

Avaliação da Absorção Intestinal do Captopril em Dispersões Sólidas com Polietilenoglicol pelo Método do Saco Intestinal Invertido

Autores

Aline Borelli Alonso

Orientador

Marco Vinicius Chaud

Apoio Financeiro

Fapic

1. Introdução

O captopril (CAP) foi o primeiro fármaco inibidor da Enzima Conversora de Angiotensina (ECA), uma carboxipeptidase responsável pela conversão de Angiotensina I (praticamente inativa) em Angiotensina II através da remoção de dois aminoácidos (CARRUTHERS, et al., 2000).

A Angiotensina II, além de promover vasoconstrição, estimula a secreção de aldosterona no córtex adrenal, levando à retenção de sódio e água. O reflexo destas ações é um aumento da pressão arterial promovido pela Angiotensina II, portanto, a ação do CAP como uma ferramenta útil no tratamento da hipertensão deve-se ao seu efeito de reduzir a produção de Angiotensina II (RANG *et al.*, 2003). O CAP apresenta um grupamento sulfidril que se liga ao átomo de zinco da Enzima Conversora de Angiotensina, inativando-a. O CAP, assim como os demais inibidores da ECA, afeta tanto a resistência quanto a capacitância dos vasos e, assim, reduzem tanto a pressão arterial quanto a carga cardíaca. Ao contrário de outros vasodilatadores, ele não afeta a contratilidade cardíaca, e, portanto, o débito cardíaco normalmente aumenta. O CAP age preferencialmente nos leitos vasculares sensíveis a angiotensina, que incluem aqueles dos rins, coração e cérebro (CARRUTHERS, et al., 2000; RANG *et al.*, 2003).

Os problemas causados por medicamentos contendo CAP bem como os seus valores positivos na terapêutica são bem conhecidos. Na tentativa de minimizar as intercorrências negativas, como a degradação oxidativa, e melhorar biodisponibilidade resolvemos avaliar de forma comparativa os efeitos da dispersão sólida na permeabilidade do CAP através de membranas intestinais.

A tecnologia das dispersões sólidas é caracterizada pela mistura de um ou mais componente, farmacologicamente ativo, em um carreador ou matriz, inerte, com a finalidade de alterar as propriedades do estado sólido, aumentar a taxa de dissolução, promover a liberação sustentada, melhorar o coeficiente de

solubilidade e a estabilidade de fármacos, podendo promover, também, dependendo do tipo de carreador um sistema de liberação modificada (SETHIA, 2003). Esta tecnologia compreende a obtenção de co-precipitados, nanopartículas, micropartículas, microesferas e outras dispersões de fármacos em polímeros preparados através destes processo (JOSUÉ *et al.*, 2000).

Durante o período de desenvolvimento de novos fármacos ou sistemas de liberação para administração por via oral, torna-se interessante avaliar, desde o início do desenvolvimento, a capacidade de permeação do produto através da membrana intestinal.

Vários modelos “in vitro” podem ser usados para avaliar o potencial absorptivo de fármacos. Alguns são amplamente utilizados na indústria farmacêutica para avaliar o potencial de absorção de novos fármacos, ou o perfil de absorção a partir de novos sistemas de liberação. O modelo do saco intestinal invertido vem sido usado com este propósito.

A técnica do saco intestinal invertido foi descrita primeiramente por Wilson & Wiseman, 1954, e usada para estudar o transporte de açúcares e aminoácidos. Durante um período vários autores, usando como meio de incubação a solução salina, apontaram como limitação deste método o tempo de sobrevivência das células. Contudo, BARTHE, *et al.*, 1998 (a) confirmaram a viabilidade do teste do saco intestinal invertido utilizando para incubação um complexo meio de cultura de tecidos biológicos (TC 199).

2. Objetivos

Avaliar a permeação intestinal do CAP em dispersões sólidas e misturas físicas com polietilenoglicol 6000 ou quitosana utilizando o modelo do saco intestinal invertido.

3. Desenvolvimento

Foram utilizados captopril (lote SLL 09046 CK1106), Quitosana, Glutaraldeído (Bell Soft®), Reagente de Folin Ciocalteu (Reagentes Analíticos Dinâmica®) e Polietilenoglicol 6000 (Synth).

A solução designada de TC-199 é utilizada para incubação dos segmentos intestinais utilizada, neste estudo, para avaliar a absorção intestinal de CAP. Essa solução é composta de 8,47g NaCl; 0,34g KCl; 0,126g CaCl₂.2H₂O; 0,595g NaHPO₄ e 10mM de glicose, para preparar um litro de solução em pH 7,4. Os demais reagentes e solventes eram de grau analítico.

As DS de CAP com PEG, respectivamente, nas proporções relativas de 2:1 foram preparadas pelo método de dissolução seguido de evaporação do solvente. Captopril e PEG foram dissolvidos separadamente em etanol e depois misturados. A solução foi transferida para o balão do rotaevaporador. Sob condições de pressão reduzida e temperaturas de $50 \pm 3^\circ\text{C}$ o etanol foi evaporado. A DS de Captopril com PEG 6000 foi transferida para placa de Petri e mantida à temperatura ambiente, em dessecador, com umidade controlada (20%UR), até peso constante.

As dispersões sólidas com quitosana, respectivamente, nas proporções relativas de 1:2 foram preparadas pelo método da reticulação seguido de evaporação do solvente. O captopril foi dissolvido em água purificada e a quitosana em ácido clorídrico (HCl). As soluções foram misturadas por agitação mecânica. Em seguida o glutaraldeído foi adicionado, gota a gota, a essa solução em quantidade suficiente para promover a reticulação da quitosana. A separação das partículas de DS do meio líquido foi feita por filtração seguida de centrifugação do filtrado. As partículas da DS foram transferida para placa de Petri e mantida à temperatura ambiente, em dessecador, com umidade controlada (20%UR), até peso constante.

As misturas físicas foram preparadas nas proporções relativas de 2:1 (captopril:PEG) e 1:2 (captopril:quitosana). As misturas foram realizadas em gral de porcelana com auxílio de pistilo. As amostras foram transferidas para o dessecador e mantida à temperatura ambiente, com umidade controlada (20%UR), até peso constante

As curvas de calibração foram usadas para determinar a concentração de captopril presente nas amostras. As curvas de calibração foram obtidas usando metodologia de análise espectrométrica nos comprimentos de onda na região do ultravioleta (210nm) e visível (670 nm).

As curvas de calibração foram obtidas na região do UV a partir de soluções de captopril nas concentrações de 1,0; 2,0; 3,0; 4,0; 5,0 e 6,0mg/ml. As soluções foram preparadas em meio TC 199. Os testes foram realizados em triplicata com 2 leituras.

Para avaliar o coeficiente de correlação entre a absorbância e a concentração de captopril em 670 nm usando reagente de Folin-Ciocalteu as soluções de captopril foram preparadas nas concentrações de 10, 20, 40 e 80mg/ml

Para o desenvolvimento do método do saco intestinal invertido foram utilizados ratos machos adultos da

raça Wistar mantidos em jejum por 12 horas. Após anestesia com tiopental o intestino delgado foi imediatamente dissecado e lavado com solução fria de TC-199, o intestino foi gentilmente invertido com auxílio de uma haste plástica flexível com aproximadamente 2,5mm de diâmetro. Uma das extremidades foi fechada e o segmento intestinal preenchido com TC-199, ficando com 8,0cm de comprimento. O segmento intestinal foi colocado em um erlenmeyer contendo 25,0ml de meio de cultura TC-199 com 10mM de glicose e adicionado de captopril. O sistema foi mantido oxigenado (O₂:CO₂ – 95:5) e sob agitação suave à temperatura de 37°C. Após 90 minutos o conteúdo do saco intestinal foi removido para determinação da quantidade de captopril permeado através da membrana. Os ratos foram divididos em grupos de seis animais (n=6), cada amostra foi submetida a duas leituras.

4. Resultados

As curvas de calibração foram usadas para determinar a concentração de CAP presentes na amostra. O coeficiente de correlação (r) foram 0,9973 ($l = 210\text{nm}$) em TC-199 e 0,994 ($l=670\text{nm}$). Em ambos os comprimentos de onda o coeficiente de correlação obtido para a regressão linear é indicativo de relação linear entre absorvância e concentração do soluto. Portanto, estão de acordo com a Lei de Beer.

O modelo do saco intestinal invertido é uma técnica relativamente simples e reproduzível. Barthe et al., 1988 e 1999 e Binks & Dobrota, 1990 confirmaram a viabilidade desta técnica usando para incubação um complexo meio de cultura para tecidos (TC 199). Este meio de incubação é muito importante neste ensaio porque é capaz de manter a integridade do fragmento intestinal e a viabilidade das células. A análise da permeação intestinal usando o modelo do saco intestinal invertido foi realizada com a finalidade de verificar a influência dos carreadores na permeação intestinal do captopril. As figuras 1 e 2 mostram a permeação cumulativa de captopril através da membrana intestinal do duodeno proximal. O resultado é a média de 6 determinações.

Os resultados apresentados na figura 1, mostram a maior absorção de CAP em dispersões sólidas quando o carreador é PEG. Apesar do PEG ser uma substância que reconhecidamente aumenta a absorção de fármacos através da membrana intestinal isto não ocorreu na mistura física, o que evidencia uma possível interação molecular entre o PEG e o CAP nas dispersões sólidas. A taxa de oxidação reconhecidamente alta do captopril em solução é minimizada na presença de tecidos orgânicos (ZHOU *et al.*, 1994).

A figura 2 mostra uma restrição da permeação do captopril imposta pela quitosana. Nas DS obtida por reticulação da quitosana originou a formação de partículas muito pequenas cuja liberação foi inferior a 50% no tempo de estudo deste experimento (90 minutos). Na mistura física a quantidade absorvida também foi inferior, neste caso entendemos que, devido as suas propriedades mucoadesivas, a quitosana impôs uma barreira física à permeação do captopril. Estudos, *in vivo*, poderiam contribuir para uma melhor avaliação da

quitosana como carreador, uma vez que esta substância é mais solúvel em meio ácido. Assim a liberação do captopril poderia ocorrer inicialmente no estômago após dissolução da quitosana.

5. Considerações Finais

Através dos resultados apresentados neste estudo observamos que a permeação intestinal do CAP em DS com PEG 6000 foi 1,3 vezes maior que a quantidade de fármaco absorvido a partir das MF ou do CAP livre. Esta maior permeação deve-se a interação do CAP com PEG na preparação das dispersões sólidas.

Os coeficientes de correlação obtidos entre os comprimentos de onda de 210nm (UV) e 670nm (visível) mostraram boa linearidade. Embora a sensibilidade do método seja maior na espectrometria UV.

Referências Bibliográficas

BARTHE, L., BESSOUET, M., WOODLEY, J.F. and HOUIN, G. The improved everted gut sac: a simple method to study intestinal P-glycoprotein. **International Journal Pharmacy**. V.173, p.255-258. 1998.

BINKS, S. P. & DOBROTA, M. Kinetics and mechanism of uptake of platinum-based pharmaceuticals by the rat small intestine. **Biochemical Pharmacology**. V. 40, n. 16, p. 1329-1336. 1990.

CARRUTHERS, S.G., HOFFMAN, B.B., MELMON, K.L. e NIERENBERG, D.W. Melmon and Morrelli's

Clinical Pharmacology. 4ªed. New York:International, 2000. p. 162 e 163.

JOSUÉ, A.; LARANJEIRA, M.C.M.; FÁVERE,V.T. e KIMURA, I.Y. Liberação controlada da eosina impregnada em microesferas de copolímero de quitosana e poli(ácido acrílico). **Polímeros**. vol.10, no.3, p.116-121. 2000.

RANG, H.P., DALE, M.M., RITTER, J.M. and MOORE, P.K. Farmacologia. 5ª ed. P. 338. Rio de Janeiro: Elsevier, 2003.

SETHIA, S. & SQUILLANTE, E. Solid dispersion: revival with greater possibilities and applications in oral drug delivery. **Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier System**. V.20, n. 2-3, p. 215-247. 2003.

WILSON, T.H & WISEMAN, G. The use of sacs of everted small intestine for the study of the transference of substances from the mucosal to the serosal surface. **Journal Physiology**. v.123, n.2, p.116-125. 1954.

ZHOU, X.H. and LI WANG PO, A. Stability and in vitro absorption of captopril, enalapril and lisinopril across the rat intestine. **Biochemical Pharmacology**. V.47, n.7, p.1121-1126. 1994.

Anexo 1



Figura 1: Permeação cumulativa de CAP, em dispersões sólidas com PEG, através da membrana intestinal de ratos (n=6).

Anexo 2



Figura 2: Permeação cumulativa de CAP, em dispersões sólidas com quitosana, através da membrana intestinal de ratos (n=6).