

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

FERNANDA MALAQUIAS BARBOZA

DESENVOLVIMENTO, CARACTERIZAÇÃO E AVALIAÇÃO DE
MICROPARTÍCULAS POLIMÉRICAS CONTENDO MANIDIPINA

PONTA GROSSA

2013

FERNANDA MALAQUIAS BARBOZA

DESENVOLVIMENTO, CARACTERIZAÇÃO E AVALIAÇÃO DE
MICROPARTÍCULAS POLIMÉRICAS CONTENDO MANIDIPINA

Dissertação apresentada para a 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

Co-orientador: Prof. Dr. Daniel Fernandes

PONTA GROSSA

2013

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

B239 Barboza, Fernanda Malaquias
Desenvolvimento, caracterização e
avaliação de micropartículas poliméricas
contendo manidipina/ Fernanda Malaquias
Barboza. Ponta Grossa, 2013.
92f.

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.
Co-Orientador: Prof. Dr. Daniel
Fernandes.

1.Liberação controlada. 2.Manidipina.
3.Micropartículas.
4.Poli(3-hidroxi butirato-co-hidroxi valerato). I.Farago, Paulo Vitor. II. Fernandes,
Daniel. III. Universidade Estadual de
Ponta Grossa. Mestrado em Ciências
Farmacêuticas. IV. T.

CDD: 615



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. 05/2013

ATA DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO – NÍVEL DE MESTRADO, DA PÓS-GRADUANDA **FERNANDA MALAQUIAS BARBOZA**, DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO *STRICTO SENSU* EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS, REALIZADA NO DIA 21 DE FEVEREIRO DE 2013, NA UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA.

Ao vigésimo primeiro dia do mês de fevereiro de dois mil e treze, às 14 h, no Auditório de Biologia Evolutiva da Universidade Estadual de Ponta Grossa, sob a presidência do Prof. Dr. Paulo Vitor Farago, em sessão fechada, reuniu-se a banca examinadora para a defesa de dissertação da pós-graduanda Fernanda Malaquias Barboza. 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. Josiane de Fátima P. de Paula / UEPG e Prof. Dr. Roberto Pontarolo / 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 e avaliação de micropartículas poliméricas contendo manidipina”**. Encerrada a defesa de dissertação, procedeu-se o julgamento, tendo sido a candidata aprovada. 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 a presente ata que vai assinada pelos membros da banca examinadora e por mim, Rubyan Lucas Santos Piazzetta, RS, secretário do Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas pela UEPG. Ponta Grossa, 21 de fevereiro de 2013.

Observação (se necessária):

Novo título: desenvolvimento, caracterização e avaliação de micropartículas poliméricas contendo manidipina

Paulo Vitor Farago
Prof. Dr. Paulo Vitor Farago

Josiane de Fátima P. de Paula
Profa. Dra. Josiane de Fátima P. de Paula

Roberto Pontarolo
Prof. Dr. Roberto Pontarolo

Dedico este trabalho aos meus pais, Fernando Augusto Aires Barboza e Elizabete Malaquias Barboza, que são os grandes incetivadores deste sonho e não mediram esforços para que eu pudesse concretizá-lo.

Ao meu amor, Thiago Nadal Mathuchenko, pelo incentivo e companheirismo durante esta caminhada.

A todos os meus amigos e familiares que acreditaram em mim e, hoje, orgulham-se desta conquista.

AGRADECIMENTOS

A Deus, fonte de vida e inspiração, que me deu forças para perseverar em busca da realização desse sonho.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Paulo Vitor Farago, por seu exemplo profissional inspirador. Obrigada por todos os ensinamentos e, em especial, pela paciência e dedicação fundamentais para a concretização desse sonho.

Agradeço à Prof^a. Dr^a. Josiane de Fátima Padilha de Paula, pelas palavras de incentivo diárias e pelas considerações durante a qualificação e defesa desta dissertação.

Agradeço à Prof^a. Dr^a. Juliana Regina Kloss Weber e ao Prof. Dr. Roberto Pontarolo que contribuíram valiosamente ao participarem como banca da qualificação e defesa deste trabalho, respectivamente.

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas pelos conhecimentos transmitidos, não somente durante as disciplinas ministradas, mas em todos os momentos oportunos.

Aos funcionários e aos técnicos dos laboratórios, sempre solícitos e dispostos a ajudar durante o desenvolvimento deste trabalho, em especial, à Elizabete Munhoz, à Luzia Chaves Simão e ao Nilson Biagini Sabino. Agradeço também ao Dr. Milton Domingos Michél, pela realização das análises de microscopia eletrônica de varredura.

À Prof^a. Dr^a. Sônia Faria Zawadzki, pela colaboração na realização das análises de calorimetria exploratória diferencial e ao Prof. Dr. Luís Antonio Pinheiro pela atenção e diligência, quando sua ajuda foi solicitada.

Certamente, estas palavras não são capazes de atender a todas as pessoas que de alguma maneira colaboraram para a realização deste trabalho, mas estejam certas que todas fazem parte do meu pensamento e da minha gratidão.

“Apesar de nossos defeitos, precisamos enxergar que somos pérolas únicas no teatro da vida e entender que não existem pessoas de sucesso e pessoas fracassadas. O que existem são pessoas que lutam pelos seus sonhos ou desistem deles.”

(Augusto Cury)

RESUMO

DESENVOLVIMENTO, CARACTERIZAÇÃO E AVALIAÇÃO DE MICROPARTÍCULAS POLIMÉRICAS CONTENDO MANIDIPINA

A manidipina é um bloqueador de canal de cálcio de terceira geração, eficaz no tratamento da hipertensão arterial. Seu uso está relacionado a efeitos metabólicos adicionais de potencial interesse clínico. Entretanto, sua extrema lipofilicidade resulta em propriedades físico-químicas e farmacocinéticas indesejáveis. Assim, torna-se necessário um aprimoramento farmacotécnico para alcançar um avanço expressivo na absorção e na biodisponibilidade desse fármaco. Com esse propósito, o objetivo deste trabalho foi microencapsular a manidipina a fim de evitar sua compartimentalização espontânea nos adipócitos e prolongar seu tempo de trânsito intestinal, com taxas de liberação e duração adequadas para gerar o efeito anti-hipertensivo desejado. Micropartículas de poli(ϵ -caprolactona) (PCL) e poli(3-hidroxibutirato-co-hidroxivalerato) (PHBV) contendo manidipina foram preparadas com êxito pelo método de emulsão simples/evaporação do solvente orgânico. Diante da ausência de métodos validados para quantificação do fármaco encapsulado nestas micropartículas, um método para o doseamento por cromatografia líquida de alta eficiência com detecção espectrométrica na região do ultravioleta foi previamente desenvolvido e validado. Esse método mostrou-se seletivo, linear ($r = 0,9992$), preciso ($DPR < 2,08\%$) e exato (capacidade de recuperação entre 95,02 e 100,41%) no intervalo de 10 a 50 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$. Além disso, a cromatografia foi robusta quando submetida a pequenas variações na composição da fase móvel e temperatura da coluna. As quatro formulações apresentaram eficiências de encapsulação superiores a 80% e tamanhos médios de partícula inferiores a 8 μm . Os sistemas microparticulados apresentaram uma forma esférica com superfície lisa e porosa para as formulações de PCL e PHBV, respectivamente. De acordo com as análises por espectroscopia na região do infravermelho com transformada de Fourier, os componentes iniciais não foram quimicamente alterados durante o processo de microencapsulação, ao passo que as análises de difratometria de raios-X e de calorimetria exploratória diferencial demonstraram que esse processo levou a amorfização do fármaco. Os perfis de dissolução *in vitro* confirmaram a capacidade que as micropartículas apresentam de prolongar a liberação da manidipina, especialmente àquelas preparadas a partir da PCL, que continham 5% de fármaco encapsulado (*PCL-M5*). Os estudos em animais mostraram que a formulação *PCL-M5* foi capaz de minimizar a variação da pressão arterial média, frente à administração de fenilefrina, por até 24 horas. Este dado confirma o efeito anti-hipertensivo prolongado da micropartícula proposta. Os resultados forneceram um embasamento experimental que viabiliza o uso da formulação *PCL-M5* como um carreador oral da manidipina.

Palavras-chave: Liberação controlada. Manidipina. Micropartículas. Poli(ϵ -caprolactona). Poli(3-hidroxibutirato-co-hidroxivalerato).

ABSTRACT

DEVELOPMENT, CHARACTERIZATION AND EVALUATION OF MANIDIPINE- LOADED POLYMERIC MICROPARTICLES

Manidipine is a third-generation calcium channel blocking effective in the treatment of hypertension, which its use has been related to further metabolic effects of potential clinical interest. However, its high lipophilicity results in undesirable physicochemical and biopharmaceutical properties. Thus, a pharmaceutical improvement is necessary to achieve a remarkable advance in its absorption and bioavailability. In that sense, the aim of this paper was to microencapsulate the manidipine in order to avoid its spontaneous compartmentalization in adipocytes and make its intestinal transit longer, with appropriate release rates and duration to generate the desired antihypertensive effect. Poly(ϵ -caprolactone) (PCL) and poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) (PHBV) microparticles containing manidipine were successfully prepared by simple emulsion/solvent evaporation method. Considering the lack of validated methods for drug quantification in these microparticles, an analytical method by high efficiency liquid chromatography with spectrometric detection in the ultraviolet region was previously developed and validated. This method proved to be selective, linear ($r = 0.9992$), precise (RSD < 2.08 %) and accurate (recovery capacity between 95.02 and 100.41%) in the range from 10 to 50 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. The chromatography was robust when underwent slight variations in the mobile phase composition and column temperature. All four formulations showed loading efficiency rates greater than 80% and average particle sizes less than 8 μm . Microparticulate systems showed a spherical shape with smooth and porous surface for PCL and PHBV formulations, respectively. According to Fourier-transformed infrared analysis, initial components were not chemically modified during microencapsulation process, whereas X-ray diffraction patterns and differential scanning calorimetry analysis demonstrated that this process led to drug amorphization. *In vitro* dissolution profile showed that all microparticles prepared were able to sustain manidipine release, especially which one prepared from PCL, that contained 5% of the drug loaded (*PCL-M5*). Animal studies demonstrated that *PCL-M5* formulation was able to hold the mean arterial pressure variation after phenylephrine administration up to 24 hours. These data demonstrate the sustained antihypertensive effect of the proposed microparticles. Results provided an experimental basis for using *PCL-M5* formulation as an oral manidipine carrier.

Keywords: Controlled release. Manidipine. Microparticles. Poly(ϵ -caprolactone). Poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate).

LISTA DE FIGURAS

REVISÃO DA LITERATURA

FIGURA 1	- Liberação do fármaco de uma forma farmacêutica de liberação convencional (A) e de liberação prolongada (B)	20
FIGURA 2	- Estrutura química da poli(ϵ -caprolactona)	22
FIGURA 3	- Estrutura química do poli(3-hidroxibutirato-co-3-hidroxivalerato)	23
FIGURA 4	- Estrutura química da manidipina	27

CAPÍTULO 1: Validação de método analítico por cromatografia líquida de alta eficiência com detecção espectrométrica na região do ultravioleta para quantificação da manidipina em micropartículas de poli(ϵ -caprolactona) e poli(3-hidroxibutirato-co-hidroxivalerato)

FIGURA 1	- Chemical structure of manidipine	34
FIGURA 2	- HPLC chromatograms ($\lambda = 265 \text{ nm}$) obtained from standard solution of mandipine ($30 \mu\text{g.mL}^{-1}$) (a) and unloaded PCL and PHBV microparticles, <i>PCL-M0</i> (b) and <i>PHBV-M0</i> (c), respectively. Mobile phase: phosphate buffer pH 5.0: acetonitrile (90:10 v/v); flow rate: 0.5 mL.min^{-1}	41

CAPÍTULO 2: Desenvolvimento, caracterização e avaliação de micropartículas de poli(ϵ -caprolactona) e poli(3-hidroxibutirato-co-hidroxivalerato) contendo manidipina

FIGURA 1	- Chemical structure of manidipine	51
FIGURA 2	- SEM photomicrographs of manidipine (a) and pure polymers, PCL (b) and PHBV (c)	60
FIGURA 3	- SEM photomicrographs at 2700 x magnifications of PCL microparticles without drug loaded (<i>PCL-M0</i>) (a), <i>PCL-M5</i> (b) and <i>PCL-M10</i> (c)	61
FIGURA 4	- SEM photomicrographs at 1200 x magnifications of PHBV	

	microparticles without drug loaded (<i>PHBV-M0</i>) (a), <i>PHBV-M5</i> (b) and <i>PHBV-M10</i> (c)	62
FIGURA 5	- X-ray diffractions spectra of manidipine, PCL, its respective physical mixture and microparticulate systems	63
FIGURA 6	- X-ray diffractions spectra of manidipine, PHBV, its respective physical mixture and microparticulate systems	64
FIGURA 7	- FTIR spectra of manidipine, PCL, its respective physical mixture and microparticulate systems	66
FIGURA 8	- FTIR spectra of manidipine, PHBV, its respective physical mixture and microparticulate systems	67
FIGURA 9	- Release profiles of manidipine and PCL and PHBV polymeric microparticles into acetate buffer (50 mM, pH 4.0)	69
FIGURA 10	- Effects of manidipine on mean arterial pressure (MAP) after phenylephrine injection. Formulations <i>PCL-M5</i> and <i>PHBV-M5</i> , pure manidipine and water (control group) were administered orally to the animals. Statistical analysis was performed using ANOVA test followed by Dunnet's <i>post hoc</i> test	71

DISCUSSÃO GERAL

FIGURA 1	- Hipótese estabelecida no presente trabalho, que justifica o uso de micropartículas poliméricas em substituição aos comprimidos convencionais	77
----------	--	----

LISTA DE TABELAS

REVISÃO DA LITERATURA

TABELA 1	- Principais polímeros utilizados em sistemas de liberação de fármacos	22
----------	--	----

CAPÍTULO 1: Validação de método analítico por cromatografia líquida de alta eficiência com detecção espectrométrica na região do ultravioleta para quantificação da manidipina em micropartículas de poli(ϵ -caprolactona) e poli(3-hidroxibutirato-co-hidroxivalerato)

TABELA 1	- Composition of manidipine-loaded and unloaded PCL and PHBV microparticles	37
TABELA 2	- Linearity parameters of the proposed HPLC method	42
TABELA 3	- Results of precision assays of the proposed HPLC method	42
TABELA 4	- Results of accuracy assays of the proposed HPLC method	43
TABELA 5	- Results of robustness assays of the proposed HPLC method	44
TABELA 6	- Loading efficiency values obtained to PCL and PHBV microparticles	44

CAPÍTULO 2: Desenvolvimento, caracterização e avaliação de micropartículas de poli(ϵ -caprolactona) e poli(3-hidroxibutirato-co-hidroxivalerato) contendo manidipina

TABELA 1	- Composition of manidipine-loaded and unloaded PCL and PHBV microparticles	53
TABELA 2	- Mathematical models applied to dissolution experiments	57
TABELA 3	- Loading efficiency values obtained to PCL and PHBV microparticles	59
TABELA 4	- Average particle size and granulometric size distribution of microparticulate systems	65

TABELA 5	-	Release data from manidipine and polymeric microparticles	70
----------	---	---	----

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	15
OBJETIVOS	18
Objetivo geral	18
Objetivos específicos	18
REVISÃO DA LITERATURA	20
Micropartículas poliméricas como sistemas de liberação modificada de fármacos	20
Manidipina como alternativa no tratamento da hipertensão arterial sistêmica	23
Características físico-químicas e farmacocinéticas da manidipina	26
 CAPÍTULO 1: Validação de método analítico por cromatografia líquida de alta eficiência com detecção espectrométrica na região do ultravioleta para quantificação da manidipina em micropartículas de poli(ϵ-caprolactona) e poli(3-hidroxibutirato-co-hidroxivalerato)	
1.1 Apresentação	30
1.2 PUBLICAÇÃO 1: A simple and fast RP-HPLC/ UV method for determination of manidipine from polymeric microparticles for sustained release	32
 CAPÍTULO 2: Desenvolvimento, caracterização e avaliação de micropartículas de poli(ϵ-caprolactona) e poli(3-hidroxibutirato-co-hidroxivalerato) contendo manidipina	
2.1 Apresentação	48
2.2 PUBLICAÇÃO 2: Manidipine-loaded microparticles using poly(ϵ -caprolactone) and poly(3-hydroxybutyrate-co-hydroxyvalerate) as oral	

controlled release carriers	50
DISCUSSÃO GERAL	76
CONCLUSÕES	82
REFERÊNCIAS	84
ANEXO A	91

INTRODUÇÃO

A hipertensão arterial sistêmica é uma das doenças de maior prevalência no mundo moderno, sendo que, no Brasil, as doenças cardiovasculares decorrentes de complicações dessa condição patológica têm sido a principal causa de morte. Dessa forma, o uso de anti-hipertensivos que, além de reduzir a pressão arterial, mostrem-se eficazes na redução da morbi-mortalidade desses pacientes, é o objetivo primordial do tratamento medicamentoso.

Nesse contexto, a manidipina, bloqueador de canal de cálcio de terceira geração, tem se revelado uma alternativa promissora para pacientes hipertensos. Além da eficácia anti-hipertensiva demonstrada para um grupo heterogêneo de pacientes, esse fármaco está associado a efeitos metabólicos de potencial interesse clínico. Estudos recentes têm demonstrado a superioridade da manidipina frente aos outros medicamentos pertencentes ao seu grupo farmacológico. Dentre os efeitos benéficos adicionais, cita-se o seu baixo potencial edematogênico, efeitos neuroprotetores, redução da excreção urinária de albumina em pacientes diabéticos, aumento da sensibilidade à insulina e redução de efeitos anti-inflamatórios e pró-trombóticos.

Entretanto, as características físico-químicas e farmacocinéticas fazem com que a manidipina apresente uma baixa biodisponibilidade sistêmica, exigindo um aprimoramento farmacotécnico adicional, para alcançar uma melhora expressiva em sua performance *in vivo*.

Apesar de apresentar um tempo de meia-vida curto, a lipossolubilidade garante à manidipina um tempo de ação de até 24 horas, uma vez que esse composto é rapidamente retirado da circulação e liberado continuamente do tecido adiposo, em um processo espontâneo de compartimentalização. Essa compartimentalização torna-se um fator complicador na terapêutica, visto que a liberação do fármaco passa a ser dependente da massa de tecido adiposo do paciente, que é uma característica muito variável na população. Dessa forma, temos uma liberação prolongada, porém heterogênea e individualizada.

Fármacos com essas características estimulam o desenvolvimento de formas farmacêuticas capazes de controlar a liberação do mesmo ao longo do trato gastrointestinal, otimizando seu perfil biofarmacêutico e diminuindo os efeitos

adversos ao uso da terapia farmacológica. E, nesse propósito, as micropartículas poliméricas têm se revelado altamente efetivas no controle da liberação de fármacos, além de atuarem como uma proteção à sua degradação pelo metabolismo fisiológico e por condições ambientais adversas.

A microencapsulação é capaz de impedir a compartimentalização rápida da manidipina aos adipócitos, aumentando o seu tempo de trânsito intestinal, com taxas de liberação e duração adequadas para produzir o efeito desejado. Estes sistemas têm permitido aumentar a eficiência de fármacos utilizados na terapêutica atual.

A pesquisa bibliográfica, realizada em periódicos científicos da área, demonstrou um número restrito de trabalhos envolvendo sistemas de liberação modificada contendo manidipina. Dessa forma, o presente trabalho visou o desenvolvimento e avaliação de micropartículas poliméricas contendo esse fármaco.

OBJETIVOS

Objetivo geral

Microencapsular a manidipina para evitar sua compartimentalização espontânea nos adipócitos e prolongar seu tempo de trânsito intestinal, com taxas de liberação e duração adequadas para gerar o efeito anti-hipertensivo desejado.

Objetivos específicos

1. Obter micropartículas contendo manidipina, a partir dos polímeros poli(ϵ -caprolactona) e poli(3-hidroxibutirato-co-hidroxivalerato);
2. Validar um método analítico por cromatografia líquida de alta eficiência e detecção por espectrometria na região do ultravioleta para a quantificação da manidipina em micropartículas poliméricas de poli(ϵ -caprolactona) e poli(3-hidroxibutirato-co-hidroxivalerato);
3. Quantificar a manidipina microencapsulada nas formulações para posterior determinação da eficiência de encapsulação;
4. Caracterizar os sistemas poliméricos obtidos quanto às características morfológicas, de superfície, de tamanho e de dispersão granulométrica;
5. Caracterizar os sistemas poliméricos obtidos por meio de espectroscopia na região do infravermelho;
6. Caracterizar termicamente os materiais poliméricos elaborados, por meio dos métodos de termogravimetria e de calorimetria exploratória diferencial;
7. Avaliar o perfil de liberação *in vitro* da manidipina e das micropartículas contendo manidipina, por meio de ensaios de dissolução;
8. Avaliar a atividade anti-hipertensiva *in vivo*, em ratos, das micropartículas poliméricas com melhor desempenho *in vitro*.

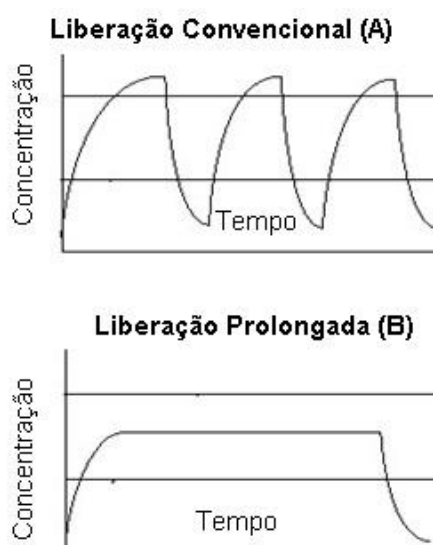
REVISÃO DA LITERATURA

Micropartículas poliméricas como sistemas de liberação modificada de fármacos

O controle da liberação de fármacos, por meio da utilização de formas farmacêuticas capazes de otimizar a velocidade de liberação e o regime posológico, vem sendo muito relatado na literatura farmacêutica, devido aos benefícios terapêuticos e farmacológicos em relação às formas farmacêuticas convencionais (MAINARDES, 2007; PASTRANA et al., 2000; LIESIENE e MATALIONIENE, 2004; SCHAFFAZICK et al., 2003).

As formas farmacêuticas de liberação prolongada objetivam o aumento do tempo de ação farmacológica de substâncias ativas e a ausência ou a minimização do aparecimento de flutuações nas concentrações plasmáticas do fármaco (Figura 1) para obter melhor eficácia terapêutica, diminuir os efeitos colaterais e aumentar a adesão do paciente ao tratamento (GENNARO, 2004; AULTON, 2005; ALLEN; POPOVICH; ANSEL, 2007).

FIGURA 1 - Liberação do fármaco de uma forma farmacêutica de liberação convencional (A) e de liberação prolongada (B)



Nesse contexto, destacam-se as micropartículas poliméricas, cuja versatilidade permite a administração oral, parenteral, nasal ou pulmonar de fármacos. Esse sistema é capaz de controlar a liberação de um composto bioativo e,

além disso, protegê-lo da degradação do metabolismo fisiológico e de condições ambientais adversas, além de apresentarem melhores qualidades de armazenamento (AHMAD et al., 2011; BIRNBAUM e BRANNON-PEPPAS, 2003; BOWEY e NEUFELD, 2010; YOSHIZAWA, 2004; RAFFIN et al., 2007; GOSH, 2006).

O desenvolvimento de carreadores poliméricos microparticulados tem sido extensivamente descrito na literatura farmacêutica. Publicações destacam aplicações das micropartículas em formulações que aumentam a biodisponibilidade e a eficácia terapêutica de uma ampla variedade de fármacos, desde anti-hipertensivos (RIEKES et al., 2011), antimicrobianos (KAHAN; KATARA; RAMTEKE, 2010), broncodilatadores (OH et al., 2011), analgésicos (AAMIR et al., 2011), inibidores da reabsorção óssea (CRUZ et al., 2011), quimioterápicos (CHAKRAVARTHI e ROBINSON, 2011), além de inúmeras outras aplicações que comprovam a relevância desses sistemas na terapêutica atual.

Um sistema polimérico de liberação de fármaco por via oral pode ser planejado e obtido por diferentes estratégias. Modificando-se as propriedades do polímero, o sistema pode conduzir a tipos diferenciados de liberação do fármaco (ZHU, 2002).

A Tabela 1 apresenta uma lista representativa de polímeros que têm sido empregados na liberação modificada de fármaco.

No delineamento de um sistema microparticulado podem ser utilizados materiais poliméricos com pequena ou nenhuma toxicidade, nos quais a substância ativa está dispersa ou dissolvida (OLIVEIRA e LIMA, 2006). Nesse contexto, entre outros polímeros aplicáveis, a poli(ϵ -caprolactona) (PCL) e o (3-hidroxibutirato-co-3-hidroxivalerato) (PHBV) têm sido materiais considerados muito úteis à formação de micropartículas contendo fármacos, peptídeos, proteínas e antígenos (CHAKRAPANI, 2006).

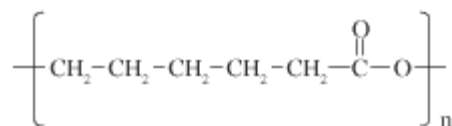
TABELA 1 - Principais polímeros utilizados em sistemas de liberação de fármacos

	Classificação	Polímero
Naturais	Polímeros a base de proteínas	Colágeno, albumina, gelatina.
	Polissacarídeos	Agarose, alginato, carragenina, ácido hialurônico, dextrano, quitosana, ciclodextrina.
Sintéticos	<u>Biodegradáveis:</u>	
	Poliéster	Poli(ácido láctico), poli(ácido glicólico), poli(hidroxibutirato), poli(ε-caprolactona), poli(ácido β-málico), poli(dioxanonas).
	Polianidrido	Poli(ácido sebácico), poli(ácido adípico), poli(ácido terftálico) e vários copolímeros.
	Poliamidas	Poli(imino carbonatos), poliaminoácidos.
	Polímeros fosforosos	Polifosfatos, polifosfonatos, polifosfazenos.
	Outros	Poli(cianoacrilatos), poliuretanos, poliacetais, polidihidropiranos.
	<u>Não biodegradáveis:</u>	
	Derivados de celulose	Carboximetil celulose, etilcelulose, celulose acetato, celulose acetato propionato, hidroxipropilmetilcelulose.
	Silicones	Polidimetilsiloxano, sílica coloidal.
	Polímeros Acrílicos	Polimetacrilatos, poli(metilmetacrilato), polihidro(etilmetacrilato).
	Outros	Polivinilpirrolidona, polietilvinilacetato, poloxâmeros, poloxaminas.

Fonte: PILLAI e PANCHAGNULA (2001)

A poli(ε-caprolactona) (PCL) (Figura 2) é um polímero sintético semi-cristalino, pertencente à classe dos poliésteres alifáticos, com características plastificantes. Esse polímero é frequentemente utilizado em sistemas de liberação de fármacos porque, além de ser biodegradável, seus produtos de decomposição não são tóxicos e são facilmente excretados do organismo humano (MEIER; KANIS; SOLDI, 2004; RUSU; URSU; RUSU, 2006; DUARTE, 2006). Sua biocompatibilidade permite diversas aplicações no campo biomédico e na indústria farmacêutica (ROA et al., 2010).

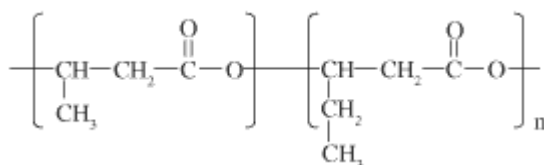
FIGURA 2 - Estrutura química da poli(ε-caprolactona)



A PCL é capaz de sofrer degradação por meio de hidrólise das ligações éster da cadeia polimérica e apresenta degradação lenta, quando comparada a outros polímeros biodegradáveis comumente empregados em sistemas de liberação modificada de fármacos como o poli(ácido lático) (AMASS, AMASS, TIGHE, 1998). Essa degradação lenta deve-se a sua elevada hidrofobicidade, o que dificulta a penetração de água entre as cadeias poliméricas e, conseqüentemente, a ocorrência dessa reação (NAIR; LAURENCIN, 2007).

O poli(3-hidroxibutirato-co-3-hidroxivalerato) (PHBV) (Figura 3) é um copolímero semi-cristalino, poliéster derivado de hidroxiácidos, produzido biossinteticamente por bactérias a partir de matérias-primas naturais (ROA et al., 2010). Sua degradação ocorre por meio da erosão da superfície, fato que o torna atrativo a aplicações na liberação controlada de fármacos (POUTON; AKHTAR, 1996).

FIGURA 3 - Estrutura química do poli(3-hidroxibutirato-co-3-hidroxivalerato)



Manidipina como alternativa no tratamento da hipertensão arterial sistêmica

A hipertensão arterial sistêmica (HAS) é uma condição clínica multifatorial caracterizada por níveis elevados e sustentados de pressão arterial. Associa-se frequentemente a alterações funcionais e/ou estruturais dos órgãos-alvo (coração, encéfalo, rins e vasos sanguíneos) e a alterações metabólicas, com conseqüente aumento do risco de eventos cardiovasculares fatais e não fatais (SOCIEDADE BRASILEIRA DE CARDIOLOGIA, 2010).

A HAS tem alta prevalência e baixas taxas de controle, além de ser considerada um dos principais fatores de risco modificáveis e um dos mais importantes problemas de saúde pública. A prevalência da HAS no mundo é estimada em 20% da população (BARROS et al., 2009). A mortalidade por doença cardiovascular (DCV) aumenta progressivamente com a elevação da pressão arterial

a partir de 115/75 mmHg de forma linear, contínua e independente (MALTA et al., 2009; SOCIEDADE BRASILEIRA DE CARDIOLOGIA, 2010).

O objetivo primordial do tratamento da hipertensão arterial é a redução da morbidade e da mortalidade cardiovasculares. Assim, os anti-hipertensivos devem não só reduzir a pressão arterial, mas também os eventos cardiovasculares fatais e não fatais e, se possível, a taxa de mortalidade. As evidências provenientes de estudos de desfechos clinicamente relevantes demonstram redução de morbidade e mortalidade em estudos com diuréticos, betabloqueadores, inibidores da enzima conversora da angiotensina (IECA), bloqueadores do receptor AT1 da angiotensina e com antagonistas dos canais de cálcio (SOCIEDADE BRASILEIRA DE CARDIOLOGIA, 2010; LAW; MORRIS; WALD, 2009).

Segundo a Sociedade Brasileira de Cardiologia (2010), dentre as principais características do medicamento anti-hipertensivo de escolha destacam-se a eficácia por via oral, a administração em menor número possível de tomadas, com preferência para dose única diária, segurança, tolerância e relação risco/benefício favorável ao paciente, além da importância da demonstração em ensaios clínicos da capacidade de reduzir a morbidade e a mortalidade cardiovasculares associadas à hipertensão arterial.

Neste propósito, os bloqueadores dos canais de cálcio exercem sua ação anti-hipertensiva por meio da redução da resistência vascular periférica por diminuição da concentração de cálcio nas células musculares lisas vasculares. São anti-hipertensivos eficazes e reduzem a morbidade e a mortalidade cardiovasculares. Estudos recentes reafirmaram a eficácia, a tolerabilidade e a segurança do uso dessa classe de medicamentos no tratamento da hipertensão arterial (NEAL; MACMAHON; CHAPMAN, 2000; STASSEN; FAGARD; THIJS, 1997; BROWN et al., 2000; HANSSON et al., 2000; DAHLOF et al., 2005).

A manidipina, bloqueador de canal de cálcio de terceira geração, exerce seu efeito anti-hipertensivo por meio da vasodilatação sistêmica causada pela inibição do influxo de cálcio, voltagem-dependente, nas células musculares lisas (MIELCAREK e SZAMBURSKA, 2005). Esse fármaco não provoca taquicardia reflexa ou mudanças na atividade da renina plasmática, provavelmente devido à vasodilatação gradual produzida (FOGARI et al., 1999).

A manidipina tem se mostrado eficaz no tratamento de pacientes hipertensos, em diferentes graus de severidade, em pacientes idosos ou de meia idade, incluindo pacientes com doenças associadas, como diabetes e nefropatias. Estudos enfatizam sua alta tolerabilidade, acarretando uma baixa frequência de eventos adversos, além de estar associada a efeitos metabólicos de potencial interesse clínico (FOGARI et al., 1999, 2011; KOHMANN e RIBEIRO, 2001; MARTELL-CLAROS e CRUZ, 2011).

É relevante citar que investigações têm demonstrado que a manidipina tem um baixo potencial edematogênico, especialmente, quando comparados aos outros bloqueadores de canais de cálcio (FOGARI et al., 2000b, 2005). Uma explicação plausível para a baixa incidência e intensidade do edema de membros inferiores observada com o uso desse fármaco é decorrente do fato de que ele dilata não somente o lado arterial, mas também o venoso do capilar periférico, diminuindo assim a pressão hidráulica do capilar (VALENTIN et al., 1990; Van HAMERSVELT et al., 1996; FOGARI et al., 2000a). Da mesma forma, a ausência de estimulação simpática secundária facilita a venodilatação capilar, uma vez que as catecolaminas são potentes venoconstritores.

Além disso, tem sido demonstrado, tanto no âmbito experimental quanto em alguns trabalhos clínicos, que a manidipina tem uma ação benéfica sobre a hemodinâmica renal, diminuindo a pressão do capilar glomerular, como consequência da vasodilatação, tanto da arteríola aferente quanto da eferente, conferindo a este composto um aspecto de nefroproteção (MAKI et al., 1992; MIZUNO et al., 1992; TAKABATAKE et al., 1993; KOHMANN e RIBEIRO, 2001; FOGARI et al., 2011). Esse efeito sobre a hemodinâmica renal pode potencializar sua eficácia anti-hipertensiva em pacientes com hipertensão arterial sensível ao sal, além de apresentar relevância clínica expressiva, uma vez que o rim é um dos órgãos-alvo na hipertensão e no diabetes (KOHMANN e RIBEIRO, 2001; RIOS et al., 2011).

Efeitos benéficos adicionais têm sido relatados para o tratamento com manidipina em pacientes com hipertensão e diabetes tipo 2. A excreção urinária de albumina foi reduzida significativamente (66%) em pacientes com hipertensão não controlada e *diabetes* após 6 meses de tratamento com manidipina 20 mg por dia (MARTINEZ-MARTIN e SAIZ-SATJES, 2008; FOGARI et al., 2011). No estudo de OTERO e CLAROS (2005), houve redução estatisticamente significativa dos valores

de glicemia, hemoglobina A_{1c}, LDL-colesterol, colesterol total e triglicerídios, em pacientes com hipertensão e diabetes tipo 2 tratados com monoterapia de manidipina (FOGARI et al., 2011).

Uma série de estudos com pacientes hipertensos tem mostrado que a manidipina aumenta a sensibilidade à insulina, especialmente quando comparada a outros bloqueadores dos canais de cálcio (IIMURA et al., 1995; UESHIBA e MIYACHI, 2004; MARTINEZ-MARTIN, 2009; FOGARI et al., 2011).

Esse fármaco também apresenta efeitos benéficos sobre os marcadores inflamatórios e pró-trombóticos. Ele aumenta significativamente o ativador do plasminogênio tecidual e diminui os níveis de fator de necrose tumoral (TNF- α). Os níveis plasmáticos de adiponectina foram significativamente aumentados pela manidipina. A causa destes efeitos benéficos ainda não foi totalmente elucidada, mas é provável que seja devido à ativação do PPAR- γ (um receptor nuclear que é altamente expresso no tecido adiposo). Estudos têm demonstrado que a manidipina ativa o PPAR- γ nos adipócitos. Essa ativação melhora a sensibilidade à insulina por meio do estímulo a produção de adiponectina e reduzindo os níveis de mediadores inflamatórios (FOGARI et al., 2011; MARTINEZ-MARTIN et al., 2011; RIOS et al., 2011). Em outros estudos, a manidipina mostrou-se tão eficaz, *in vitro*, quanto a pioglitazona na prevenção da expressão do receptor hepático específico para produtos de glicação avançada que geram espécies reativas de oxigênio (RIOS et al., 2011).

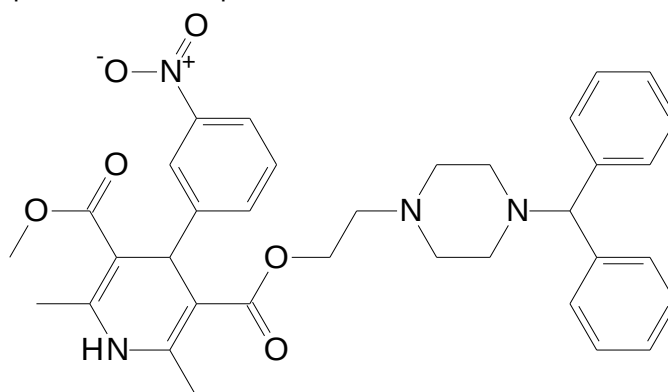
Toba e colaboradores (2005) apontaram os efeitos antioxidante e anti-inflamatórios mediados pela manidipina por meio do aumento da expressão de óxido nítrico sintase endotelial (eNOS) e da inibição expressão da enzima conversora da angiotensina (ACE) (BERKELS et al., 2005). Esses dados podem revelar um efeito benéfico adicional desse fármaco contra a disfunção endotelial (RIOS et al., 2011).

Características físico-químicas e farmacocinéticas da manidipina

A manidipina (2-[(difenilmetil)-1-piperazinil]etilmetil-1,4-dihidro-2,6-dimetil-4(*m*-nitrofenil)-3,5-piridinadicarboxilada metil-éster) (Figura 4) é um bloqueador de cálcio de hidrossolubilidade extremamente baixa ($> 1 \mu\text{g/mL}$) (CSABAI et al., 1998; KOHMANN e RIBEIRO, 2001). Em voluntários humanos saudáveis, a absorção de

uma dose oral de manidipina foi rápida e o pico de concentração plasmática foi alcançado após 1-2 h, declinando bifasicamente, com uma aparente meia-vida de eliminação de 4-8 h. A manidipina é extensivamente metabolizada no fígado, por meio de esterificação e clivagem dos grupos difenilmetilpiperazinila ou difenilmetila (YAMAGUCHI et al., 1992; MIELCAREK e SZAMBURSKA, 2005). Sua elevada depuração e metabolismo de primeira passagem resulta, portanto, em uma baixa biodisponibilidade sistêmica (CSABAI et al., 1998).

FIGURA 4 - Estrutura química da manidipina



Apesar de apresentar um tempo de meia-vida curto, a lipossolubilidade garante à manidipina um tempo de ação de até 24 horas, uma vez que esse composto é rapidamente retirado da circulação e liberado continuamente do tecido adiposo, em um processo espontâneo de compartimentalização (KOHMANN e RIBEIRO, 2001). Essa compartimentalização torna-se um fator complicador da terapêutica, visto que a liberação do fármaco torna-se dependente da massa de tecido adiposo do paciente, que é uma característica muito variável na população. Dessa forma, temos uma liberação prolongada, porém heterogênea e individualizada.

Seu perfil permite uma melhor tolerabilidade em comparação àqueles não lipofílicos, entretanto, resulta em um número de propriedades físico-químicas e biofarmacêuticas indesejáveis. Assim, um aprimoramento adicional é necessário para alcançar uma melhoria expressiva em sua absorção, com consequente aumento da biodisponibilidade (CSABAI et al., 1998; KOHMANN e RIBEIRO, 2001).

Fármacos com essas características estimulam o desenvolvimento de formas farmacêuticas capazes de controlar a liberação do mesmo ao longo do trato

gastrointestinal, otimizando seu perfil biofarmacêutico e diminuindo os efeitos adversos ao uso da terapia farmacológica (PASTRANA et al., 2000; LIESIENE e MATALIONIENE, 2004).

A microencapsulação é capaz de impedir a compartimentalização rápida da manidipina aos adipócitos, aumentando o seu tempo de trânsito intestinal, com taxas de liberação e duração adequadas para produzir o efeito desejado. Estes sistemas têm permitido aumentar a eficiência de fármacos utilizados na terapêutica atual.

A literatura relata um número restrito de sistemas de liberação modificada contendo manidipina. Entre as publicações disponíveis é possível citar apenas a complexação desse fármaco com ciclodextrinas e seus derivados (CSABAI et al., 1998; MIELCAREK e SZAMBURSKA, 2005). Essas limitações, associados à possibilidade de otimização das características de biodisponibilidade do fármaco, fomentam o uso de micropartículas poliméricas de PCL e PHBV contendo manidipina, voltadas ao tratamento da HAS.

CAPÍTULO 1: Validação de método analítico por cromatografia líquida de alta eficiência com detecção espectrométrica na região do ultravioleta para quantificação da manidipina em micropartículas de poli(ϵ -caprolactona) e poli(3-hidroxibutirato-co-hidroxivalerato)

CAPÍTULO 1: Validação de método analítico por cromatografia líquida de alta eficiência com detecção espectrométrica na região do ultravioleta para quantificação da manidipina em micropartículas de poli(ϵ -caprolactona) e poli(3-hidroxibutirato-co-hidroxivalerato)

1.1 Apresentação

O desenvolvimento de uma forma farmacêutica requer a utilização de um método analítico validado, que possibilite o doseamento do fármaco encapsulado na formulação (AULTON, 2005). Entretanto, em algumas situações, os métodos relatados na literatura não são aplicáveis às formulações em desenvolvimento.

Diante deste contexto, a ausência de métodos descritos na literatura cabíveis à quantificação da manidipina nas micropartículas poliméricas de poli(ϵ -caprolactona) (PCL) e poli(3-hidroxibutirato-co-hidroxivalerato) (PHBV) justificou o desenvolvimento desta etapa do trabalho.

O objetivo deste capítulo foi desenvolver e validar um método analítico simples e rápido para quantificação da manidipina encapsulada em micropartículas poliméricas de PCL e PHBV, por cromatografia líquida de alta eficiência em coluna cromatográfica de fase reversa, com detecção espectrométrica na região do ultravioleta.

O método descrito a seguir foi desenvolvido a partir das condições cromatográficas relatadas por Mielcarek e Szamburska (2004), que foram posteriormente adaptadas e otimizadas quanto ao pH e fluxo da fase móvel e comprimento de onda de detecção espectrométrica. Dessa forma, tornou-se possível quantificar o fármaco em um curto intervalo de tempo, garantindo seletividade, precisão e exatidão ao método.

PUBLICAÇÃO 1: A simple and fast RP-HPLC/UV method for determination of manidipine from polymeric microparticles for sustained release

Nota técnica submetida para publicação no periódico *Química Nova*

A simple and fast RP-HPLC/UV method for determination of manidipine from polymeric microparticles for sustained release

Fernanda M. Barboza, Barbara Justus, Josiane P. de Paula, and Paulo V.

Farago*

Laboratory of Pharmaceutical Products, Postgraduate Program in Pharmaceutical Science, Department of Pharmaceutical Sciences, State University of Ponta Grossa, Campus Uvaranas, 84030-900, Ponta Grossa, Paraná, Brazil.

*Author for correspondence:

E-mail: pvfarago@gmail.com

A simple and fast RP-HPLC/ UV method for determination of manidipine from polymeric microparticles for sustained release

Abstract: A simple and fast analytical method of high performance liquid chromatography (HPLC) was developed to assay manidipine in poly(ϵ -caprolactone) and poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) microparticles for oral administration. Experiments were performed on a C₁₈ chromatographic column at 37°C using a mobile phase composed by phosphate buffer pH 5.0 and acetonitrile (9:1 v/v) with a flow rate of 0.5 mL. min⁻¹ and UV detection at 265 nm. This method proved to be selective, linear ($r = 0.9992$), precise (RSD < 2.08%) and accurate (recovery capacity between 95.02 and 100.41%) in the range from 10 to 50 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. The chromatography was robust when slight changes in the mobile phase composition and column temperature were performed. It was successfully applied to manidipine quantification from microparticulate polymeric systems. All four formulations tested showed high loading efficiency rates, greater than 80%.

Keywords: *manidipine, polymeric microparticles, HPLC.*

INTRODUCTION

Manidipine, 2-[4-(diphenylmethyl)-1-piperazinyl]ethylmethyl(±)-1, 4-dihydro-2, 6-dimethyl-4-(m-nitrophenyl)-3, 5-pyridinedicarboxylate (Figure 1), is a third-generation calcium channel blocker which is effective in the treatment of hypertension.^{1, 2, 3}

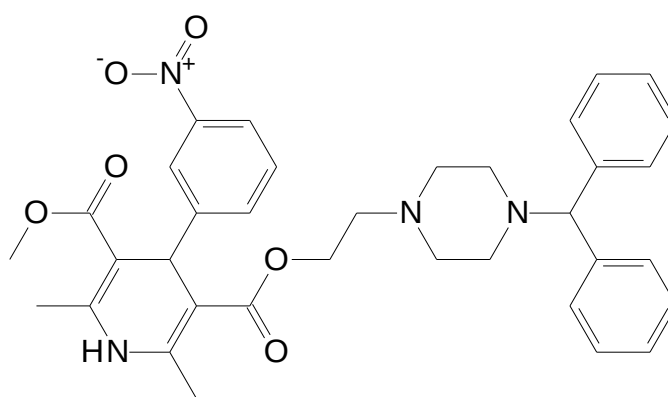


Figure 1. Chemical structure of manidipine

A number of studies have reported that manidipine has a low oedematogenic potential when compared to other dihydropyridines.⁴ In addition to reducing arterial blood pressure, this drug has been related to metabolic effects of potential clinical interest.⁵

Despite manidipine presents a short elimination half-life of 4-8 h, its high lipophilicity makes it being rapidly removed from circulation to adipose tissue. Manidipine is then continuously released from fat cells which promotes a time of action up to 24 hours. However its release depends directly on the mass of adipose tissues of the patient which results in a sustained but heterogeneous and

individualized release profile. Thus a further improvement is necessary to achieve a remarkable advance in manidipine absorption and bioavailability.^{2, 6, 7}

These characteristics stimulate the development of new formulations able to control manidipine release along gastrointestinal tract, avoiding its compartmentalization in fat cells and consequently enhancing drug therapy.⁸ In that sense, polymeric microparticles have shown high efficiencies over controlling drug delivery, besides protecting drug degradation by physiological metabolism and adverse environmental conditions.^{9, 10, 11, 12, 13, 14}

Few studies are devoted to investigate modified delivery systems for manidipine.^{6, 7} Thus poly(ϵ -caprolactone) (PCL) and poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) (PHBV) microparticles containing manidipine can be feasible approaches to formulate oral delivery carriers for this drug.

Quality control has been an essential tool for pharmaceutical industry since it ensures efficient and safe products. Nevertheless its results are only reliable when the performed analytical methods are validated.¹⁵

Some chromatographic and spectrophotometric methods to quantify manidipine have been previously reported in the literature.^{7, 16} However, none of them are appropriate to drug-loaded polymeric microparticles. Thereby it is required to develop a specific, linear, precise, accurate and robust method to determine manidipine in these formulations.

Hence the aim of this work was validate a RP-HPLC/UV method to determine manidipine loading efficiency in PCL and PHBV microparticles.

EXPERIMENTAL

Materials

Manidipine hydrochloride 99.95% (Japanese Pharmacopoeia standard product, CAS number 89226-75-5, code number JP192), poly(ϵ -caprolactone) (PCL) ($M_w = 70,000\text{--}90,000\text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), poly(3-hydroxybutirate-co-3-hydroxyvalerate) (PHBV) ($M_w = 380,000\text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$, 8.70 mol% hydroxyvalerate, Biocycle L110, PHB Industrial, Serrana, Brazil) and poly(vinyl alcohol) (PVA) ($M_w = 72,000\text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$, 88.5 mol% of hydrolysis, Vetec, Rio de Janeiro, Brazil) were used as received. HPLC-grade acetonitrile was purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, USA). All others reagents and solvents were of analytical grade.

Preparation of PCL and PHBV microparticles

Polymeric microparticles containing manidipine were prepared by simple emulsion/solvent evaporation method. Dichloromethane and chloroform were used as solvent for PCL and PHBV, respectively. The emulsion was stabilized with polysorbate 80 (Tween 80[®]).

Two different formulations (Table 1) were obtained for each polymer (PCL and PHBV) depending on the theoretical amount of manidipine used in their composition (5 and 10%). Unloaded microparticles were also prepared as negative controls (*PCL-M0* e *PHBV-M0*). All formulations were obtained in triplicate.

The organic phase was quickly added into the aqueous phase under mechanical stirring (3500 rpm) for 5 min. The emulsion was kept under mechanical

stirring (1000 rpm) at room temperature for 4 h. After solvent evaporation, microparticles were separated by centrifugation (3500 rpm), washed twice with purified water and dried at $35 \pm 5^\circ\text{C}$ for 48 h. All procedures were done protected from light.

Table 1. Composition of manidipine-loaded and unloaded PCL and PHBV microparticles

Formulation		<i>PCL-M0</i>	<i>PCL-M5</i>	<i>PCL-M10</i>	<i>PHBV-M0</i>	<i>PHBV-M5</i>	<i>PHBV-M10</i>
Organic	Manidipine hydrochloride (g)	-	0.1	0.2	-	0.1	0.2
	PCL (g)	2.0	1.9	1.8	-	-	-
	PHBV (g)	-	-	-	2.0	1.9	1.8
	Dichloromethane (mL)	40	40	40	-	-	-
	Chloroform (mL)	-	-	-	40	40	40
Aqueous	PVA* 2% solution (mL)	200	200	200	200	200	200
	Tween 80 [®] (g)	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25
	NaOH 0.1 M (mL)	2	2	2	-	-	-

* PVA = poly(vinyl alcohol)

Chromatographic Conditions

Chromatographic conditions were defined from the optimization of the method described by Mielcarek and Szamburska⁷. Different composition, pH and flow rate of the mobile phase were tested, as well as column temperature and detection wavelength.

Experiments were performed in a HPLC system equipped with an UV-Vis detector at 265 nm. Separation was achieved through a LiChroCart[®] (Merck)

analytical column (4 x 250 mm) filled with LiChrospher[®] 100 C₁₈ (5 µm) at 37°C. The isocratic mobile phase was composed by phosphate buffer pH 5.0 and acetonitrile (90:10 v/v) with a flow rate of 0.5 mL.min⁻¹. The mobile phase components were previously filtered and sonicated.

Preparation of standard solutions

A stock standard solution of 0.5 mg.mL⁻¹ of manidipine was daily prepared by dissolving 50 mg of the drug in a 100 mL volumetric flask with methanol. This solution was further diluted in methanol to prepare five different standard solutions ranging from 10.0 to 50.0 µg.mL⁻¹. Final solutions were filtered through a poly(vinylidene fluoride) membrane filter (Durapore membrane, 0.45 µm pore size) before injection into the HPLC system.

Preparation of sample solutions

An amount of microparticles, equivalent to 50 mg of manidipine, was weighted and magnetic stirred with methanol for 12 h in a 100 mL volumetric flask, in order to completely extract the drug loaded in microparticles. Finally, samples were suitable diluted, filtered through a 0.45 µm poly(vinylidene fluoride) membrane filter and injected into the HPLC system. The concentration of manidipine was determined chromatographically as proposed. All procedure was performed in triplicate.

Method Validation

The HPLC method was validated according to the guidelines set on ICH (The International Conference on Harmonization of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use) and ANVISA resolution.^{17, 18, 19} Parameters evaluated were specificity, linearity, range, limit of detection (LOD), limit of quantification (LOQ), precision, accuracy and robustness.

Selectivity was investigated by comparison between chromatograms of polymeric microparticles without manidipine (*PCL-M0* and *PHBV-M0*) and those ones containing the drug. In order to verify the linearity and range, three analytical curves were prepared and assessed in the chromatographic system, including five concentrations levels of manidipine (10.0, 20.0, 30.0, 40.0 and 50.0 $\mu\text{g.mL}^{-1}$). The results were evaluated by linear regression study. LOD and LOQ were obtained based on the standard deviation of the response (s) and the slope (a) of the analytical curve ($\text{LOD} = 3.3 \text{ s/a}$ and $\text{LOQ} = 10 \text{ s/a}$).

Repeatability (intra-day precision) and intermediate precision (inter-day) were carried out by assaying six different samples at the same concentration (30.0 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, n=12), under the same experimental conditions, during the same day and along three different days, respectively.

Accuracy was determined by the recovery test. Three different standard solutions were prepared (10.0, 20.0 and 30.0 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) and added to a sample solution prepared from *PCL-M5* and *PHBV-M5* (10 $\mu\text{g.mL}^{-1}$). Final solutions were analyzed in the chromatographic system. Robustness of the method was assessed from variations of the recommended conditions (flow rate, mobile phase composition and temperature).

Determination of Manidipine Loading Efficiency

The amount of manidipine was calculated and reported as loading efficiency, following the equation (1) below.

$$\text{Loading efficiency}\% = \frac{\text{mass of manidipine in microparticles}}{\text{theoretical mass of manidipine}} \times 100 \quad (\text{Equation 1})$$

RESULTS AND DISCUSSION

Preparation of PCL and PHBV microparticles

Polymeric microparticles were successfully obtained by simple emulsion/solvent evaporation procedure, resulting in adequate yield rates (over 80%) for all formulations.

Method Validation

Preliminary investigations were conducted until a fast and effective method was achieved. The low retention time verified (7.26 min) is very suitable to routine analysis.

Regarding selectivity, the test did not show interference from the formulations components in the drug peak as observed in the figure 2.

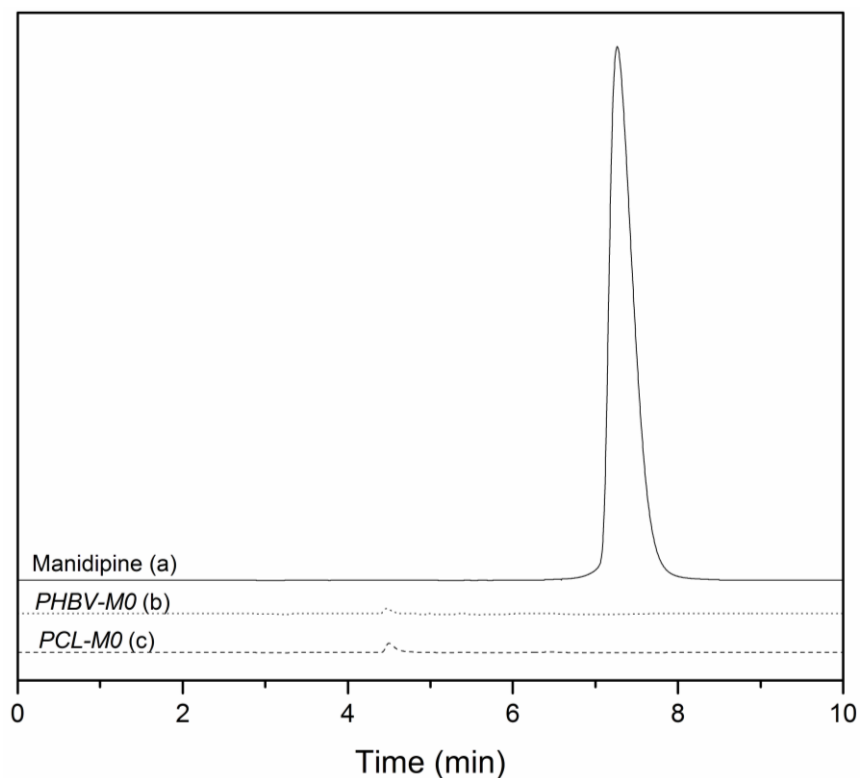


Figure 2. HPLC chromatograms ($\lambda = 265$ nm) obtained from standard solution of mandipine ($30 \mu\text{g}.\text{mL}^{-1}$) (a) and unloaded PCL and PHBV microparticles, *PCL-M0* (b) and *PHBV-M0* (c), respectively. Mobile phase: phosphate buffer pH 5.0: acetonitrile (90:10 v/v); flow rate: $0.5 \text{ mL}.\text{min}^{-1}$

Linearity evaluation showed a great relationship between the peak area and mandipine concentration, in a range of 10 to $50 \mu\text{g}.\text{mL}^{-1}$. All parameters obtained are described in the table 2.

Table 2. Linearity parameters of the proposed HPLC method

Parameters	Results
Linearity range	10.0 - 50.0 $\mu\text{g.mL}^{-1}$
Linear equation ($y = ax + b$)	$y = 612447x - 2000000$
Slope (s) $\pm$ SD*	612447 ± 0.07
y-intercept (b) $\pm$ SD*	-2000000 ± 0.25
Correlation coefficient (r)	0.9992

*SD = standard deviation

Experimental data demonstrated that the proposed method for manidipine quantification is precise, either when repeatability ($\text{RSD} < 1.92\%$) or when intermediate precision ($\text{RSD} < 2.08\%$) were analyzed (Table 3). Results also showed the adequate recovery capacity from 95.02 to 100.41% (Table 4). Thus it was also considered accurate. The lowest concentration where manidipine can be detected (LOD) and quantified (LOQ) with acceptable precision and accuracy was 3.10 and 9.40 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, respectively.

Table 3. Results of precision assays of the proposed HPLC method

Standard solution (30 $\mu\text{g.mL}^{-1}$)	Peak area $\pm$ RSD* (%)	Standard solution (30 $\mu\text{g.mL}^{-1}$)	Peak area $\pm$ RSD* (%)
1	15577360 $\pm$ 0.91	1 st Day	15473560 $\pm$ 0.83
2	14990027 $\pm$ 0.79	2 nd Day	16099362 $\pm$ 0.46
3	15302166 $\pm$ 0.22	3 rd Day	15963276 $\pm$ 1.02
Intra-day	15289851 $\pm$ 1.92	Inter-day	15845399 $\pm$ 2.08

*RSD = relative standard deviation

Table 4. Results of accuracy assays of the proposed HPLC method

	Sample solution ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	Standard solution ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	Final concentration ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	Recovery (%) $\pm$ SD*
PCL-M5	10	10	20	100.41 $\pm$ 1.59
	20	10	30	97.81 $\pm$ 0.99
	30	10	40	95.02 $\pm$ 0.85
PHBV-M5	10	10	20	95.02 $\pm$ 0.09
	20	10	30	95.08 $\pm$ 0.71
	30	10	40	95.10 $\pm$ 1.01

*SD = standard deviation

Considering robustness, parameters such as flow rate, mobile phase composition and temperature were changed in a narrow range compared to the optimum conditions used. Results are summarized in the table 5. Satisfactory recoveries were observed for all changes tested. The retention time of manidipine changed, however it does not commit the selectivity of the method for PCL and PHBV microparticles.

Table 5. Results of robustness assays of the proposed HPLC method

Parameters		Recovery (%) $\pm$ SD*
Flow rate (mL.min ⁻¹)	0.4	109.30 $\pm$ 0.68
	0.5	99.95 $\pm$ 0.32
	0.6	90.23 $\pm$ 0.53
Mobile phase (v/v)	85:15	100.18 $\pm$ 1.02
	90:10	99.95 $\pm$ 0.67
	95:5	100.90 $\pm$ 1.16
Temperature (°C)	35	97.95 $\pm$ 0.99
	37	99.95 $\pm$ 0.54
	39	99.74 $\pm$ 1.23

*SD = standard deviation

Determination of Manidipine Loading Efficiency

Loading efficiencies obtained from microparticles by RP-HPLC/ UV method are summarized in the Table 6. All formulations presented high loading rates, greater than 80%. These results can be related to the low aqueous solubility of manidipine which provides high drug concentrations into the microparticles.

Table 6. Loading efficiency values obtained to PCL and PHBV microparticles

Formulation	Loading Efficiency (%) $\pm$ SD*
<i>PCL-M5</i>	88.99 $\pm$ 1.46
<i>PCL-M10</i>	89.79 $\pm$ 2.88
<i>PHBV-M5</i>	85.29 $\pm$ 2.28
<i>PHBV-M10</i>	90.98 $\pm$ 2.43

*SD: standard deviation

CONCLUSIONS

The RP-HPLC/UV analytical method proposed above showed to be specific, linear, precise and accurate in the range of 10.0 to 50.0 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. It is suitable for determining manidipine loaded in PCL and PHBV microparticles. All formulations presented high loading efficiencies. These results provided an experimental basis to use this method for quantifying manidipine from polymeric microparticles.

REFERENCES

1. Fogari, R.; Zoppi, A; Mugellini, A.; Preti. P.; Corradi, L.; Lusardi, P. *Cardiovasc. Drug Ther.* **1999**, 13, 243.
2. Kohmann Junior, O.; Ribeiro, A. B. *Arq. Bras.Cardiol.* **2001**, 77, 463.
3. Martell-Claros, N.; Cruz, J. J. *Clin. Drug Investig.* **2011**, 31, 427.
4. Fogari, R.; Mugellini, A.; Circelli, M.; Cremonesi, G. *Clin. Drug Investig.* **2011**, 31, 439.
5. Rios, N. B.; Esparragon, F. R.; Rodriguez, C. F. A.; Perez, J. C. R. *Nefrologia* **2011**, 31, 268.
6. Csabai, K.; Vikmon, M.; Szejtli, J.; Redenti, E.; Poli, G.; Ventura, P. *J. Inclusion Phenom. Macrocyclic Chem.* **1998**, 31, 169.
7. Mielcarek, J; Szamburska, O. *J. Inclusion Phenom. Macrocyclic Chem.* **2005**, 52, 195.
8. Siepmann, J.; Siegel, R. A.; Rathbone, M. J. *Fundamentals and Applications of Controlled Release Drug Delivery*. New York: Springer, 2012.

9. Ahmad, M.; Madni, A.; Usman, M.; Munir, A.; Akhtar, N.; Khan, H. M. S.; *World Academy Sci. Eng. Technol.* **2011**, 75, 384.
10. Birnbaum, D. T.; Brannon-Peppas, L. *Microparticle drug delivery systems*. In: Drug delivery systems in cancer therapy. Totowa: Humana Press, 2003.
11. Bowey, K.; Neufeld, R. J.; *Biodrugs* **2012**, 24, 359.
12. Yoshizawa, H.; *Kona* **2004**, 22, 23.
13. Raffin, R. P.; Colomé, L. M.; Schapoval, E. E. S.; Jornada, D. S. Pohlmann, A. R.; Guterres, S. S.; *Open Drug Deliv. J.* **2007**, 1, 28.
14. Gosh, S. K.; *Functional coatings by polymer microencapsulation*. Weinheim: Wiley-VCH, 2006.
15. Lachman, L.; Lieberman, H. A.; Kaning, J. L.; *Teoria e Prática na Indústria Farmacêutica*, Fundação Calouste: Lisboa, 2001.
16. Society of Japanese Pharmacopoeia. *The Japanese Pharmacopoeia*. 16th ed., Supplement I, 2012.
17. ICH – “*International Conference on Harmonization of Technical Requirements for registration of Pharmaceutical for Human use: Q 2B- validation of Analytical procedure: methodology*”, 1996.
18. ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária; *RE nº 899, de 29 de maio de 2003: Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos*. Ministério da Saúde, Brasil, 2003.
19. Ribani, M.; Bottoli, C. B. G.; Collins, C. H.; Jardim, I. C. S. F.; Melo, L. F. C. *Quim. Nova* **2004**, 27.

CAPÍTULO 2: Desenvolvimento, caracterização e avaliação de micropartículas de poli(ϵ -caprolactona) e poli(3-hidroxibutirato-co-hidroxivalerato) contendo manidipina

CAPÍTULO 2: Desenvolvimento, caracterização e avaliação de micropartículas de poli(ϵ -caprolactona) e poli(3-hidroxibutirato-co-hidroxivalerato) contendo manidipina

2.1 Apresentação

O presente capítulo visa detalhar o desenvolvimento de micropartículas poliméricas contendo o anti-hipertensivo manidipina. Para tanto, empregou-se os polímeros poli(ϵ -caprolactona) (PCL) e poli(3-hidroxibutirato-co-hidroxivalerato) (PHBV). Esses poliésteres foram selecionados em função da biocompatibilidade e do potencial que apresentam para aplicações na liberação controlada de fármacos.

Além da seleção do polímero, o controle de outros fatores foi fundamental na obtenção das micropartículas contendo manidipina. A alcalinização da fase aquosa foi um fator crítico para a formação das micropartículas a partir da PCL, por promover a estabilização das gotículas da fase oleosa e, conseqüentemente, permitir a formação e a separação das micropartículas.

A caracterização detalhada das micropartículas obtidas, aliada a avaliação da performance *in vivo*, forneceram uma base experimental consistente para o uso das micropartículas poliméricas contendo manidipina como uma alternativa promissora no tratamento da hipertensão arterial sistêmica.

PUBLICAÇÃO 2: Manipine-loaded microparticles using poly(ϵ -caprolactone) and poly(3-hydroxybutyrate-co-hydroxyvalerate) as oral controlled release carriers

Artigo submetido para publicação no periódico *Materials Science and Engineering: C*.

Manidipine-loaded microparticles using poly(ϵ -caprolactone) and poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) as oral controlled release carriers

Fernanda Malaquias Barboza¹, Willian Moreira Machado², Luiz Renato Olchanheski Junior², Sônia Faria Zawadzki³, Daniel Fernandes² and Paulo Vitor Farago^{1*}.

¹ *Laboratory of Pharmaceutical Products, Postgraduate Program in Pharmaceutical Science, Department of Pharmaceutical Sciences, State University of Ponta Grossa, Campus Uvaranas, 84030-900, Ponta Grossa, Paraná, Brazil.*

² *Laboratory of Pharmacology, Postgraduate Program in Pharmaceutical Science, Department of Pharmaceutical Sciences, State University of Ponta Grossa, Campus Uvaranas, 84030-900, Ponta Grossa, Paraná, Brazil.*

³ *Laboratory of Synthetic Polymers, Postgraduate Program in Chemistry, Department of Chemistry, Federal University of Paraná, Centro Politécnico Jardim das Américas, 81531-990, Curitiba, Paraná, Brazil.*

* Author for correspondence: pvfarago@gmail.com (+55 42 9971-6641)

ABSTRACT

Microparticles of poly(ϵ -caprolactone) (PCL) and poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) (PHBV) containing manidipine were successfully prepared by the simple emulsion/ solvent evaporation method. All formulations showed loading efficiency rates greater than 80% and average particle size less than 8 μm . Microparticulate systems showed a spherical shape with smooth and porous surface for PCL and PHBV formulations, respectively. According to Fourier-transformed infrared analysis, initial components were not chemically modified during microencapsulation process. X-ray diffraction patterns and differential scanning calorimetry analysis demonstrated that this process led to drug amorphization. *In vitro* dissolution studies showed that all microparticles prepared were able to sustain manidipine release, especially which one prepared from PCL, that contained 5% of drug loaded (*PCL-M5*). Animal studies demonstrated that *PCL-M5* formulation was able to keep the mean arterial pressure variation after phenylephrine administration up to 24 hours. These data demonstrated the sustained antihypertensive effect of the proposed microparticles. Results provided an experimental basis for using *PCL-M5* formulation as an oral manidipine carrier.

Keywords: controlled release, manidipine, microparticles, poly(ϵ -caprolactone), poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate).

1. INTRODUCTION

Cardiovascular disease is clearly and consistently related to blood pressure. The primary goal of the treatment of hypertensive patients is to achieve the maximum possible reduction in the long-term total risk of cardiovascular and renal morbidity and mortality. In addition to the lowering of blood pressure, a successful medicine also requires appropriate consideration of co-morbidities [1, 2].

Among several anti-hypertensive drugs, calcium channel blocks are widely used due to their efficacy, tolerability and safety. In this group, the manidipine, 2-[4-(diphenylmethyl)-1-piperazinyl]ethylmethyl(±)-1, 4-dihydro-2, 6-dimethyl-4-(m-nitrophenyl)-3, 5-pyridinedicarboxylate (Figure 1), stands out as a third-generation calcium channel blocker, effective in the treatment of hypertension, even to elderly people or patients with associated diseases such as diabetes and nephropathy [3, 4, 5].

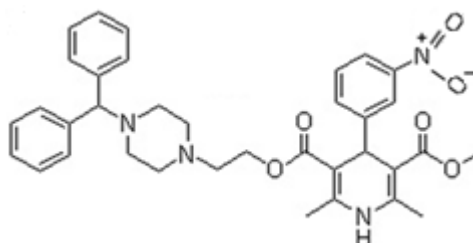


Figure 1. Chemical structure of manidipine

It presents high tolerability which results in a low frequency of adverse events. Several studies have reported that manidipine has a low oedematogenic potential when compared to other dihydropyridines and it is not associated with increased heart rate. Furthermore, this drug does not appear to activate the sympathetic nervous system [6]. In addition to reducing arterial blood pressure, manidipine has been related to metabolic effects of potential clinical interest. It blocks T-type calcium channels present in the efferent glomerular arterioles, reducing intraglomerular pressure and microalbuminuria [2].

Like other dihydropyridine derivatives, manidipine exhibits high clearance and first pass metabolism and hence a low systemic bioavailability. Moreover, after oral administration, it presents a peak plasma concentration after 1–2 h, with an apparent elimination half-life of 4–8 h [7].

In spite of manidipine presents a short elimination half-life of 4-8 h, its high lipophilicity makes it being rapidly removed from circulation to adipose tissue. Manidipine is then continuously released from fat cells, which promotes a time of action up to 24 hours [4]. This spontaneous compartmentalization becomes a complicating factor for drug therapy, since drug release is dependent on the mass of adipose tissue of the patient, what is a very variable in population. Therefore manidipine demonstrates a sustained but heterogeneous and individualized release profile.

Thus, a further improvement is necessary to attain a substantial advance in absorption and bioavailability of manidipine [7, 8]. In that sense, the development of new formulations useful for controlling manidipine release along gastrointestinal tract and enhancing drug therapy [9] is required.

In this purpose, microencapsulation process is able to avoid its fast compartmentalization in adipose cells, besides showing high efficiency over controlling drug delivery and protecting drug degradation by physiological metabolism and adverse environmental conditions [10, 11, 12, 13, 14, 15].

Few studies describe delivery systems for manidipine. Papers are only devoted to describe manidipine complexation with cyclodextrin and its derivatives [7, 8]. Literature does not report works involving manidipine-loaded polymeric microparticles. Thus, the aim of this study was to obtain poly(ϵ -caprolactone) (PCL) and poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) (PHBV) microparticles containing manidipine. These polyesters are attractive materials for controlled-release drug applications due to their biocompatibility and biodegradability since their decomposition products are not toxic and are easily excreted. Manidipine-loaded PCL and PHBV microparticles were also characterized and *in vitro* and *in vivo* evaluated as oral drug delivery carriers.

2. EXPERIMENTAL

2.1 Materials

Manidipine hydrochloride (Zi Bo Riyuexin Chemical Industrial, Shandong, China), poly(ϵ -caprolactone) (PCL) ($M_w = 70,000 - 90,000 \text{ g.mol}^{-1}$, Sigma-Aldrich, St.

Louis, MO, USA), poly(3-hydroxybutirate-co-3-hydroxyvalerate) (PHBV) ($M_w = 380,000 \text{ g.mol}^{-1}$, 8.70 mol% hydroxyvalerate, Biocycle L110, PHB Industrial, Serrana, Brazil) and poly(vinyl alcohol) (PVA) ($M_w = 72,000 \text{ g.mol}^{-1}$, 88.5 mol% of hydrolysis, Vetec, Rio de Janeiro, Brazil) were used as received. All reagents and solvents were of analytical grade.

2.2 Preparation of PCL and PHBV microparticles

Polymeric microparticles containing manidipine were prepared by simple emulsion/solvent evaporation method. Dichloromethane and chloroform were used as PCL and PHBV solvent, respectively. The emulsion was stabilized with polysorbate 80 (Tween 80®).

Two different formulations (Table 1) were obtained for each polymer (PCL and PHBV) depending on the theoretical amount of manidipine used in their composition (5 and 10%). Unloaded microparticles were also prepared as negative controls (*PCL-M0* e *PHBV-M0*). All formulations were obtained in triplicate.

The organic phase was quickly added into the aqueous phase under mechanical stirring (3500 rpm) for 5 min. The emulsion was kept under mechanical stirring (1000 rpm) at room temperature for 4 h. After solvent evaporation, microparticles were separated by centrifugation (3500 rpm), washed twice with purified water and dried at $35 \pm 5^\circ\text{C}$ for 48 h. All procedures were performed protected from light.

Table 1. Composition of manidipine-loaded and unloaded PCL and PHBV microparticles

Formulation		<i>PCL-M0</i>	<i>PCL-M5</i>	<i>PCL-M10</i>	<i>PHBV-M0</i>	<i>PHBV-M5</i>	<i>PHBV-M10</i>
Organic	Manidipine hydrochloride (g)	-	0.1	0.2	-	0.1	0.2
	PCL (g)	2.0	1.9	1.8	-	-	-
	PHBV (g)	-	-	-	2.0	1.9	1.8
	Dichloromethane (mL)	40	40	40	-	-	-
	Chloroform (mL)	-	-	-	40	40	40
Aqueous	PVA* 2% solution (mL)	200	200	200	200	200	200
	Tween 80® (g)	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25
	NaOH 0.1 M (mL)	2	2	2	-	-	-

*PVA = poly(vinyl) alcohol

In order to provide a comparative analysis, physical mixtures between manidipine and polymers were also prepared using 1:1 (manidipine: polymer) in weight proportion.

2.3 Determination of Manidipine Loading Efficiency

The amount of drug loaded in PCL and PHBV microparticles was determined by means of a previously developed and validated method by high performance liquid chromatography with ultraviolet detection (HPLC/ UV). An amount of microparticles, equivalent to 50 mg of manidipine, was weighted and magnetic stirred with 100 mL of methanol for 12 h in order to completely extract the drug loaded in microparticles. Samples were suitable diluted in methanol and filtered through a poly(vinylidene fluoride) membrane filter (Durapore membrane, 0.45 μm pore size). The concentration of manidipine was determined chromatographically through a LiChroCart[®] (Merck) analytical column (4 x 250 mm) filled with LiChrospher[®] 100 RP-18 (5 μm) with UV detection at 265 nm in triplicate. The mobile phase was composed of phosphate buffer pH 5.0 and acetonitrile (9:1 v/v) with a flow rate of 0.5 mL.min⁻¹.

The amount of manidipine was calculated and reported as loading efficiency, following the equation (1).

$$\text{Loading efficiency}\% = \frac{\text{mass of manidipine in microparticles}}{\text{theoretical mass of manidipine}} \times 100 \quad (\text{Equation 1})$$

2.4 Characterization

2.4.1 Analyses of Morphology and Surface

Morphology and surface data were evaluated in a scanning electron microscope (Shimadzu IC-50). Samples were mounted on aluminum stubs, sputtered with gold (IC-50 Ion Coater, Shimadzu, Kyoto, Japan). Micrographs were obtained at an accelerating voltage of 10 kV with different magnifications.

Microparticles surface was analyzed by wide-angle X-ray powder diffraction in an X-ray diffractometer (Shimadzu XRD-6000, Kyoto, Japan) in order to observe peaks related to crystalline structures [16]. Samples were scanned from a Cu-K α source ($\lambda = 1.5418 \text{ \AA}$) at 40 kV and 30 mA, employing 2θ from 2° to 80° at a scan rate of $2^\circ.\text{min}^{-1}$.

2.4.2 Determination of Particle Size and Granulometric Distribution

The particle size distribution was estimated from the measurement of about 200 particles, assuming spherical shape, found in an arbitrary chosen area in enlarged micrographs by Image Tool Software (3.0 version, *University of Texas Health Science Center in Santo Antonio*, Santo Antonio, United States of America). *Span*, mathematical value defined as the granulometric dispersion measurement, was calculated from Equation 2.

$$\text{span} = \frac{d_{(v,90)} - d_{(v,10)}}{d_{(v,50)}} \quad (\text{Equation 2})$$

$d_{(v,10)}$, $d_{(v,50)}$ and $d_{(v,90)}$ match, respectively, to the particles diameter at 10, 50 and 90% of the accumulated distribution of the sample.

2.4.3 Infrared Spectroscopy Evaluation

Raw materials, PCL and PHBV microparticles and physical mixtures were analyzed by Fourier-transformed infrared (FTIR) spectroscopy on a Shimadzu IR Prestige-21 spectrophotometer (Kyoto, Japan). Samples were recorded from 4000 to 400 cm^{-1} , using KBr pellets filled with 1% of each sample using $64 \text{ scans}.\text{min}^{-1}$ and resolution of 2 cm^{-1} .

2.4.4 Thermal Analyses

Microparticles thermal stability was investigated with a thermobalance (NETZSCH-Geratebau GmbH) using 5 mg of sample into platinum crucibles.

Analyses were held under dynamic N₂ atmosphere with a flow rate of 50 mL.min⁻¹. Temperature ranged from 25 to 600°C, following a constant heating rate of 10°C.min⁻¹,

Differential scanning calorimetry (DSC) curves were obtained in a DSC-60 calorimeter (Shimadzu, Kyoto, Japan) using aluminum crucibles with 5 mg of sample, under dynamic N₂ atmosphere with a flow rate of 50 mL.min⁻¹. Temperature ranged from -120 a 250°C, with a constant rate of 10°C.min⁻¹, according to specific characteristics of each material. The equipment was previously calibrated with indium (m.p. = 156.6°C; $\Delta H_{melting} = 28.54 \text{ J.g}^{-1}$). Thermograms provided information about thermal behavior changes of every material studied [16, 17].

2.5 *In vitro* Release Studies

Dissolution rates of manidipine as pure drug and polymeric microparticles were carried out in a Nova Ética 299-6 ATTS dissolution tester equipped with paddles. Systems were kept at a thermostatically controlled temperature of 37°C ± 0.5 and stirred at 50 rpm. Dissolution medium was acetate buffer (50 mM, pH 4.0, 900 mL) as recommended by The Japanese Pharmacopoeia [18]. All experiments were performed under dark conditions.

At fixed time intervals, samples were collected, filtered (0.45 µm pore size) and analyzed spectrophotometrically at 228 nm [18]. The dissolution value was obtained from the amount of drug released. A correction factor was applied to the cumulative dilution caused by replacement of the sample with an equal volume of fresh medium.

2.5.1 Analysis of release behavior

In order to compare the dissolution profiles of manidipine and its microparticulate systems, dependent and independent methods were performed as summarized in table 2.

Table 2. Mathematical models applied to dissolution experiments

Model	Equation
Dissolution efficiency	$DE = \frac{\int_0^t y \cdot dt}{y_{100} \cdot t} \times 100\%$
First-order	$\%D = 100(1 - e^{-kt})$
Biexponential	$\%D = 100[1 - (Ae^{-\alpha t} + Be^{-\beta t})]$
Zero-order	$\%D = kt$
Weibull	$\%D = 100[1 - e^{-(t/TD)^b}]$
Monolag	$\%D = 100[1 - e^{-k(t-x)}]$

Legend: %D = dissolved percentage, b = shape parameter, TD = time interval necessary to release 63.2% of the drug, k , α and β = kinetics constants, t = dissolution time, A and B = initial drug concentrations that contribute for the two dissolution stages

As model-independent analysis, dissolution efficiency, the area under a dissolution curve between defined time points [19], was used to compare dissolution profiles. One-way ANOVA with Tukey's *post hoc* test was also used to compare release rates of the pure drug and polymeric microparticles [20] by Microsoft Excel™ 2007 software (Salt Lake City, USA).

Profiles were also investigated by dependent models [21, 22] using the MicroMath Scientist™ 2.01 software (Salt Lake City, USA). Data were tested to fit first-order, biexponential, zero-order, weibull and monolag equations (Table 2). For selecting the best model of manidipine releasing it was considered correlation coefficient (r), the model selection criteria (MSC) and graphical adjustment.

2.6 In vivo Animal Studies of Antihypertensive Potential

Female Wistar rats, 90 days old, weighting between 200 and 300 g, were housed at room temperature ($22 \pm 2^\circ \text{C}$) with controlled light/ dark cycle, with free access to water and food. All procedures were performed in agreement with the Ethics Committee of State University of Ponta Grossa in compliance to the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals published by the US National Institutes of Health (NIH Publication No. 85–23, revised 1996).

2.6.1 Experimental Protocol

Ninety-six rats were randomly divided into four groups of twenty-four animals each one. Group 1 received pure manidipine (1 mg.kg^{-1} , orally), group 2 received *PCL-M5* microparticles (amount equivalent to 1 mg of the drug. kg^{-1} , orally), group 3 received *PHBV-M5* microparticles (amount equivalent to 1 mg of the drug. kg^{-1} , orally) and group 4 received sterile water ($500 \text{ }\mu\text{L}$). At different time intervals after treatment (1, 2, 6, 12 and 24 h) animals were instrumented for blood pressure measurement, as described below. Mean blood pressure and vasoconstrictor response to phenylephrine were recorded.

2.6.2 Evaluation of Cardiovascular Parameters

Under anesthesia (ketamine, 75 mg.kg^{-1} , and xylazine 15 mg.kg^{-1}), polyethylene cannula (PE-50) was inserted into the left femoral vein of the rats for phenylephrine injections (10 nmol.kg^{-1}). Then, the right carotid artery was isolated and a heparinized polyethylene catheter (Angiocath[®], number 19) was inserted for measuring blood pressure. Mean arterial blood pressure (mmHg) were recorded by integration software (Chart7pro[®]). Finally, rats were sacrificed with an anesthetic overdose.

3. RESULTS AND DISCUSSION

3.1 Preparation of PCL and PHBV microparticles

Polymeric microparticles were successfully obtained by the proposed simple emulsion/solvent evaporation procedure, resulting in adequate yield rates (over 80%) for all formulations.

3.2 Determination of Manidipine Loading Efficiency

Loading efficiencies obtained from microparticles by HPLC/ UV method are summarized in the Table 3. All formulations presented high loading rates, greater than 80%. These results can be related to the low aqueous solubility of manidipine which provides high drug concentrations into the microparticles.

Table 3. Loading efficiency values obtained to PCL and PHBV microparticles

Formulation	Loading Efficiency (%) $\pm$ SD*
<i>PCL-M5</i>	88.99 $\pm$ 1.46
<i>PCL-M10</i>	89.79 $\pm$ 2.88
<i>PHBV-M5</i>	85.29 $\pm$ 2.28
<i>PHBV-M10</i>	90.98 $\pm$ 2.43

*SD: standard deviation.

3.3 Characterization

3.3.1 Analyses of Morphology and Surface

Manidipine and polymers micrographs obtained by SEM are showed in the figure 2. Images were magnified 5000 and 100 X for the drug and polymers, respectively. Manidipine (Figure 2a) and PHBV (Figure 2c) did not present morphological structure defined before microparticles preparation. PCL presented an irregular surface (Figure 2b).

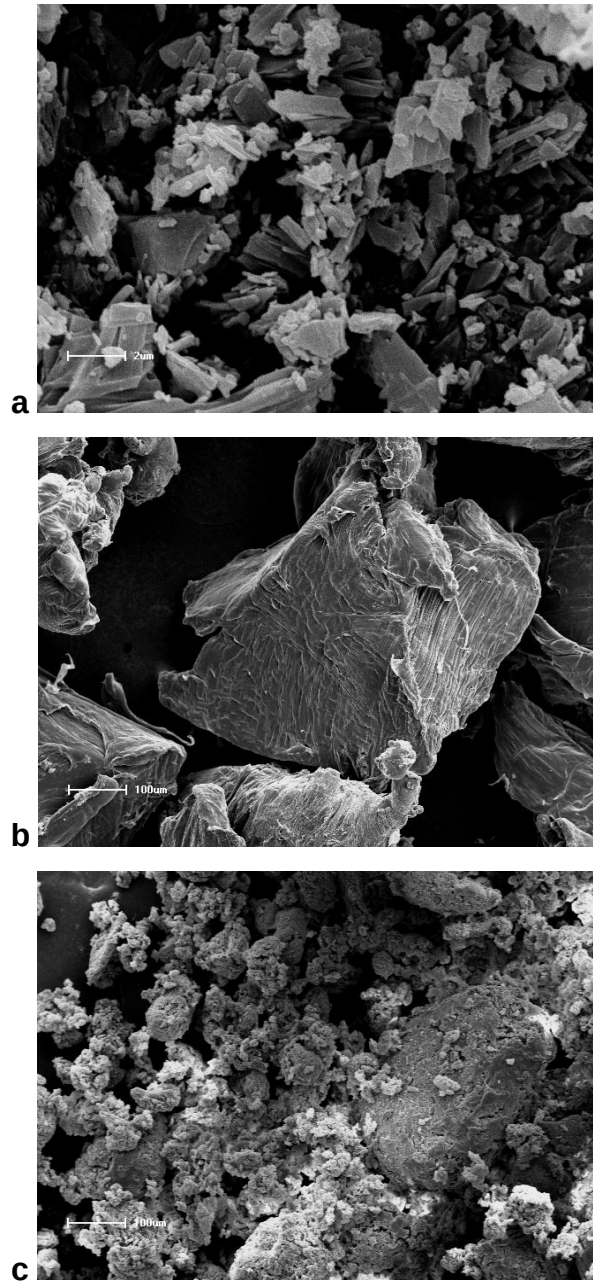


Figure 2. SEM photomicrographs of manidipine (a) and pure polymers, PCL (b) and PHBV (c)

SEM micrographs showed that PCL microparticles (*PCL-M5* e *PCL-M10*) present a spherical shape with a smooth and regular surface (Figure 3).

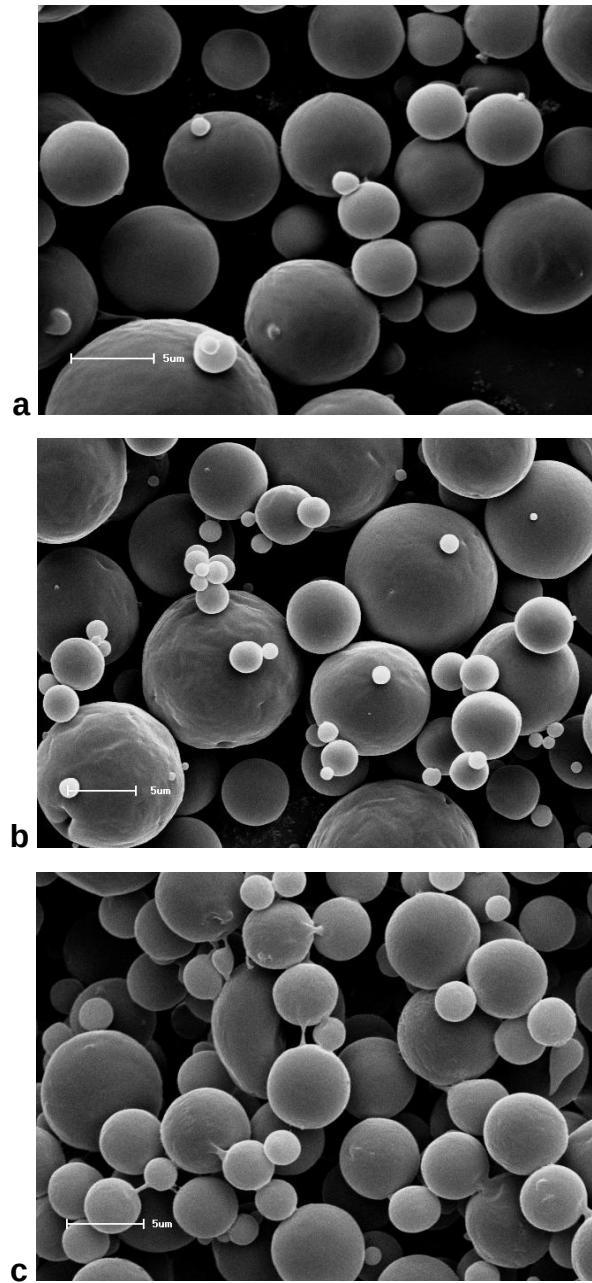


Figure 3. SEM photomicrographs at 2700 x magnifications of PCL microparticles without drug loaded (*PCL-M0*) (a), *PCL-M5* (b) and *PCL-M10* (c)

PHBV microparticles (*PHBV-M5* e *PHBV-M10*) also showed a spherical shape, however, with a porous surface. Pores were found even on the negative control formulation surface (Figure 4a).

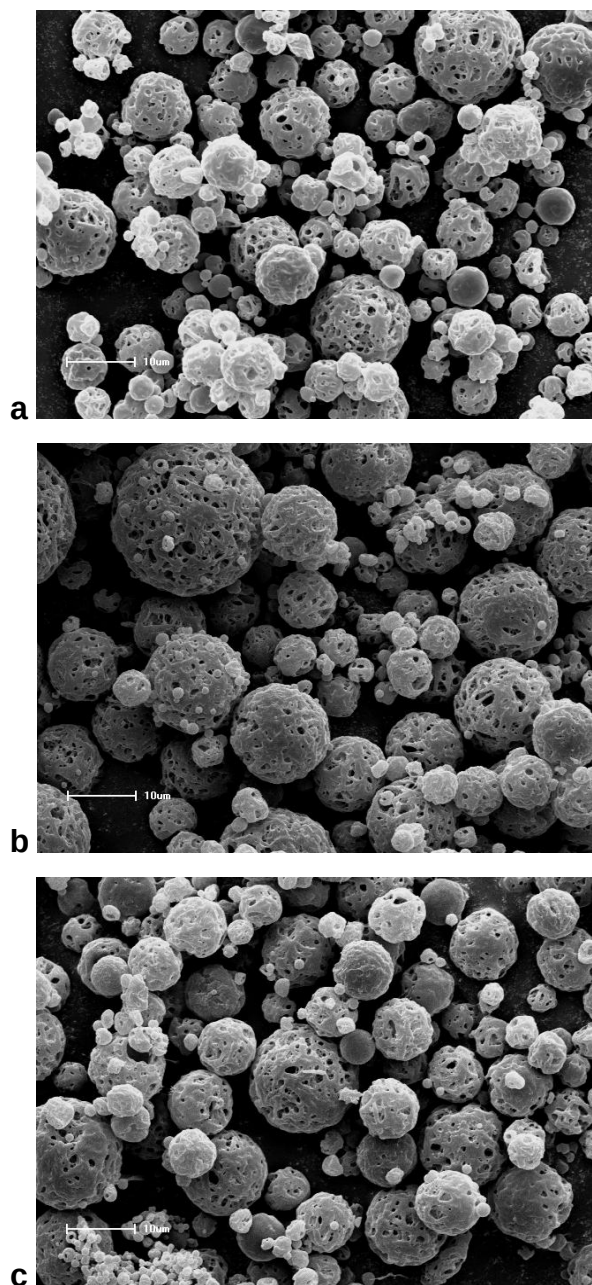


Figure 4. SEM photomicrographs at 1200 x magnifications of PHBV microparticles without drug loaded (*PHBV-M0*) (a), *PHBV-M5* (b) and *PHBV-M10* (c)

The presence of pores represents substantial morphological evidence that can change the drug release process from microparticles. According to the literature, pores may result from the nature of the poly-hydroxyalkanoate used or from fast removal of the organic solvent [23].

X-ray diffraction patterns are indicated in figures 5 and 6. Different peaks related to a crystalline structure were observed either to manidipine or polymers. All microparticulate systems showed crystalline diffraction patterns very similar to pure

PCL and PHBV. These results suggest that the microencapsulation procedure provided a remarkable decrease of the crystalline diffraction peaks of manidipine leading to drug amorphization.

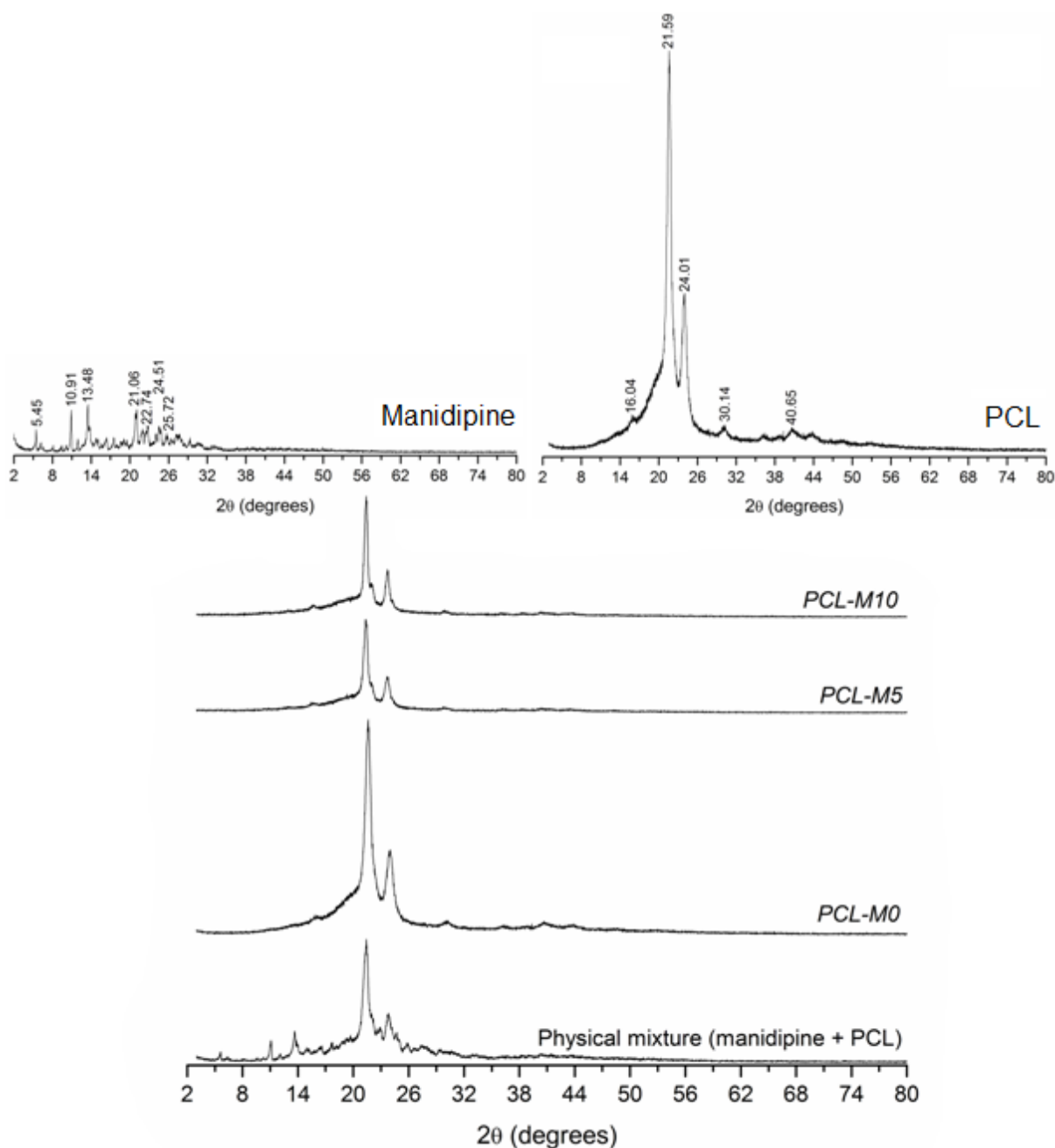


Figure 5. X-ray diffractions spectra of manidipine, PCL, its respective physical mixture and microparticulate systems

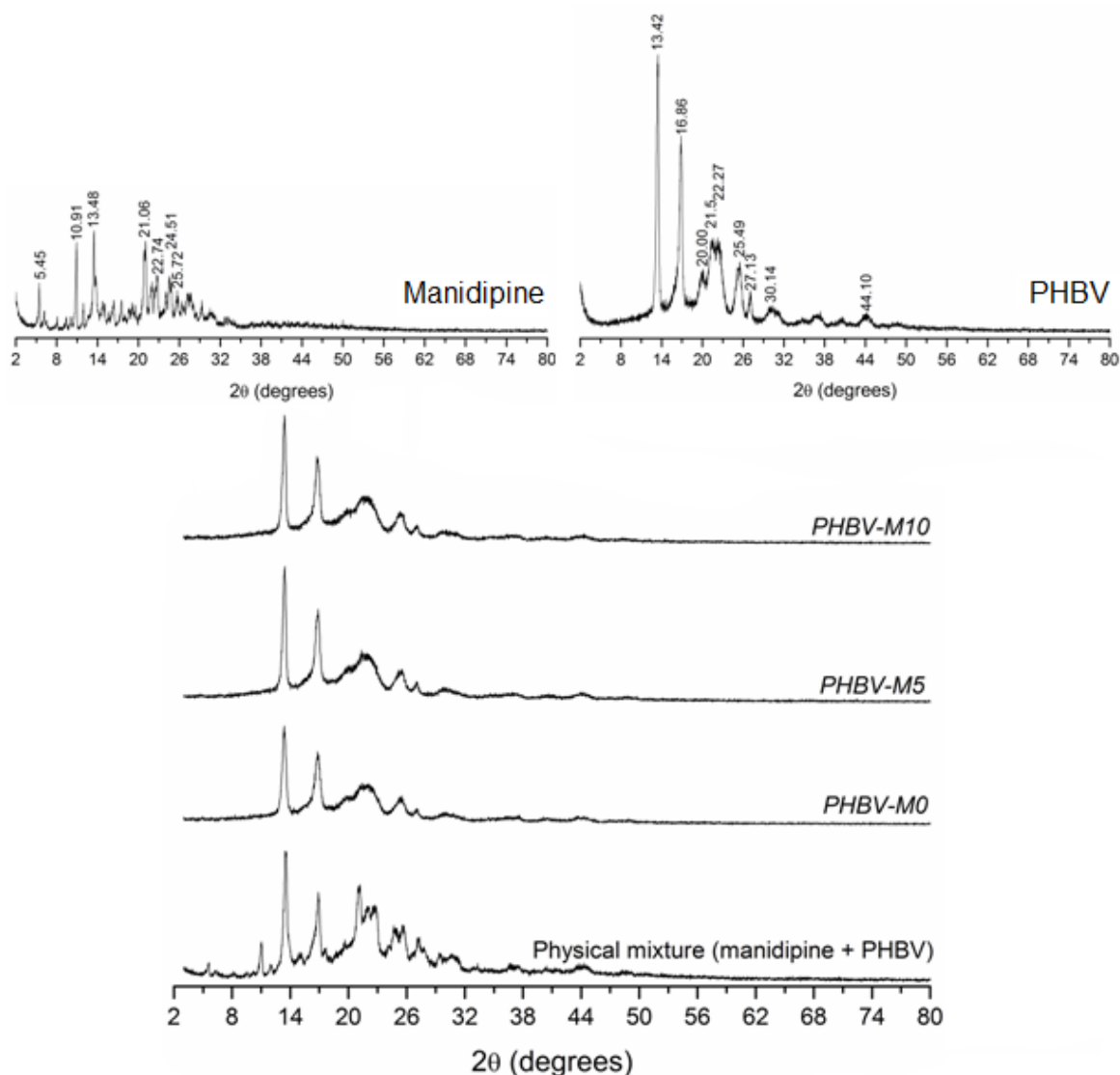


Figure 6. X-ray diffractions spectra of manidipine, PHBV, its respective physical mixture and microparticulate systems

Amorphous solids are, in general, more soluble than crystalline form, due to free energies involved in their dissolution process. Solids in amorphous state have randomly arranged molecules, thus, low energy is required to separate them what makes their dissolution faster when compared to crystalline form [24].

3.3.2 Determination of Particle Size and Granulometric Distribution

The particle size and granulometric dispersion (*span*) obtained for PCL and PHBV microparticles are indicated in table 4.

Table 4. Average particle size and granulometric size distribution of microparticulate systems

Formulation	Average particle size (μm)	Span
<i>PCL-M0</i>	5.69	1.52
<i>PCL-M5</i>	6.49	1.73
<i>PCL-M10</i>	6.74	2.21
<i>PHBV-M0</i>	6.04	1.17
<i>PHBV-M5</i>	7.66	1.79
<i>PHBV-M10</i>	4.10	1.40

All formulations presented average diameter values under 8 μm . This size allows that the oral administration of these particles provides a sustained effect of manidipine, since they present an extended intestinal transit [25].

Regarding span values, the most microparticulate systems presented values under 2 which mean that they presented a narrow dispersion around the average particle sizes, suggesting an adequate unimodal behavior.

3.3.3 Infrared Spectroscopy Evaluation

FTIR spectra obtained for manidipine, PCL, PHBV, their physical mixtures and microparticles are shown in figures 7 e 8, respectively.

The FTIR spectrum of pure manidipine presented a typical aromatic amine band at 3345 cm^{-1} , ester C = O stretching band at 1721 cm^{-1} , stretching band of axial deformation from NO_2 group in 1534 and 1350 cm^{-1} , benzene C-H stretching at 1482 cm^{-1} , stretching band of axial deformation from C-N bond at 1218 cm^{-1} and, finally, bands related to deformation of C-H bond of benzene out of the plane at 757 and 708 cm^{-1} .

As PCL is an aliphatic polyester, its spectrum showed a strong band at 1728 cm^{-1} , corresponding to C=O axial stretching and two bands at 2945 and 2867 cm^{-1} assigned to symmetric and asymmetric CH_2 -stretching, respectively [26]. Similarly, PHBV spectrum exhibited a strong band at 1725 cm^{-1} due to C=O stretching. Its symmetric and antisymmetric $-\text{C}-\text{O}-\text{C}-$ stretching vibration showed typical bands from 828 to 980 cm^{-1} and 1058 to 1134 cm^{-1} , respectively [27].

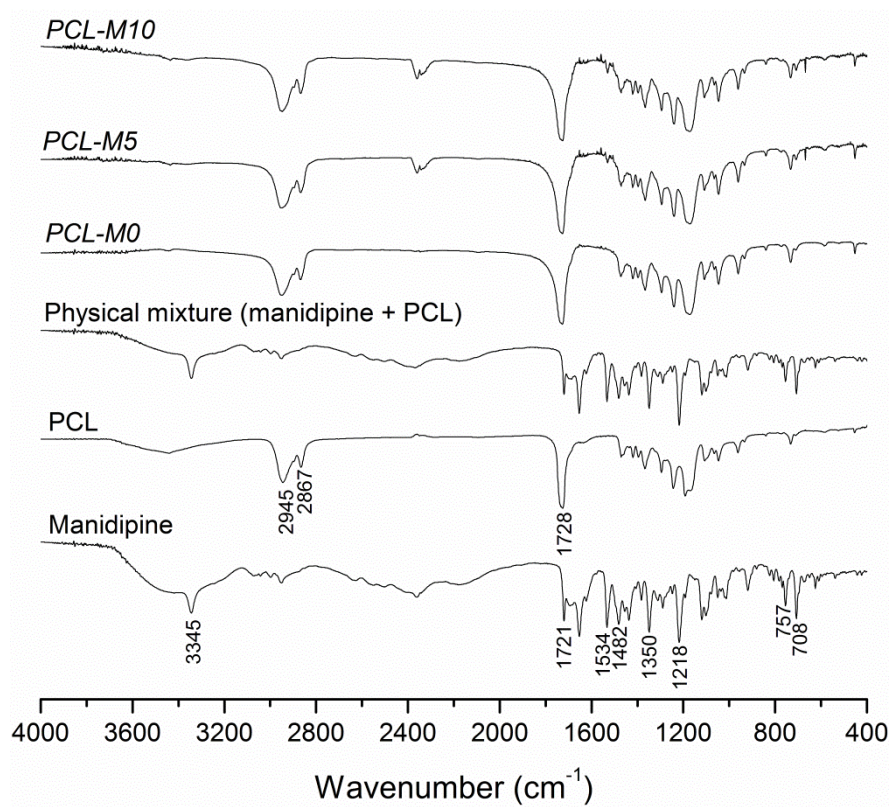


Figure 7. FTIR spectra of manidipine, PCL, its respective physical mixture and microparticulate systems

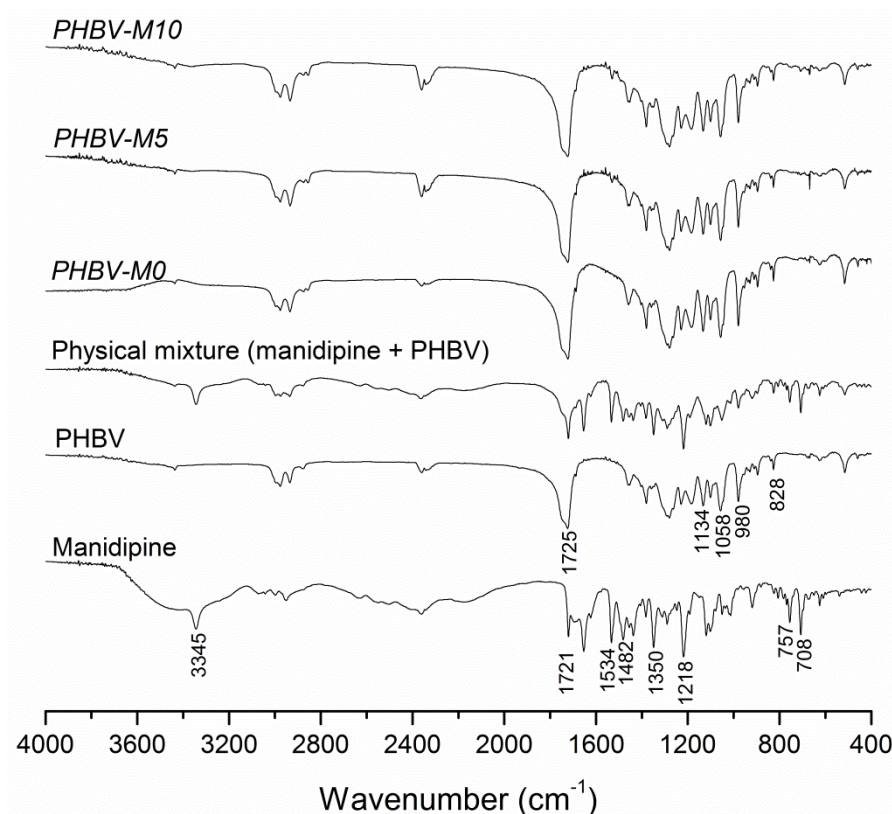


Figure 8. FTIR spectra of manidipine, PHBV, its respective physical mixture and microparticulate systems

Physical mixtures and manidipine-loaded microparticles presented band assignments at the same wavenumber range of FTIR spectra and formulations did not present any new band assignment. Both polymers employed present terminal primary hydroxyl groups, whereas manidipine presents a reactive aromatic nitro group. Aromatic nitro compounds are usually reduced to form anilines, however, during microencapsulation process, there is no reducing medium to make it possible.

Therefore, it is possible to ensure that initial components were not chemically modified, safely preserving the expected therapeutic effect of the drug.

3.3.4 Thermal Analyses

Thermogravimetric analyses (TG/ DTG) of manidipine showed two mass loss events, the first between 166 and 203°C ($\Delta m = 2.99\%$) and the second one between 208 and 522°C ($\Delta m = 87.46\%$). Whereas the TG/ DTG curves of polymers presented

a single mass loss event at the temperature range of 247 and 467°C ($\Delta m = 97.84\%$) and 224 and 291°C ($\Delta m = 96.91\%$) for PCL and PHBV, respectively.

PCL microparticulate systems started to lose mass at 224°C while PHBV microparticulate systems started at 161°C. These results indicate that PCL microparticles are more thermally stable than PHBV microparticles. Similar results have been described in the literature for PCL and PHBV microparticles [24, 28].

DSC curves showed that polymers presented their melting points at 60 and 168°C, for PCL and PHBV respectively. All PCL and PHBV microparticles showed a single melting event, at the same temperature observed for pure polymers. Therefore, these results confirmed previous data obtained from X-ray analysis, suggesting drug amorphization.

3.4 *In vitro* Release Studies

Dissolution rates of manidipine and polymeric microparticles are shown in figure 9. Release profiles demonstrated that the average time for 80% releasing of the drug was about 2.2 hours for manidipine as pure drug, 23.0 and 8.7 hours for *PCL-M5* and *PCL-M10* and 10.7 and 6.7 hours for *PHBV-M5* and *PHBV-M10*, respectively. These results demonstrated that all microparticulate systems exhibited a sustained release of the drug. Its behavior is due to the polymeric loading that showed to be able to sustain manidipine release.

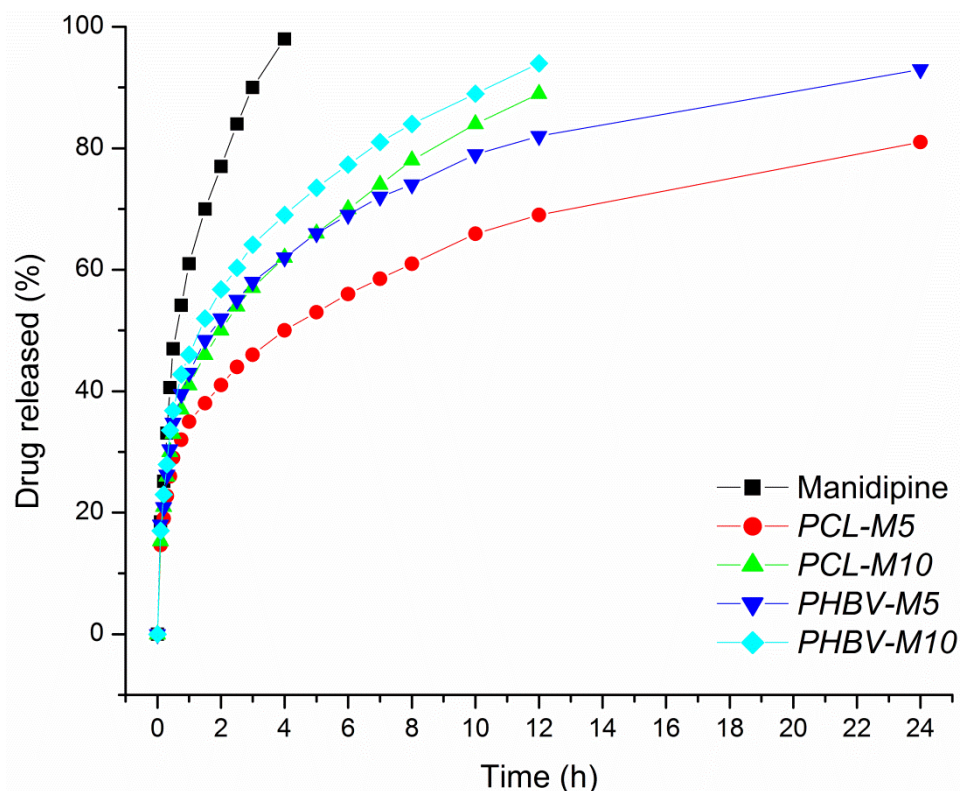


Figure 9. Release profiles of manidipine and PCL and PHBV polymeric microparticles into acetate buffer (50 mM, pH 4.0)

The presence of pores in PHBV microparticles surface, as verified in the SEM micrographs, makes easier the solvent access and justifies their faster dissolution.

Formulations containing 5% of the drug sustained the drug release for longer when compared to the other ones with 10%. It can be justified because of the increased polymer/ drug proportion in *M5* formulations.

Despite PCL or PHBV provided suitable profiles, *PCL-M5* was the best formulation for sustaining drug release.

3.4.1 Analysis of release behavior

Regarding dissolution efficiency (DE) data, PCL and PHBV microparticles reduced this rate, as expected for all controlled release formulations. Whereas the pure drug presented a dissolution efficiency of 73.6%, along four hours, microparticulate systems presented 39.7 and 48.1% for *PCL-M5* and *PCL-M10* and 49.5 and 54.0% for *PHBV-M5* and *PHBV-M10* respectively.

For the purpose of evaluating the difference among release profiles, the Tukey's test was performed on the results of ANOVA. These results indicated a statistical difference between pure drug and *PCL-M5* ($p = 0.001$), *PCL-M10* ($p = 0.025$) and *PHBV-M5* ($p = 0.023$) formulations. However, there was no statistical difference between manidipine and *PHBV-M10* ($p = 0.099$).

Release profiles were fitted to mathematical models and the selection of the best model considered r , MSC and the graphic adjustment. Both manidipine and microparticles better fitted biexponential equation (Table 5) than other models. The burst release apparent rate constants (α) and the slow release apparent rate constants (β) are reported in table 5.

Table 5. Release data from manidipine and polymeric microparticles

	Biexponential Model			
	<i>MSC</i>	<i>r</i>	α	β
Manidipine	2.7983	0.9930	0.8703	0.7732
<i>PCL-M5</i>	4.7431	0.9973	2.5659	0.0619
<i>PCL-M10</i>	4.7644	0.9979	1.5495	0.1234
<i>PHBV-M5</i>	4.8927	0.9988	1.8285	0.0959
<i>PHBV-M10</i>	5.8751	0.9992	2.3060	0.1698

All results demonstrated that PCL and PHBV microparticles sustained the mandipine release, nevertheless without changing its release model. In this way, it is possible to predict that formulations just modified undesirable pharmacokinetic characteristics of the drug with no interference in its releasing mechanism throughout the gastrointestinal tract.

3.5 *In vivo* Animal Studies of Antihypertensive Potential

Considering the previously reported results, both *PCL-M5* and *PHBV-M5* were chosen for further *in vivo* evaluation. Performances of manidipine-loaded microparticles over mean arterial pressure (MAP) in rats are shown in figure 10.

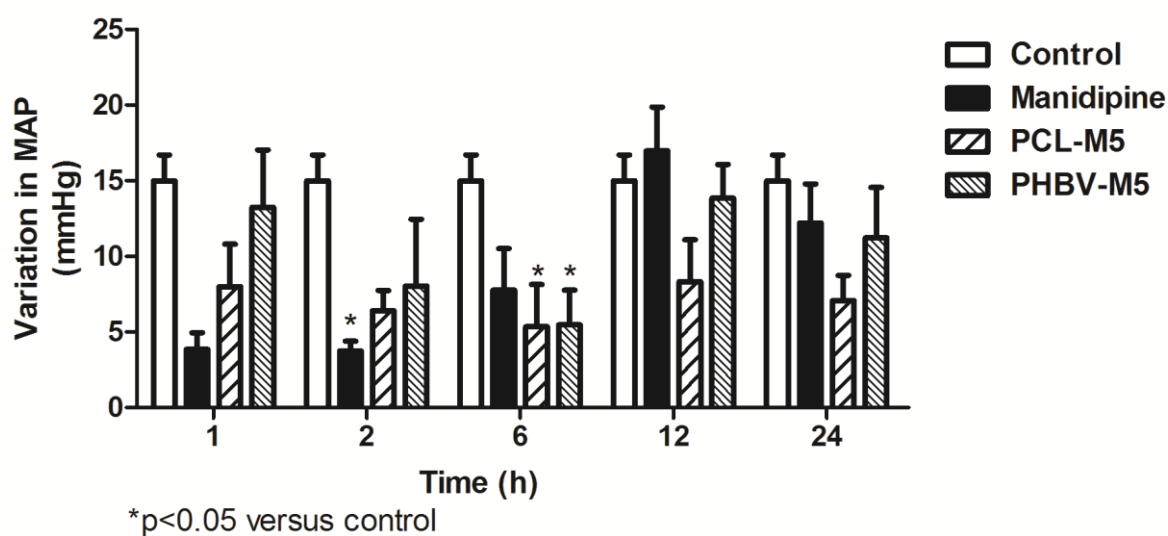


Figure 10. Effects of manidipine on mean arterial pressure (MAP) after phenylephrine injection. Formulations *PCL-M5* and *PHBV-M5*, pure manidipine and water (control group) were administered orally to the animals. Statistical analysis was performed using ANOVA test followed by Dunnet's *post hoc* test

Control group showed a variation of 14.99 mmHg, forward phenylephrine administration, for all time data. One, two, six, 12 and 24 hours after phenylephrine administration, *PCL-M5* formulation showed a variation of 7.98, 6.40, 5.33, 8.33 and 7.07 mmHg, respectively; *PHBV-M5* formulations showed a variation of 13.24, 8.04, 5.46, 13.84 and 11.22 mmHg, respectively; whereas pure manidipine showed a variation of 3.85, 3.74, 7.77, 16.97 and 12.20 mmHg, respectively.

The low variation of MAP forward phenylephrine administration demonstrates that this antihypertensive drug is able to keep the basal arterial pressure under any stimulus.

Animal studies demonstrated that formulation *PCL-M5* was able to hold down the mean arterial pressure variation up to 24 hours. These data prove the sustained antihypertensive effect of the proposed microparticle.

4. CONCLUSIONS

Polymeric microparticles containing manidipine were successfully obtained by simple emulsion/solvent evaporation. All formulations presented high loading

efficiencies rates. Morphological and surface data played a crucial role to explain drug release performance. *In vitro* dissolution studies showed their ability to control manidipine release, especially *PCL-M5* which sustained it for ten times longer than the pure drug by a biexponential model. Animal studies demonstrated that *PCL-M5* formulation was also able to hold down the mean arterial pressure variation up to 24 hours. These data prove the sustained antihypertensive effect of the proposed microparticles. All results demonstrated that *PCL-M5* is a feasible oral drug carrier to control the patient's blood pressure, adding safety, effectiveness and quality to pharmacotherapy.

5. REFERENCES

- [1] R.E. Schmieder, Cardiovascular Risk Management - Efficacy of Manidipine in Hypertension and Beyond, *Eur. Cardiol.* (2008) 69-74.
- [2] N.B. Rios, F.R. Esparragon, C.F.A. Rodriguez, J.C.R. Perez, Vascular and metabolic properties of manidipine, *Nefrologia* 31 (2011) 268-274.
- [3] R. Fogari, A. Zoppi, A. Mugellini, P. Preti, L. Corradi, P. Lusardi, Effect of low-dose manidipine on ambulatory blood pressure in very elderly hypertensives, *Cardiovasc. Drugs Ther.* 13 (1999) 243-248.
- [4] O. Kohmann Junior, A.B. Ribeiro, Manidipina no tratamento da hipertensão arterial essencial estágio I e II do paciente com sobrepeso ou obesidade androide: Estudo multicêntrico brasileiro de eficácia, tolerabilidade e efeitos metabólicos, *Arq. Bras. Cardiol.* 77 (2001) 463-470.
- [5] N. Martell-Claros, J.J. Cruz, Manidipine for hypertension not controlled by dual therapy in patients with diabetes mellitus, *Clin. Drug Investig.* 31 (2011) 427-434.
- [6] R. Fogari, A. Mugellini, M. Circelli, G. Cremonesi, Combination delapril/manidipine as antihypertensive therapy in high-risk patients, *Clin. Drug Investig.* 31 (2011) 439-453.
- [7] J. Mielcarek, O. Szamburska, Inclusion Complexes of manidipine with γ -cyclodextrin and identification of photodegradations products, *J. Inclusion Phenom. Macrocyclic Chem.* 52 (2005) 195-200.

- [8] K. Csabai, M. Vikmon, J. Szejtli, E. Redenti, G. Poli, P. Ventura, Complexation of manidipine with cyclodextrins and their derivatives, *J. Inclusion Phenom. Macrocyclic Chem.* 31(1998) 169-178.
- [9] J. Siepmann, R.A. Siegel, M.J. Rathbone, *Fundamentals and Applications of Controlled Release Drug Delivery*, Springer, New York, 2012.
- [10] M. Ahmad, A. Madni, M. Usman, A. Munir, N. Akhtar, H.M.S. Khan, Pharmaceutical microencapsulation technology for development of controlled release drug delivery systems, *World Academy Sci. Eng. Technol.* 75 (2011) 384-387.
- [11] D.T. Birnbaum, L. Brannon-Peppas, Microparticle drug delivery systems. In: *Drug delivery systems in cancer therapy*. Humana Press, Totowa, 2003.
- [12] K. Bowey, R.J. Nuefeld, Systemic and mucosal delivery of drugs within polymeric microparticles produced by spray drying, *Biodrugs* 24 (2010) 359-377.
- [13] H. Yoshizawa, Trends in microencapsulation research, *Kona* 22 (2004) 23-31.
- [14] R.P. Raffin, L.M. Colomé, E.E.S. Schapoval, D.S. Jornada, A.R. Pohlmann, S.S. Guterres, Gastro-resistant microparticles containing sodium pantoprazole: stability studies and in vivo anti-ulcer activity, *Open Drug Deliv. J.* 1 (2007) 28-35.
- [15] S.K. Gosh, *Functional coatings by polymer microencapsulation*, Wiley-VCH, Weinheim, 2006.
- [16] S.V. Canevarolo Jr, *Técnicas de caracterização de polímeros*, Artliber, São Paulo, 2004.
- [17] A. Lamprecht, H.R. Torres, U. Schafer, C.M. Lehr, Biodegradable microparticles as a two-drug controlled release formulation: a potential treatment of inflammatory bowel disease, *J. Controlled Release* 69 (2000) 445-454.
- [18] The Japanese Pharmacopoeia, sixteenth ed., suplement I, 2012, p. 1062.
- [19] K.A. Khan, The concept of dissolution efficiency, *J. Pharm. Pharmacol.* 27 (1975) 48-49.
- [20] G. Freitag, Guidelines on dissolution profile comparison, *Drug Information J.* 35 (2001) 865-874.
- [21] R.C.R. Beck, A.R. Pohlmann, E.V. Benvenuti, T.D. Costa, S.S. Guterres, Nanostructured-coated diclofenac-loaded microparticles: preparation, morphological characterization, in vitro release and in vivo gastrointestinal tolerance, *J. Braz. Chem. Soc.* 16 (2005) 1233-1240.

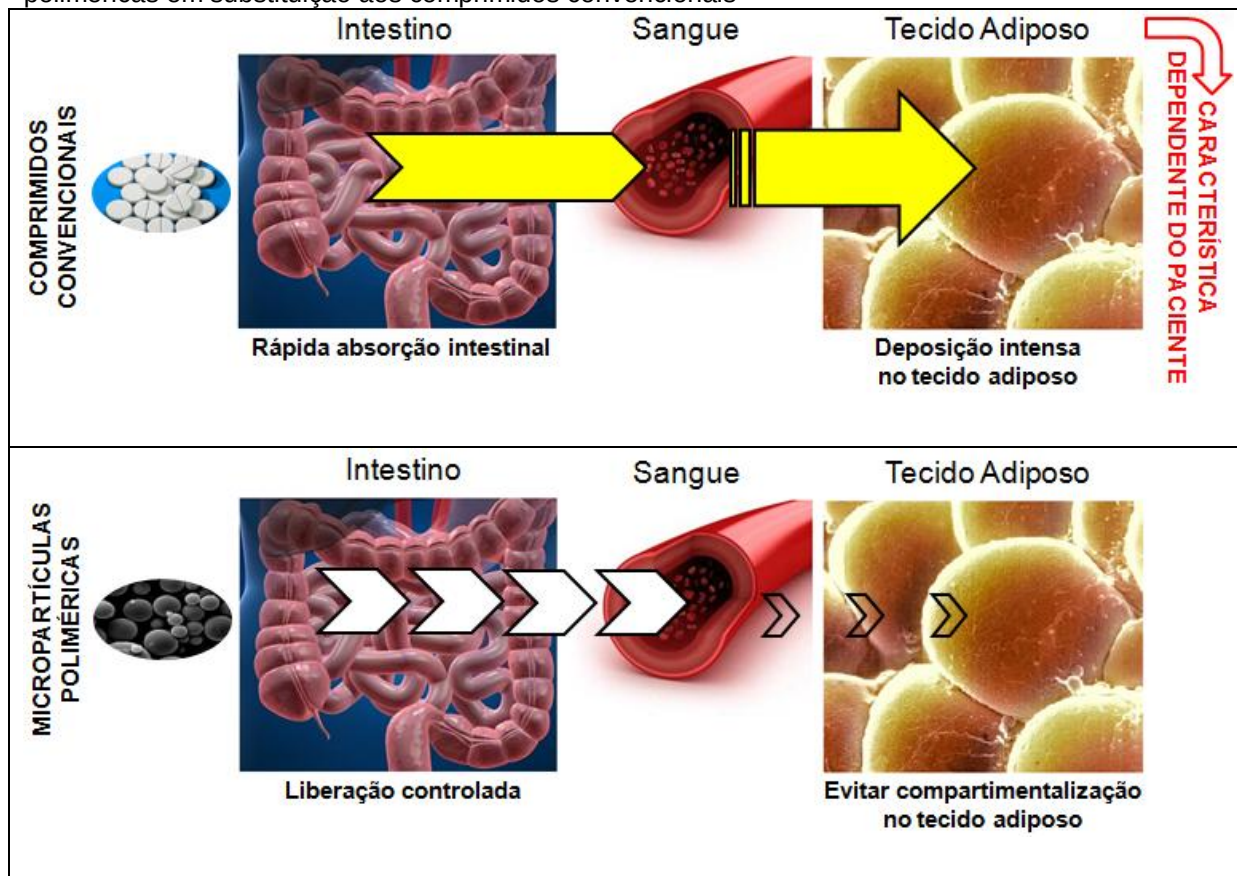
- [22] S.R. Schaffazick, S.S. Guterres, L.L. Freitas, A.R. Pohlmann, Caracterização e estabilidade físico-química de sistemas poliméricos nanoparticulados para administração de fármacos, *Quim. Nova* 26 (2003) 726-737.
- [23] P.V. Farago, R.P. Raffin, A.R. Pohlmann, S.S. Guterres, S.F. Zawadzki, Physicochemical characterization of a hydrophilic model drug-loaded PHBV microparticles obtained by the double emulsion/solvent evaporation technique, *J. Braz. Chem. Soc.* 19 (2008) 1298-1305.
- [24] M.K. Riekes, F.M. Barboza, D.D. Vechia, M. Bohatch Jr., P.V. Farago, D. Fernandes, M.A.S. Silva, H.K. Stulzer, Evaluation of oral carvedilol microparticles prepared by simple emulsion technique using poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) and polycaprolactone as polymers, *Mater. Sci. Eng., C* 31 (2011) 962-968.
- [25] M.P. Desai, V. Labhasetwar, G.L. Amidon, R.J. Levy, Gastrointestinal uptake of biodegradable microparticles: Effect of particle size, *Pharm. Res.* 13 (1996) 1838-1845.
- [26] S.F. Poletto, E. Jager, M.I. Ré, S.S. Guterres, A.R. Pohlmann, Rate-modulating PHBV/PCL microparticles containing weak acid model drugs, *Int. J. Pharm.* 345 (2007) 70-80.
- [27] M. Maghsoodi, Physicomechanical properties of naproxen-loaded microparticles prepared from Eudragit L100, *Am. Association Pharm. Sci.* 10 (2009) 120-128.
- [28] J.B.E. Mendes, M.K. Riekes, V.M. Oliveira, M.D. Michel, H.K. Stulzer, N.M. Khalil, S.F. Zawadzki, R.M. Mainardes, P.V. Farago, PHBV/PCL Microparticles for Controlled Release of Resveratrol: Physicochemical Characterization, Antioxidant Potential, and Effect on Hemolysis of Human Erythrocytes, *Scientific World J.* 2012 (2012) 1-13.

DISCUSSÃO GERAL

Considerando a crescente incidência de hipertensão arterial sistêmica na população, a indústria farmacêutica busca medicamentos contendo fármacos que associam um controle adequado da pressão sanguínea a efeitos metabólicos complementares. Nesse contexto, a manidipina destaca-se como uma opção interessante, em função do baixo potencial edematogênico, da nefroproteção, da redução significativa dos valores de glicemia, de hemoglobina A1c, de LDL-colesterol, de colesterol total e de triglicerídios em pacientes com HAS e diabetes tipo 2, além de efeitos benéficos sobre os marcadores inflamatórios e pró-trombóticos. Entretanto, características físico-químicas e biofarmacêuticas desse fármaco limitam o seu uso terapêutico.

Nesse sentido, a microencapsulação se apresenta como uma alternativa tecnológica capaz de impedir a compartimentalização rápida da manidipina aos adipócitos, aumentando o seu tempo de trânsito intestinal e, conseqüentemente, otimizando sua performance *in vivo*. Essa hipótese norteou o principal objetivo desse trabalho (Figura 1).

FIGURA 1 - Hipótese estabelecida no presente trabalho, que justifica o uso de micropartículas poliméricas em substituição aos comprimidos convencionais



As micropartículas foram obtidas com sucesso pelo método de emulsão simples/evaporação do solvente, resultando em altas taxas de rendimento para todas as formulações.

Considerando a importância de um método validado que permita um controle de qualidade adequado do medicamento, foi necessário desenvolver um método para quantificação da manidipina nas micropartículas de poli(ϵ -caprolactona) (PCL) e poli(3-hidroxibutirato-co-hidroxivalerato) (PHBV) desenvolvidas.

Os resultados demonstraram que o método de cromatografia líquida de alta eficiência com detecção espectrofotométrica na região do ultravioleta (HPLC/UV) foi seletivo, linear para a faixa estudada (10 a $50 \mu\text{g.mL}^{-1}$), preciso, exato e robusto para a quantificação da manidipina nas micropartículas.

A aplicação desse método para a determinação da eficiência de encapsulação do fármaco detectou a presença de, no mínimo, 84% de manidipina encapsulada nas formulações. Esse dado pode ser explicado pela baixa hidrossolubilidade desse

anti-hipertensivo, o que acarreta altas concentrações do fármaco dentro das micropartículas.

As fotomicrografias das micropartículas preparadas a partir da PCL indicaram um formato esférico, com superfície lisa e regular, ao passo que as micropartículas preparadas a partir do PHBV revelaram formato esférico, com superfície porosa.

A morfologia dessas partículas foi um parâmetro determinante no processo de liberação do fármaco. A presença de poros, além de representar uma importante evidência morfológica para as micropartículas de PHBV, facilitou o acesso do meio de dissolução ao fármaco, resultando em uma liberação mais rápida do ativo encapsulado. De acordo com a literatura, esses poros podem ser decorrentes da natureza do poli-hidroxialcanoato utilizado e/ou resultantes da remoção rápida do solvente orgânico (FARAGO et al., 2008).

Os difratogramas de raios-X demonstraram que todos os materiais microparticulados apresentaram perfis de difração cristalina muito semelhantes aos polímeros isolados, com desaparecimento ou redução expressiva dos picos de cristalinidade característicos da manidipina. Os resultados analisados sugerem que o processo de microencapsulação levou à amorfização do fármaco. Em geral, os sólidos amorfos são mais solúveis do que as formas cristalinas, devido às energias livres envolvidas no processo de dissolução. Sólidos no estado amorfo têm moléculas dispostas aleatoriamente e, portanto, pouca energia é necessária para separá-las (RIEKES et al., 2011).

O tamanho médio das partículas obtidas, inferior a 8 μm para todas as formulações, permite assegurar que a administração dessas micropartículas proporcione um efeito prolongado da manidipina, já que elas apresentam um trânsito intestinal mais lento (DESAI et al., 1996). Entretanto, não é suficiente para se ter uma absorção sistêmica das micropartículas, o que viabiliza a sua ação ao longo do trato gastrointestinal.

A análise espectroscópica na região do infravermelho com transformada de Fourier, além de confirmar dados anteriormente relatados na literatura para os polímeros (MAGHSOODI, 2009; POLETTO et al., 2007) e para o fármaco (THE JAPANESE PHARMACOPOEIA, 2012), assegurou que o processo de microencapsulação não resultou na formação de ligações químicas entre a manidipina e os polímeros, as quais possivelmente alterariam o efeito terapêutico

esperado do fármaco. Essa afirmação justifica-se pelos espectros obtidos para as micropartículas, que apresentaram bandas de absorção nas mesmas faixas de número de onda observados para as respectivas misturas físicas, sugerindo que os componentes iniciais permaneciam quimicamente inalterados. Ambos os polímeros apresentam em suas estruturas químicas hidroxilas primárias terminais, ao passo que o fármaco apresenta um grupamento nitro aromático reativo. Este grupamento nitro pode reduzir e formar anilinas, entretanto, essa reação requer um meio redutor potente, fator inexistente durante o processo de microencapsulação.

A análise termogravimétrica indicou que as micropartículas de PCL são mais estáveis termicamente do que as de PHBV. Os sistemas microparticulados de PCL começaram a perder massa em 224°C, enquanto os sistemas microparticulados de PHBV começaram em 161°C. Resultados semelhantes têm sido descrito na literatura para micropartículas com os mesmos polímeros (RIEKES et al., 2011; MENDES et al., 2012).

A interpretação dos termogramas obtidos por calorimetria exploratória diferencial indicou que todos os sistemas microparticulados obtidos apresentaram um único evento de fusão na mesma temperatura observada para os polímeros isolados, confirmando, portanto, os dados anteriormente obtidos pela difração de raios-X, sugerindo que a manidipina sofreu uma amorfização.

Os ensaios de dissolução demonstraram que a formulação *PCL-M5* foi capaz de prolongar a liberação da manidipina por 23 horas, ao passo que o fármaco puro é liberado em pouco mais de 2 horas. Esse resultado deve-se ao conteúdo polimérico que se mostrou capaz de controlar a liberação do fármaco.

A capacidade aumentada em prolongar a liberação do fármaco, revelada pelas micropartículas contendo 5% de fármaco, é justificável devido à proporção polímero/ fármaco que é maior nessas formulações.

A avaliação modelo-independente dos perfis de dissolução da manidipina pura e dos sistemas microparticulados, demonstrou diferença estatisticamente significativa entre os perfis do fármaco puro e as formulações *PCL-M5*, *PCL-M10* e *PHBV-M5*. A análise modelo-dependente revelou que tanto a manidipina pura quanto os sistemas microparticulados obtidos adequaram-se ao modelo de cinético de liberação biexponencial. Dessa forma, é possível sugerir que as formulações

somente modificaram as características farmacocinéticas indesejáveis do fármaco, sem interferir no mecanismo de sua liberação no trato gastrointestinal.

Os estudos *in vivo*, em ratos, mostraram que a formulação *PCL-M5* foi capaz de conter a variação da pressão arterial média (PAM), frente à administração de fenilefrina, por até 24 horas. Quanto menor a variação da PAM frente à administração de fenilefrina, maior a eficácia anti-hipertensiva do fármaco, uma vez que isso indica que ele é capaz de manter a pressão arterial basal sob qualquer estímulo hipertensivo.

Sendo assim, a avaliação da atividade anti-hipertensiva, atestou o potencial da micropartícula de PCL em consolidar-se como uma alternativa promissora na administração oral da manidipina.

CONCLUSÕES

1. As micropartículas contendo manidipina foram obtidas com sucesso, empregando os polímeros poli(ϵ -caprolactona) e poli(3-hidroxibutirato-co-hidroxivalerato);
2. O método de CLAE/UV mostrou-se seletivo, linear, preciso, exato e robusto para quantificação do fármaco nas micropartículas obtidas;
3. A manidipina foi microencapsulada com valores elevados de eficiência de encapsulação;
4. A morfologia das micropartículas poliméricas desempenha um papel decisivo na cinética de liberação do fármaco;
5. O processo de microencapsulação não alterou quimicamente as estruturas dos componentes iniciais, entretanto, promoveu a amorfização do fármaco;
6. As micropartículas apresentaram estabilidade térmica como carreadores de liberação controlada por via oral;
7. Todas as formulações preparadas prolongaram a taxa de dissolução do fármaco, sem alterar o modelo cinético biexponencial de liberação;
8. A formulação *PCL-M5* mostrou-se capaz de prolongar a liberação *in vitro* da manidipina e, ainda, sustentar o seu efeito anti-hipertensivo por 24 horas, sendo, portanto, uma estratégia viável para controlar a pressão arterial do paciente, acrescentando eficácia, segurança e qualidade à farmacoterapia.

REFERÊNCIAS

- AAMIR, M. N. et al. Development and in vitro–in vivo relationship of controlled-release microparticles loaded with tramadol hydrochloride. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 407, p. 38-43, 2011.
- AHMAD, M. et al. Pharmaceutical microencapsulation technology for development of controlled release drug delivery systems. *World Academy of Science, Engineering and Technology*, v. 75, p. 384-387, 2011.
- ALLEN, L. V. J.; POPOVICH, N. G.; ANSEL, H. C. *Formas Farmacêuticas e Sistemas de Liberação de Fármacos*. 8 ed. São Paulo: Artmed, 2007.
- AMASS, W.; AMASS, A. E.; TIGHE, B. A review of biodegradable polymers: uses, current developments in the synthesis and characterization of biodegradable polyesters, blends of biodegradable polymer and recent advances in biodegradation studies. *Polymer International*, v. 47, p. 89-144, 1998.
- ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária; *RE nº 899, de 29 de maio de 2003: Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos*. Brasil: Ministério da Saúde, 2003.
- AULTON, M. E. *Delineamento de formas farmacêuticas*. Porto Alegre: Artmed, 2005.
- BECK, R. C. R. et al. Nanostructured-coated diclofenac-loaded microparticles: preparation, morphological characterization, *in vitro* release and *in vivo* gastrointestinal tolerance. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, v. 16, p. 1233-1240, 2005.
- BERKELS, R. et al. Different antioxidative potencies of dihydropyridine calcium channel modulators in various models. *Vascular Pharmacology*, v. 42, p. 145-152, 2005.
- BIRNBAUM, D. T.; BRANNON-PEPPAS, L. *Microparticle drug delivery systems*. In: *Drug delivery systems in cancer therapy*. Totowa: Humana Press, 2003.
- BOWEY, K.; NEUFELD, R.J. Systemic and mucosal delivery of drugs within polymeric microparticles produced by spray drying. *Biodrugs*, v. 24, p. 359-377, 2010.
- BROWN, M. J. et al. Morbidity and mortality in patients randomized to double-blind treatment with long-acting calcium-channel blocker or diuretic in the International Nifedipine GITS study: Intervention as a Goal in Hypertension Treatment (INSIGHT). *Lancet*, v. 356, p. 366-372, 2000.
- CANEVAROLO JUNIOR, S. V. *Técnicas de caracterização de polímeros*. São Paulo: Artliber, 2004.
- CHAKRAPANI, A. *Processing and characterization of polymer microparticles for controlled drug delivery systems*. 92 p. Doutorado em Filosofia, The Ohio State University, Columbus, 2006.
- CHAKRAVARTHI, S. S.; ROBINSON, D. H. Enhanced cellular association of paclitaxel delivered in chitosan-PLGA particles. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 409, p. 111-120, 2011.

- CRUZ, L. et al. Formulation and in vivo evaluation of sodium alendronate spray-dried microparticles intended for lung delivery. *Journal of Controlled Release*, v. 152, p. 370-375, 2011.
- CSABAI, K. et al. Complexation of manidipine with cyclodextrins and their derivatives. *Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry*, v. 31, p. 169-178, 1998.
- DAHLOF, B. et al. Prevention of cardiovascular events with an antihypertensive regimen of amlodipine adding perindopril as required versus atenolol adding bendroflumethiazide as required. *Lancet*, v. 366, p. 895-906, 2005.
- DESAI, M. P. et al. Gastrointestinal uptake of biodegradable microparticles: Effect of particle size. *Pharmaceutical Research*, v. 13, p. 1838-1845, 1996.
- DUARTE, M. A. T. et al. Thermal and mechanical behavior of injection molded poly(3-hydroxybutyrate)/poly(e-caprolactone) blends. *Materials Research*, v. 9, p. 25-27, 2006.
- FARAGO, P. V. et al. Physicochemical characterization of a hydrophilic model drug-loaded PHBV microparticles obtained by the double emulsion/solvent evaporation technique. *Journal of Brazilian Chemical Society*, v. 19, p. 1298-1305, 2008.
- FOGARI, R. et al. Effect of low-dose manidipine on ambulatory blood pressure in elderly hypertensives. *Cardiovascular Drugs and Therapy*, v. 13, p. 243-248, 1999.
- FOGARI, R. et al. Manidipine has less oedematogenous potential than amlodipine. *Journal of Hypertension*, v. 18, p. 154-155, 2000a.
- FOGARI, R. et al. Effects of different dihydropyridine calcium antagonists on plasma norepinephrine in essential hypertension. *Journal of Hypertension*, v. 18, p. 1871-1875, 2000b.
- FOGARI, R. Ankle oedema and sympathetic activation. *Drugs*, v. 65, p. 21-27, 2005.
- FOGARI, R. et al. Combination delapril/manidipine as antihypertensive therapy in high-risk patients. *Clinical Drug Investigation*, v. 31, p. 439-453, 2011.
- FREITAG, G. Guidelines on dissolution profile comparison. *Drug Information Journal*, v. 35, p. 865-874, 2001.
- GENNARO, A. R. *Remington: A ciência e a prática da farmácia*. 20 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004.
- GOSH, S. K. *Functional coatings by polymer microencapsulation*. Weinheim: Wiley-VCH, 2006.
- HANSSON, L. et al. Randomized trial of effects of calcium antagonists compared with diuretics and alpha-blockers on cardiovascular morbidity and mortality in hypertension: the Nordic Diltiazem (NORDIL) study. *Lancet*, v. 356, p. 359-365, 2000.
- ICH – “*International Conference on Harmonization of Technical Requirements for registration of Pharmaceutical for Human use: Q 2B- validation of Analytical procedure: methodology*”, 1996.
- IIMURA, O. et al. Effects of a calcium channel blocker, manidipine, on insulin sensitivity in essential hypertensives. *Journal of Diabetes Complications*, v. 9, p. 215-219, 1995.

KAHAN, F.; KATARA, R.; RAMTEKE, S. Enhancement of bioavailability of cefpodoxime proxetil using different polymeric microparticles. *AAPS PharmSciTech*, v. 11, n. 3, p. 1-8, 2010.

KHAN, K. A. The concept of dissolution efficiency. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, v. 27, p. 48-49, 1975.

KOHMANN JUNIOR, O.; RIBEIRO, A. B. Manidipina no tratamento da hipertensão arterial essencial estágio I e II do paciente com sobrepeso ou obesidade andróide. Estudo multicêntrico brasileiro de eficácia, tolerabilidade e efeitos metabólicos. *Arquivo Brasileiro de Cardiologia*, v. 77, n. 4, p. 463-470, 2001.

LAMPRECHT, A. et al. Biodegradable microparticles as a two-drug controlled release formulation: a potential treatment of inflammatory bowel disease. *Journal of Controlled Release*, v. 69, p. 445-454, 2000.

LAW, M. R.; MORRIS, J. K.; WALD, N. J. Use of blood pressure lowering drugs in the prevention of cardiovascular disease: meta-analysis of 147 randomised trials in the context of expectations from prospective epidemiological studies. *BMJ*, p. 338, 2009.

LIESIENE, J.; MATALIONIENE, J. Application of water-soluble diethylaminoethylcellulose in oral drug delivery. *Reactive & Functional Polymers*, v. 59, p. 185-191, 2004.

MAGHSOODI, M. Physicomechanical properties of naproxen-loaded microparticles prepared from Eudragit L100. *American Association of Pharmaceutical Scientists*, v. 10, p. 120-128, 2009.

MAINARDES, R. M. *Desenvolvimento de nanopartículas de PLA e PLA-PEG para administração intranasal de zidovudina*. 2007, 133f. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho". Araraquara, 2007.

MAKI, M. et al. The effect of manidipine on renal hemodynamics in essential hypertensive patients: responses to acute stress. *Blood Pressure*, v. 1, p. 106-113, 1992.

MALTA, D. C. et al. Doenças crônicas não-transmissíveis: mortalidade e fatores de risco no Brasil, 1990 a 2006. *Saúde Brasil 2008*, p. 337-362, 2009.

MARTELL-CLAROS, N.; CRUZ, J. J. Manidipine for hypertension not controlled by dual therapy in patients with diabetes mellitus. *Clinical Drug Investigation*, v. 31, p. 427-434, 2011.

MARTINEZ-MARTIN, F. J. et al. Effects of manidipine and its combination with an ACE inhibitor or insulin sensitivity and metabolic, inflammatory and prothrombotic markers in hypertensive patients with metabolic syndrome. The MARCADOR study. *Clinical Drug Investigation*, v. 31, p. 201-212, 2011.

MARTINEZ-MARTIN, F. J. Manidipine in hypertensive patients with metabolic syndrome. The MARIMBA study. *Expert Review of Cardiovascular Therapy*, v. 7, p. 863-869, 2009.

MARTINEZ-MARTIN, F. J.; SAIZ-SATJES, M. Add-on manidipine versus amlodipine in diabetic patients with hypertension and microalbuminuria: the AMANDHA study. *Expert Review of Cardiovascular Therapy*, v. 6, p. 1347-1355, 2008.

- MEIER, M. M.; KANIS, L. A.; SOLDI, V. Characterization and drug permeation profile of microporous and dense cellulose acetate membranes: influence of plasticizer and pore-forming agent. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 278, p. 99-110, 2004.
- MENDES, J. B. E. et al. PHBV/PCL Microparticles for Controlled Release of Resveratrol: Physicochemical Characterization, Antioxidant Potential, and Effect on Hemolysis of Human Erythrocytes. *The Scientific World Journal*, v. 2012, p.1-13, 2012.
- MIELCAREK, J; SZAMBURSKA, O. Inclusion Complexes of manidipine with γ -cyclodextrin and identification of photodegradations products. *Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry*, v. 52, p. 195-200, 2005.
- MIZUNO, K. et al. Evaluation of manidipine hydrochloride, a new calcium antagonist in the treatment of hypertensive patients with renal disease. *Current Therapeutic Research*, v. 52, p. 248-253, 1992.
- NAIR, L. S.; LAURENCIN, C. T. Biodegradable polymers as biomaterials. *Progress in Polymer Science*, v. 32, p. 762-798, 2007.
- NEAL, B.; MACMAHON, S.; CHAPMAN, N. Effects of ACE inhibitors, calcium antagonists, and other blood-pressure-lowering drugs: results of prospectively designed overviews of randomised trials. *Lancet*, v. 355, p. 1955-1964, 2000.
- OH, Y. J. et al. Preparation of budesonide-loaded porous PLGA microparticles and their therapeutic efficacy in a murine asthma model. *Journal of Controlled Release*, v. 150, p. 56-62, 2011.
- OLIVEIRA, R. B.; LIMA, E. M. Polímeros na obtenção de sistemas de liberação de fármacos. *Revista Eletrônica de Farmácia*, v. 3, p. 29-35, 2006.
- OTERO, M. L.; MARTELL-CLAROS, N. Manidipine versus enalapril monotherapy in patients with hypertension and type 2 diabetes mellitus: a multicenter, randomized, double-blind, 24-week study. *Clinical Therapy*, v. 27, p. 166-173, 2005.
- PASTRANA, Y. C. et al. Caracterización farmacocinética de formulaciones orales de liberación sostenida. Factores que influyen en el perfil farmacocinético. *Acta Pharmaceutica Bonaerense*, v. 19, p. 25-34, 2000.
- PILLAI, O.; PANCHAGNULA, R. Polymers in drug delivery. *Current Opinion in Chemical Biology*, v. 5, p. 447-451, 2001.
- POLETTTO, F. S. et al. Rate-modulating PHBV/PCL microparticles containing weak acid model drugs. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 345, p. 70-80, 2007.
- POUTON, C. W.; AKHTAR, S. Biosynthetic polyhydroxyalkanoates and their potential in drug delivery. *Advanced Drug Delivery Reviews*, v. 18, p. 133-162, 1996.
- RAFFIN, R. P. et al. Gastro-resistant microparticles containing sodium pantoprazole: stability studies and *in vivo* anti-ulcer activity. *Open Drug Delivery Journal*, v. 1, p. 28-35, 2007.
- RIBANI, M. et al. Validação em Métodos Cromatográficos e Eletroforéticos. *Química Nova*, v. 27, p. 771-780, 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: C*, v. 31, p. 962-968, 2011.

RIOS, N. B. et al. Vascular and metabolic properties of manidipine. *Nefrologia*, v. 31, p. 268-274, 2011.

ROA, J. P. B. et al. Síntese e caracterização do copolímero poli(3-hidroxibutirato-co- ϵ -caprolactona) a partir de poli(3-hidroxibutirato) e poli(ϵ -caprolactona). *Polímeros*, v. 20, n. 3, p. 221-226, 2010.

RUSU, M.; URSU, M.; RUSU, D. Poly(vinyl chloride) and poly(ϵ -caprolactone) blends for medical use. *Journal of Thermoplastic Composite Materials*, v. 19, p. 173-190, 2006.

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

SCHMIEDER, R. E. Cardiovascular Risk Management – Efficacy of Manidipine in Hypertension and Beyond. *European Cardiology*, 2008.

SIEPMANN, J.; SIEGEL, R. A.; RATHBONE, M. J. (Editores). *Fundamentals and Applications of Controlled Release Drug Delivery*. New York: Springer, 2012.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE CARDIOLOGIA. VI Diretrizes Brasileiras de Hipertensão. *Arquivo Brasileiro de Cardiologia*, v. 95, p. 1-51, 2010.

STASSEN, J.; FAGARD, R.; THIJS, L. Randomized double-blind comparison of placebo and active treatment for older patients with isolated systolic hypertension. *Lancet*, v. 350, p. 757-64, 1997.

TAKABATAKE, T. et al. Renal effects of manidipine hydrochloride. A new calcium antagonist in hypertensive patients. *European Journal of Clinical Pharmacology*, v. 45, p. 321-325, 1993.

SOCIETY OF JAPANESE PHARMACOPOEIA. The Japanese Pharmacopoeia. 16 ed. Suplemento I, p. 1062, 2012.

TOBA, H. et al. Calcium channel blockades exhibit anti-inflammatory and antioxidative effects by augmentation of endothelial nitric oxide synthase and the inhibition of angiotensin converting enzyme in the N(G)-nitro-L-arginine methyl ester-induced hypertensive rat aorta: vasoprotective effects beyond the blood pressure-lowering effects of amlodipine and manidipine. *Hypertension Research*, v. 28, p. 689-700, 2005.

UESHIBA, H.; MIYACHI, Y. Effects of the long-acting calcium channel blockers, amlodipine, manidipine and cilnidipine on steroid hormones and insulin resistance in hypertensive obese patients. *Internal Medicine*, v. 43, p. 561-565, 2004.

VALENTIN, J. P. et al. Effect of different calcium antagonists on transcapillary fluid shift. *American Journal of Hypertension*, v. 3, p. 491-5, 1990.

VAN HAMERSVELT, H. W. et al. Oedema formation with the vasodilators nifedipine and diazoxide: direct local effect or sodium retention. *Journal of Hypertension*, v. 14, p. 1041-1045, 1996.

YAMAGUCHI, M. et al. Determination of manidipine enantiomers in human serum using chiral chromatography and column-switching liquid chromatography. *Journal of Chromatography*, v. 575, p. 123-129, 1992.

YOSHIZAWA, H. Trends in microencapsulation research. *Kona*, v. 22, p. 23-31, 2004.

ZHU, Y. Properties of polymeric drug delivery systems prepared by hot-melt extrusion. 2002. Tese (Doutorado) - Faculty of the Graduate School of the University of Texas. Austin, 2002.

Anexo A - Carta de Aprovação da Comissão de Ética do Uso de Animal

**PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
COMISSÃO DE ÉTICA DO USO DE ANIMAL**

CARTA DE APROVAÇÃO

Processo CEUA – 26/2012

Protocolo UEPG – 14753/2012

Título – “Projeto de pesquisa – potencial anti-hipertensivo de micropátulas poliméricas contendo manidipina”.

Interessado – Prof. Daniel Fernandes

Data de Entrada – 15/08/2012

Resultado: Aprovado

**Data/Prazo – Validade de dois anos para projetos de pesquisa.
14/08/2014**

Considerações

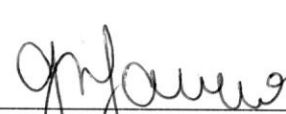
Prezado Professor,

Em relação ao protocolo de pesquisa sob sua responsabilidade a CEUA deliberou o seguinte:

- APROVADO, por dois anos, para a utilização de 72 ratos Wistar fêmeas, com idade de 90 dias.

Atenciosamente,

Relatório Final previsto para 90 dias após término da vigência do protocolo ou no momento da apresentação de um novo protocolo.



Professor Dr. Giovani Marino Favero
Coordenador Comissão de Ética no Uso de Animais CEUA-UEPG