uma alternativa promissora na promoção do aumento da solubilização aparente do cilostazol melhorando seu perfil de dissolução e, conseqüentemente, sua ação farmacológica.

Descrição Detalhada da Invenção

[035]. A presente invenção refere-se ao processo de obtenção e uso de nanocápsulas poliméricas contendo cilostazol.

[036]. As suspensões de nanocápsulas foram obtidas a partir de blendas de poli (ϵ - caprolactona(PCL) e polietilenoglicol (PEG), pelo procedimento de deposição interfacial do polímero pré-formado desenvolvido e descrito por Fessi et al (1989). Resumidamente, a blenda polimérica foi solvatada em acetona na presença de Span 80®, cilostazol (em diferentes concentrações) e triglicerídeos dos ácidos cáprico/caprílico, constituindo assim a fase orgânica. Em seguida, essa fase foi gotejada 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 foi,

então, eliminado por rotaevaporação, atingindo um volume final de 10 mL e concentrações de cilostazol de 3,0 (NC3), 6,0 (NC6) e 12,0 mg.mL⁻¹ (NC12). Para fins comparativos, foi preparada uma suspensão de nanocápsulas sem a adição do fármaco (NC-0), como controle negativo.

[037]. Após a preparação, as formulações apresentaram um aspecto leitoso opalescente com reflexo azulado resultante do movimento Browniano das estruturas coloidais (efeito Tyndall).

[038]. Para a determinação do conteúdo do fármaco incorporado às nanocápsulas foi desenvolvido e validado um método de quantificação por cromatografia líquida de alta eficiência. Considerando o conteúdo do fármaco, as formulações apresentaram concentrações com valores muito próximos aos teóricos, indicando que praticamente não houve perda de fármaco durante a preparação. Além disso, todas as formulações apresentaram valores de eficiência de encapsulação superiores a 99,52%, o que está relacionado à baixa solubilidade aquosa do cilostazol (3,0 µg.mL⁻¹ a 25°C) (SHIMIZU et al., 1985), que conduziu ao aumento da concentração do fármaco incorporada à nanopartícula.

[039]. Com o objetivo de comprovar a morfologia das partículas, foram analisadas imagens por microscopia eletrônica de varredura e por microscopia eletrônica de transmissão. Foram observadas partículas nanométricas de superfície lisa e sem poros, como demonstrado na Figura 1.

[040]. A difração de raios X avalia 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). Para todas as formulações preparadas, foram obtidos perfis de difração cristalina com grande redução da cristalinidade em decorrência do processo de nanoencapsulação. Esses resultados sugerem a dispersão molecular entre o cilostazol nos polímeros, resultando em nanopartículas de caráter amorfo, para as quais se espera melhores características de solubilidade em relação ao fármaco puro.

[041]. As análises obtidas por espectroscopia 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).

[042]. O espectro IVTF do cilostazol puro 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 CH₂ 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. Para o poliéster PCL, o espectro exibiu uma banda intensa em 1725 cm⁻¹, correspondente à vibração de deformação axial do grupamento C = O de ésteres alifáticos simples. As bandas em 2944 e 2860 cm⁻¹

correspondem às vibrações simétricas e assimétricas do grupamento –CH₂, respectivamente. Bandas observadas em 1171 e 1044 cm⁻¹ são referentes ao estiramento C – O. O espectro do PEG, demonstrou absorções características em 3524 cm⁻¹ referente aos grupos hidroxilas terminais –OH. O grupamento C – H da cadeia alifática exibe uma banda em 2890 cm⁻¹ e em 2944 e 2860 cm⁻¹, vibração do estiramento simétrico e assimétrico C – H₂ da cadeia alifática. A vibração do estiramento assimétrico C – O – C de éteres dialquílicos foi demonstrada em 1108 cm⁻¹.

[043]. As misturas físicas e as nanocápsulas apresentaram atribuições da banda na mesma faixa de número de onda. Portanto, não foi observada diferença na posição de bandas de absorção entre a mistura física e as nanocápsulas de cilostazol e blendas de PCL-PEG. Consequentemente, nenhuma ligação química entre o fármaco e os polímeros foi formado durante a nanoencapsulação.

[044]. A estabilidade foi avaliada imediatamente a preparação e após 60 dias, sendo que as suspensões coloidais de nanocápsulas poliméricas mantiveram o mesmo aspecto visual sem qualquer precipitação ou mudança de cor. O valor de pH, o tamanho médio das partículas (nm), o índice de polidispersão e o potencial zeta (mV) foram comparados imediatamente após a preparação e após 60 dias como demonstrado na Figura 2.

[045]. Considerando os valores de pH, não foi observada nenhuma diminuição significativa ($p > 0,05$) após 60 dias para todas as formulações. Estes resultados representam que não houve ionização dos grupos carboxílicos do poliéster e que não houve hidrólise da PCL durante o armazenamento. Observou-se um aumento significativo ($p < 0,05$) no tamanho das partículas. No entanto, os diâmetros finais mantiveram-se menor que 300 nm, sendo relatados como adequados

na literatura para sistemas nanoestruturados. Para o índice de polidispersão, foram encontrados valores significativamente mais elevados ($p < 0,05$) para todas as formulações após 60 dias de armazenamento, indicando heterogeneidade das nanopartículas estando relacionado ao aumento do tamanho das partículas. Em particular, as formulações NC0 e NC3 apresentaram valores de índice de polidispersão de 0,58 e 0,51 respectivamente, após 60 dias. Esses resultados indicam heterogeneidade nos diâmetros das partículas, pois foram observados valores próximos ou maiores que 0,5. Em relação ao potencial zeta, não houve diferença significativa ($p > 0,05$) para as formulações quando comparada os valores iniciais e finais. Estes dados sugerem uma estabilidade coloidal apropriada.

[046]. No que diz respeito aos estudos *in vitro* de liberação do fármaco e das nanocápsulas de blendas de PCL-PEG mostraram perfis de liberação semelhantes, independentemente da concentração de cilostazol ($p > 0,05$). NC3, NC6 e NC12 liberaram 80% de cilostazol em 90, 96 e 108 horas de experiência, respectivamente (Figura 3). Por outro lado, a solução de 30% de etanol-água e cilostazol liberou 80% do fármaco em cerca de 20 h. A diferença na taxa de liberação pode ser explicada pelo gradiente de concentração entre cada formulação e pelo meio de dissolução. Em concentrações mais elevadas de fármaco, este processo foi mais rápido uma vez que este gradiente é a força motriz para a dissolução do fármaco. Além disso, na maior concentração de fármaco encapsulado, o cilostazol pode ser distribuído perto da superfície da nanocápsula proporcionando uma liberação mais rápida *in vitro*. Esta diferença também pode ser explicada pela supersaturação, a nucleação e a presença de cilostazol em concentrações mais elevadas, levando a sua expulsão. Portanto, o

nanoencapsulação de cilostazol desacelerando a sua liberação, pode prolongar o seu efeito terapêutico.

[047]. Com o objetivo de comprovar a ação farmacológica das suspensões de nanocápsulas poliméricas contendo cilostazol, foi avaliada a atividade antiagregante plaquetária in vivo. Este fármaco deve ser administrado duas vezes ao dia para um resultado clínico adequado. Nesta patente, o efeito in vivo do cilostazol puro, da nanocápsula de cilostazol (NC12) e da aspirina sobre a inibição da agregação plaquetária estimulada por colágeno em ratos Wistar, foi comparada após 24 h da administração da última dose, a fim de analisar se a nanoencapsulação teve influência no prolongamento da resposta ao fármaco. Estes resultados estão apresentados na Figura 4. A nanosuspensão NC0 e o veículo foram utilizados como controles. As nanocápsulas sem cilostazol (NC0), as nanocápsulas com cilostazol (NC12) e a aspirina apresentaram um efeito estatisticamente significativo antiplaquetário em relação aos controles ($p < 0,01$). Além disso, NC12 teve um efeito significativo sobre a inibição da agregação de plaquetas em comparação com NC0 ($p < 0,001$), 24 horas após a última dose. Provavelmente, nanocápsulas de cilostazol inibiram a agregação de plaquetas durante um intervalo de tempo mais longo através do controle da taxa de liberação do fármaco. Assim, é possível sugerir que a nanoencapsulação de cilostazol em blendas de PCL-PEG pode diminuir a dosagem oral do fármaco e prolongar o efeito antiagregante in vivo, a fim de minimizar os seus inconvenientes em farmacoterapia. As nanocápsulas de cilostazol (NC12) levaram a um resultado semelhante em comparação com o da aspirina ($p > 0,05$), um fármaco padrão ouro de ação antiplaquetária. Além disso, este desempenho não foi conseguido pelo cilostazol puro em comparação com a aspirina ($p < 0,05$), no mesmo intervalo de tempo.

[048]. Em resumo, estes resultados demonstram que nanocápsulas poliméricas de cilostazol podem proporcionar um efeito antiplaquetário prolongado in vivo e podem ser aplicadas como um novo veículo para tratar eventos de doença arterial obstrutiva periférica e claudicação intermitente.

Citação das Figuras

[049]. As figuras em anexo servirão para um melhor entendimento da presente invenção.

[050]. A Figura 1 representa as fotomicrografias obtidas por microscopia eletrônica de varredura das suspensões de nanocápsulas NC0 (A), NC3 (B), NC6 (C) e NC12 (D) em aumento de 15kX e as fotomicrografias obtidas por microscopia eletrônica de transmissão das suspensões de nanocápsulas NC0 (E), NC3 (F), NC6 (G) e NC12 (H) em aumento de 25kX.

[051]. A Figura 2 representa os valores de tamanho de partícula, pH, índice de polidispersão e potencial zeta das suspensões de nanocápsulas de cilostazol avaliadas imediatamente à preparação e 60 dias após.

[052]. A figura 3 representa o perfil de liberação in vitro em uma solução de 30% etanol-água de cilostazol e nanocápsulas de PCL-PEG (NC3, NC6 e NC12).

[053]. A Figura 4 representa a porcentagem de inibição da agregação plaquetária de NC0 (controle), de cilostazol livre, das formulações de NC12 e da aspirina. Cada barra representa a média $\pm$ erro padrão da média a partir de 8 ensaios independentes. Os asteriscos indicam os níveis de significância comparados ao grupo controle: significativamente diferente, **p < 0,01 e *** p < 0,001, teste de Bonferroni.

REIVINDICAÇÕES

1. Processo de obtenção e uso de nanocápsulas poliméricas contendo cilostazol, caracterizados pelo tamanho nanométrico e monodisperso, pela estabilidade físico-química e pela alta eficiência de encapsulação do fármaco.
2. Processo de obtenção e uso de nanocápsulas poliméricas contendo cilostazol, caracterizados pela liberação prolongada do fármaco sem efeito *burst*.
3. Processo de obtenção e uso de nanocápsulas poliméricas contendo cilostazol, caracterizados pelo efeito antiagregante plaquetário estatisticamente semelhante à aspirina.

DESENHOS

Figura 1

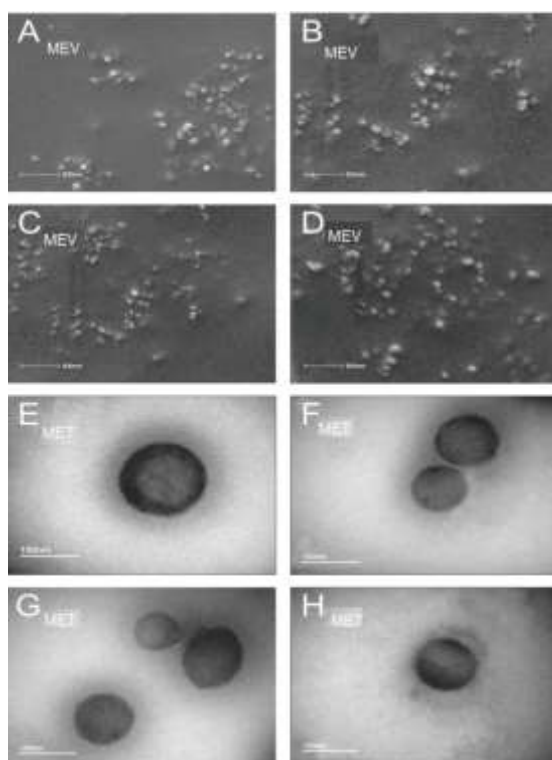


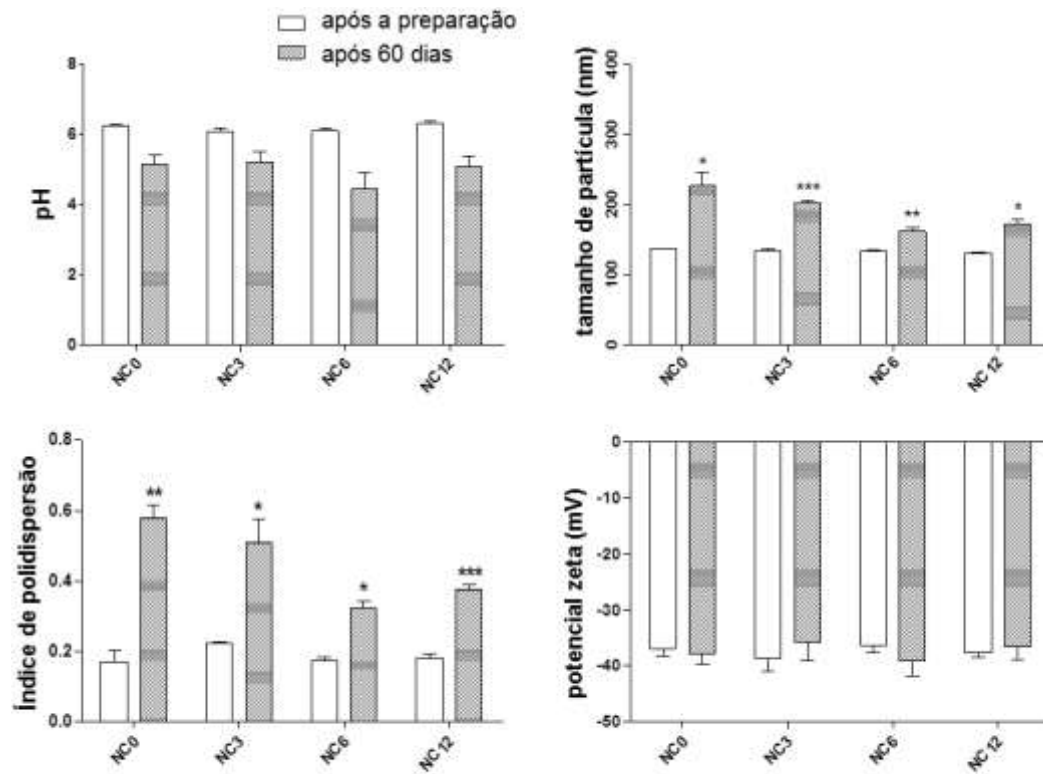
Figura 2

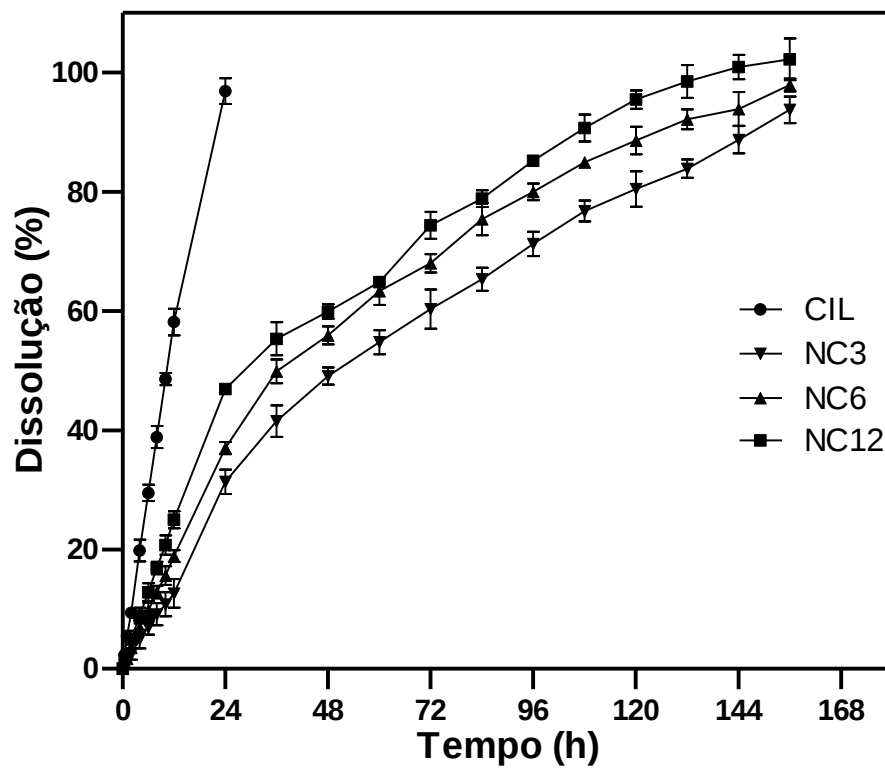
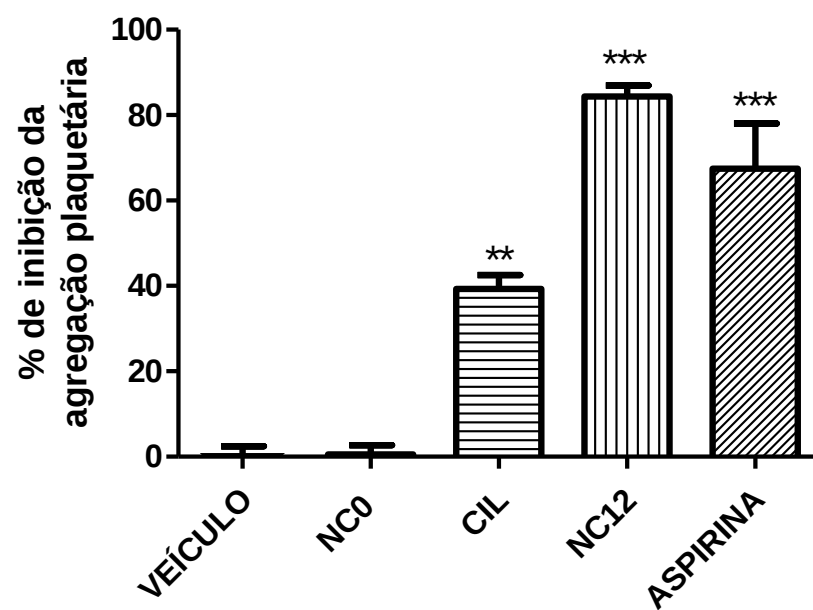
Figura 3

Figura 4

RESUMO**PROCESSO DE OBTENÇÃO E USO DE NANOCÁPSULAS
POLIMÉRICAS CONTENDO CILOSTAZOL COMO ANTIAGREGANTE
PLAQUETÁRIO**

O cilostazol é altamente recomendável o tratamento sintomático de claudicação intermitente e doença arterial periférica. No entanto, a interrupção do tratamento é, infelizmente, muito comum; estima-se que até 60% dos pacientes deixam de tomar cilostazol após 36 meses, devido aos seus efeitos colaterais e a frequência de administração. Além disso, o cilostazol é classificado como um fármaco de classe II pelo sistema de classificação biofarmacêutica e tem a solubilidade do fármaco como fator que interfere na velocidade e na extensão da absorção, o que pode comprometer a biodisponibilidade. Esta patente descreve o processo de obtenção e uso de nanocápsulas de blendas de PCL-PEG contendo cilostazol para diminuir a dose oral do fármaco e prolongar o efeito antiplaquetário in vivo, a fim de minimizar os inconvenientes da farmacoterapia.